

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

UNAN-LEON

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

ESCUELA DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE ANALISIS DE DROGAS Y MEDICAMENTOS



TEMA:

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUA PURIFICADA QUE
SE COMERCIALIZA EN BOLSAS Y BOTELLA EN LA CIUDAD DE
LEÓN, 2008.**

Monografía para optar al título de licenciado Químico-Farmacéutico.

Autores:

Br. Mario Jerónimo Espinoza Zelaya.

Br. Oscar Alberto Jirón Ruiz.

Tutor: Msc. Lisseth Arauz

AGRADECIMIENTO

Agradecemos en primer lugar a DIOS, por brindarnos la sabiduría, la fuerza y deseos de culminar nuestro trabajo monográfico y llevar a cabo nuestra meta tan soñada.

Agradecemos a nuestros padres por habernos apoyado en el largo camino de nuestra enseñanza y dándonos ánimo cada día para finalizar el presente trabajo investigativo.

A nuestra Tutora Lic. Lisseth Arauz por su apoyo incondicional que nos brindo todo este tiempo y por transmitirnos su valioso conocimiento.

A nuestro docente y amigo Lic. Kelvin Núñez por su orientación y colaboración que permitieron llevar a cabo nuestro estudio.

A todos los docentes que nos compartieron su sabiduría durante estos años en la Facultad de Ciencias Química que nos permitieron crecer profesionalmente.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya.

Oscar Alberto Jirón Ruiz.

DEDICATORIA

A DIOS mi creador, el ser que considero como la base de mi vida, que me ha guiado y brindado fortaleza en cada uno de mis pasos llevándome a culminar una de mis metas mas importantes.

A mis padres por sus valiosos consejos, su ayuda incondicional y sus esfuerzos que me permitieron salir adelante, brindándome su atención y motivándome en los momentos difíciles y obtener mi título.

A mi tía por ayudarme económicamente y brindarme siempre su apoyo incondicional en todo el transcurso de mis estudios.

A mis hermanas por apoyarme en mi vida y en mis estudios.

A mi novia por estar siempre conmigo en los buenos y malos momentos, por darme palabras de aliento para superar las dificultades, por su cariño y comprensión para lograr esta etapa de mi vida.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya.

DEDICATORIA

A DIOS nuestro creador por su misericordia, gracia y bondad, por darme el privilegio maspreciado como es la vida, sus bendiciones y fuerza para concluir mis estudios universitarios e iniciar otra etapa importante en mi vida.

A mis padres por su apoyo incondicional tanto moral como económicamente motivándome a salir siempre adelante y obtener mi título universitario.

A mis abuelas por su amor y derroche de afecto que me han brindado todos los días de mi vida.

A mi esposa e hijo que son un pilar fundamental en mi vida y la razón de mí existir.

Oscar Alberto Jirón Ruiz.

INDICE

Contenido	Pagina
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	2
3. Marco Teórico.....	3
3.1. Generalidades sobre el agua.....	4
3.2. Características químicas de las soluciones acuosas.....	7
3.3. Aguas naturales.....	8
3.4. Clasificación de las aguas.....	9
3.5. Tratamiento para potabilizar las aguas naturales.....	13
3.6. Proceso de potabilización de aguas en Nicaragua.....	15
3.7. Procedimiento microbiológico.....	20
3.8. Parámetros bacteriológicos y organolépticos.....	22
3.9. Método NMP.....	24
4. Diseño Metodológico.....	31
4.1 Material y Equipo.....	32
4.2 Procedimiento.....	33
4.3 Esquematización del procedimiento.....	35
5. Resultados.....	36
6. Análisis de Resultados.....	39
7. Conclusión.....	42

8.	Recomendaciones.....	43
9.	Bibliografía.....	44
10.	Anexos.....	46
10.1.	Tabla para calcular NMP.....	47
10.2.	Fotos de Resultados.....	48
10.3.	Glosario.....	54



INTRODUCCION

Nicaragua es un país que cuenta con importantes recursos hídricos naturales como: ríos, lagos y lagunas los cuales pueden considerarse como grandes potenciales de obtención de agua en nuestro país.

En los últimos años se ha incrementado considerablemente el surgimiento de empresas purificadoras de agua logrando de esta manera la industrialización y comercialización de la misma. EL agua envasada tiene un alto consumo por la población, por lo cual se debe garantizar su inocuidad, y que cumpla con lo descrito en la etiqueta “agua purificada”.

En las revisiones bibliográficas consultadas encontramos que hasta el momento se ha realizado un estudio acerca de la calidad de este vital liquido y de los ensayos microbiológicos para asegurar el consumo adecuado, como el desarrollado por la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-LEON), sobre el diagnostico de la calidad del agua de consumo en las comunidades del sector rural de la ciudad de león, por un colectivo de profesionales entre ellos podemos mencionar Oscar González (Vicerrectoria de Investigación y Postgrado UNAN-LEON) y Lyli Orozco (Laboratorio de Microbiología de Agua Dpto. de Biología UNAN-LEON).

El propósito de realizar esta investigación será dejar en claro las cualidades microbiológicas que debe de tener el agua de consumo humano que es comercializada al público en general de la ciudad de León, que en este caso es el agua purificada (Envasada en botellas y bolsas) la cual debe de cumplir normas de salud establecidas por el ente regulador (MINISTERIO DE SALUD-MINSA) en aras de asegurar la salud de la población.



OBJETIVOS

Objetivo General

- Realizar el ensayo microbiológico al agua purificada de consumo humano que se comercializa ambulatoriamente tanto en bolsas y de botellas. León, 2008.

Objetivos Específicos

- Verificar la calidad microbiológica mediante la identificación de coliformes fecales y totales.
- Cuantificar Bacterias Aerobias Mesófilas en la muestras de agua purificada.
- Comprobar el cumplimiento de requisitos de empaque para agua envasada de consumo humano que determina el MINSA (nombre del producto, fecha de elaboración, fecha de vencimiento y su debido número de registro sanitario).



MARCO TEÓRICO



GENERALIDADES SOBRE EL AGUA

1.- ¿Qué es el agua?

El agua pura es un líquido inodoro e insípido. Tiene un matiz azul, que solo puede detectarse en capas de gran profundidad. A la presión atmosférica (760 mm de mercurio), el punto de congelación del agua es de 0° C y su punto de ebullición de 100° C. El agua alcanza su densidad máxima a una temperatura de 4° C y se expande al congelarse. Como muchos otros líquidos, el agua puede existir en estado sobre enfriado, es decir, que puede permanecer en estado líquido aunque su temperatura este por debajo de su punto de congelación; se puede enfriar fácilmente a unos -25° C sin que se congele.

El agua es fuente de vida, toda la vida depende del agua. El agua constituye el 70% de nuestro peso corporal. Necesitamos agua para respirar, para lubricar los ojos, para desintoxicar nuestros cuerpos y mantener constante su temperatura. Por eso, aunque un ser humano puede vivir por más de dos semanas sin comer, puede sobrevivir solamente tres o cuatro días sin tomar agua. Las plantas serian incapaces de producir su alimento de crecer sin el agua.

El agua por si misma es incolora y no tiene olor ni gusto definido. Si embargo, tiene unas cualidades especiales que la hacen muy importante, entre las que se destacan el hecho de que sea un regulador de temperatura en los seres vivos y en toda la biosfera, por su alta capacidad calórica (su temperatura no cambia tan rápido como la de otros líquidos).

2.-Propiedades bioquímicas (parámetros biológicos)

Los seres vivos se han adaptado para utilizar químicamente el agua en dos tipos de reacciones:

En la fotosíntesis en la que la enzimas utilizan el agua como fuente de átomos de hidrogeno.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



En las reacciones de hidrólisis, en que las enzimas hidrolíticas han explotado la capacidad del agua para romper determinados enlaces hasta degradar los compuestos orgánicos en otros más simples, durante los procesos digestivos.

En el agua viven de manera natural multitud de organismos. Lo que se intenta en las aguas de consumo público es la eliminación de aquellos microorganismos que pueden ser perjudiciales para la salud, los llamados microorganismos patógenos.

Por otro lado hay también muchos organismos que sirven como índice de calidad del estado de un agua.

3.-Propiedades organolépticas

El agua pura es incolora, inodora e insípida. No obstante, en el medio natural el agua dista mucho de ser pura y presenta unas propiedades específicas que afectan a los sentidos. Estas propiedades se denominan organolépticas y afectan al gusto, al olor, al aspecto y al tacto, distinguiéndose: temperatura, sabor, olor, color y turbidez.

La temperatura es una de las constantes físicas que adquiere gran importancia en el desarrollo de los fenómenos que ocurren en el agua, ya que puede determinar la variación de sus propiedades físicas, químicas o biológicas. Así, una variación de temperatura afecta a parámetros tales como la solubilidad de los gases en agua, tensión superficial, viscosidad, densidad, solubilidad de sales, etc.

La temperatura puede indicarnos el estado y los antecedentes de un agua residual o industrial. La temperatura normal de estas aguas es ligeramente superior a la de abastecimiento y, en algunos casos, como centrales nucleares o destilerías, muy superior, lo que origina alteraciones en los equilibrios ecológicos.

La eliminación o reducción del color se hace normalmente mediante coagulación, sedimentación y filtración. En algunos casos, también se emplean la cloración y el carbón activo. El color debe eliminarse en las aguas de bebida y en las de uso industrial. El color, a veces aumenta entre la planta de tratamiento y el



consumidor, debiéndose probablemente a la existencia de corrosiones en el sistema de distribución.

El olor y el sabor están relacionados desde el punto de vista fisiológico. Son muchas las fuentes de de olores y sabores en el agua, pudiendo clasificarse del siguiente modo: Fuentes naturales, compuestos orgánicos e inorgánicos y organismos acuáticos.

4.-Propiedades fisicoquímicas del agua

- **Acción disolvente.** El agua es el líquido que más sustancia disuelve (disolvente universal), esta propiedad se debe a su capacidad para formar puentes de hidrógeno con otras sustancias, ya que estas se disuelven cuando interactúan con las moléculas polares del agua. La capacidad disolvente es la responsable de dos funciones importantes para los seres vivos: es el medio en que transcurren la mayoría de las reacciones del metabolismo, y el aporte de nutrientes y la eliminación de desechos se realizan a través de sistemas de transportes acuosos.
- **Fuerza de cohesión entre sus moléculas.** Los puentes de hidrógeno mantienen a las moléculas fuertemente unidas, formando una estructura compacta que la convierte en un líquido casi incompresible.
- **Elevada fuerza de adhesión.** De nuevo los puentes de hidrógeno del agua son los responsables, al establecerse entre estos y otras moléculas polares, y es responsable, junto con la cohesión de la capilaridad, al cual se debe, en parte, la ascensión de la sabia bruta desde las raíces hasta las hojas.
- **Gran calor específico.** El agua absorbe grandes cantidades de calor que utiliza en romper los puentes de hidrógeno. Su temperatura desciende más lentamente que la de otros líquidos a medida que va liberando energía al



enfriarse. Esta propiedad permite al citoplasma acuoso servir de protección para las moléculas orgánicas en los cambios bruscos de temperatura.

- **Elevado calor de vaporización.** A 20° C se precisan 540 calorías para romper los puentes de hidrogeno establecido entre las moléculas del agua líquida y, posteriormente, para dotar a estas moléculas de la energía cinética suficiente para abandonar la fase líquida y pasar al estado de vapor.
- **Elevada constante dieléctrica.** Debido a que posee moléculas bipolares el agua es un gran medio disolvente de compuestos iónicos, como las sales minerales, y de compuestos covalentes polares como los glúcidos.

Las moléculas de agua, al ser polares, se disponen alrededor de los grupos polares de soluto, llegando a desdoblar los compuestos iónicos en aniones y cationes, que quedan así rodeados por moléculas de agua. Este fenómeno se llama solvatación iónica.

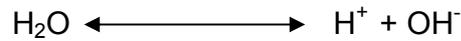
- **Bajo grado de ionización.** De cada 10⁷ moléculas de agua, solo una se encuentra ionizada. $H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + OH^-$. Esto explica que la concentración de iones hidronios (H_3O^+) y de los iones hidroxilos (OH^-) sea muy baja. Dado los bajos niveles de H_3O^+ y de OH^- , si al agua se le añade un ácido o una base, aunque sea en poca cantidad, estos niveles varían bruscamente.

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LAS SOLUCIONES ACUOSAS

El pH indica la medida de la concentración de los cationes hidronios, H⁺, libres en el agua. En función de las sustancias presentes y de su afinidad por los H⁺, el agua tendrá un pH u otro. El pH del agua en su estado natural de los ríos está entre 6,5 y 8.



El agua se auto ioniza según el equilibrio siguiente:



El producto de las concentraciones del ion H_3O^+ y del ion OH^- es constante, y se denomina producto iónico del agua, K_w .

a 25°C
$$K_w = [\text{H}^+] [\text{OH}^-] = 10 \times 10^{-14}$$

En una disolución neutra ambos iones tienen una concentración de 10^{-7} mol/l. Para evitar números demasiados pequeños Sorensen, un bioquímico danés ideó la escala del pH. Así, en una disolución neutra.

$$\text{pH} = \text{Log} [\text{H}^+] - \text{Log} [1 \times 10^{-7}] - 7$$

Por tanto tenemos que el pH oscila de 0 a 14, y que:

En disoluciones neutras $\text{pH}=7$

En disoluciones ácidas, $(\text{H}^+) > 10^{-7}$, luego $\text{pH} < 7$

En disoluciones básicas, $(\text{H}^+) < 10^{-7}$ luego $\text{pH} > 7$

El pH es importante ya que influye en los procesos de potabilización.

El potencial Redox únicamente se emplea cuando se quiere saber el estado de oxidación de las especies que contiene el agua. En análisis de agua no se suele emplear el potencial Redox pues para evaluar la calidad se utilizan otros parámetros indicadores. Únicamente se emplea cuando se quiere saber el estado de oxidación de las especies que contiene el agua.

AGUAS NATURALES

1.-Origen

Aguas superficiales: son en general dulces, poco mineralizadas y con abundante materia orgánica.



Aguas de pozo de perforación: suelen ser duras, ricas en calcio y en magnesio en especial, con gran cantidad de minerales y poca materia orgánica ya que las rocas hacen la función de filtro.

Aguas de arroyo: pueden contener plaguicidas, detergentes, hidrocarburos, etc., por la contaminación humana, principalmente por las aguas superficiales.

2.-Composición de las aguas naturales

Las aguas naturales comprenden:

Sales orgánicas disueltas, siendo las principales:

- Cationes: calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro.
- Aniones: bicarbonatos, cloruros, sulfatos, nitratos, silicatos.
- Sales orgánicas disueltas,
- Gases disueltos: oxígeno, dióxido de carbono,
- Partículas en suspensión,
- Materia orgánica,
- Materias coloidales,
- Microorganismos.

CLASIFICACIÓN DE LAS AGUAS

- **Aguas continentales superficiales**

La mayor parte del agua del planeta, que cubre el 72% de su superficie, se haya en los océanos. El resto se encuentra en los continentes en forma de grandes masas de hielo y nieve en los casquetes polares y en campos de hielo; en menor



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

proporción en lagos, ríos y capas del subsuelo y en forma de vapor en la atmosfera.

La siguiente tabla muestra la desigualdad de distribución del agua en la tierra:

Fuente	Porcentaje
Océanos	97,39%
Icebergs, glaciares	2,01%
Capas, humedad del suelo	0,58%
Lagos y ríos	0,02%
Atmosfera	0,001%

Aproximadamente el 2,6% del agua del planeta es agua no salada o "dulce" y de esta solo el 10% se encuentra en lagos, ríos y subsuelo que es prácticamente el agua disponible en los continentes. Por lo tanto, el agua dulce es un recurso sumamente escaso y desgraciadamente para muchas poblaciones su distribución en los continentes es muy heterogénea.

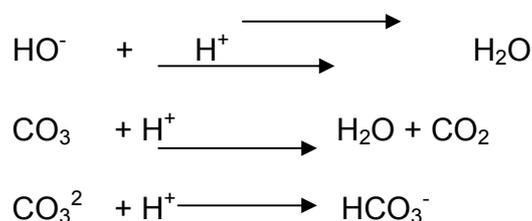
El agua dulce proviene de dos fuentes; el agua superficial que se origina en la precipitación que no se infiltra en el suelo y el agua subterránea que se infiltra.

El agua superficial es captada y llevada a través de las cuencas hidrológicas hacia los cuerpos de agua superficial. El agua subterránea o freática, ocupa todos los poros del subsuelo, dando lugar a una zona de saturación. Bajo esta zona hay un estrato rocoso impermeable. El transporte de agua en el subsuelo se realiza a través de napas o acuíferos, que son conductos saturados de agua a través de los cuales esta escurre lentamente por gravedad. Los acuíferos se recargan naturalmente por precipitación infiltrada en el suelo.

La alcalinidad, que es la capacidad de aceptar protones, es importante en las reacciones en los medios geológicos y biológicos rodeados por el agua. Las aguas con elevada alcalinidad tienen pH elevados y generalmente contienen gran



cantidad de sólidos disueltos. Las principales especies químicas responsables de la alcalinidad son los aniones hidroxilo, bicarbonato y carbonato:



2.-Aguas de ríos

Aquellas áreas de la superficie que captan el agua que escurre y la conducen hasta los sitios donde se almacenan, cuerpos de agua, se denominan cuencas hidrológicas.

A los cuerpos de agua tales como lagos, lagunas o embalses, el agua de escurrimiento llega tanto por la misma superficie como por los ríos.

La composición de las aguas de los ríos esta condicionada, principalmente pero no exclusivamente, por los aportes de sustancias que entrega el cauce.

Propiedades químicas de aguas fluviales duras y blandas

Componente	Aguas calcáreas	Aguas ígneas (blandas)
STD	Muchos	Pocos
PH	7 – 9	6 – 8
Cationes	Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺
Aniones	HCO ₃ ⁻	HCO ₃ ⁻ , HSiO ₃ ⁻
Sólidos Suspendidos	Ninguno	Arcillas



3.-Aguas de lagos

La mayoría de los lagos reciben sus aguas de los ríos, lluvias y subsuelo. La composición química del agua de los lagos no solo se debe al tipo de agua que los alimenta, sino que también a los cambios de composición que ocurre durante el periodo de residencia del agua, tiempo en el cual se puede producir la decantación de sólidos suspendidos, la aglomeración de partículas finas de carácter orgánico y otros fenómenos. Debido a que los lagos suelen ser mas profundos que los ríos, se hace mas difícil la restitución del oxígeno disuelto desde la atmosfera.

4.-Agua estancada

El agua transportada la materia de tres modos: por arrastre, por suspensión o por disolución. Como materias en suspensión se denomina a las partículas insolubles presentes en el agua. Las partículas que están en suspensión según su tamaño pueden formar suspensiones estables, llamadas soluciones coloidales, o bien, estar en suspensión solo cuando el agua esta en movimiento. Se pueden determinar filtrando un volumen determinado de agua y pesando lo que queda en el filtro. Por otro lado, la turbidez es un fenómeno óptico producido por partículas en suspensión que absorben la luz que inciden sobre el agua.

El agua pura tiene una conductividad eléctrica muy débil mientras que el agua natural será mas conductora cuanta mayor cantidad de cationes y aniones tenga disueltos hasta llegar a una cantidad limite en la que por más que aumenta la conductividad no varia. El valor de la conductividad varia con la temperatura de tal modo que al subir la temperatura la conductividad aumenta.

5.-Agua de pozo

Es el agua extraída de una fuente de formación de rocas.

6.-Agua destilada



Es el agua purificada que ha sido evaporada y luego condensada en la cual se eliminan materiales tóxicos e inorgánicos rechazados por nuestras células y tejidos del cuerpo.

7.-Agua purificada

Se distingue por un sabor marcadamente distinto limpio debido a que los contaminantes, los sólidos y el cloro son reducidos significativamente en el proceso de purificación.

TRATAMIENTOS PARA POTABILIZAR LAS AGUAS NATURALES

El agua natural puede someterse a diferentes tratamientos que van desde un simple bombeo hasta toda una cadena compleja en la que las etapas principales son:

- El pre tratamiento que consiste en filtrado, desarenado y sedimentación de lodos.
- La pre-cloración para impedir que se forme plancton y ciertas bacterias en las tuberías.
- La coagulación que consiste en coagular los coloides por neutralización de sus cargas eléctricas. Los principales coagulantes son a base de aluminio (sulfato de aluminio, polímeros de aluminio) o de hierro (sulfato y cloruro férrico).
- La floculación que consiste en formar un precipitado aglomerando las partículas neutralizadas por coagulación permite la clarificación. Los principales coagulantes son la sílice activada y los alginatos.
- La decantación cuya finalidad es permitir el depósito de partículas en suspensión en el agua mediante el uso del lodo.



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

- La filtración sobre arena que permite eliminar los precipitados formados por decantación.
- La desinfección por acción de diferentes productos: cloro, dióxido de carbono, ozono y rayos ultravioleta.
- La filtración sobre carbón activado que garantiza la eliminación de la mayor parte de los contaminantes y micro contaminantes orgánicos, reduce al mínimo la concentración de metales pesados y elimina el cloro del agua.

Particularidades de la potabilización del agua

Clarificación: La clarificación elimina la materia orgánica, turbidez y color del agua. Incluye esta operación a la coagulación, sedimentación y filtración.



Coagulación: Mediante esta operación se separan del agua las finísimas partículas que originan turbidez y color.

El coagulante casi universalmente utilizado es Sulfato de Aluminio. Mediante la adición de cantidades conocidas de una solución de esa sal, puede calcularse la cantidad necesaria para coagular las partículas en suspensión en una gran pileta.

Sedimentación: Cuando no es necesario utilizar coagulantes, se deja reposar el agua y por acción de la gravedad sedimenta en el fondo del recipiente todas las partículas en suspensión.

Decantación: Una vez logrado el coágulo por la adición de Sulfato de Aluminio, esta es la etapa siguiente. Un decantador consiste en un recipiente generalmente rectangular con un volumen suficiente como para permitir que el agua permanezca el tiempo necesario para que los coágulos se depositen en el fondo, formando lo que comúnmente se denominan barros. Posteriormente el agua limpia se elimina por la parte superior del recipiente.

Filtración: Al igual que en la operación de laboratorios, la filtración en gran escala consiste en separar un sólido de un líquido por un método físico.



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

El agua limpia conserva aun algunos materiales en suspensión y es necesario filtrarla para producir una clarificación completa.

Filtro lento de arena: este sistema, fue el primero en utilizar a gran escala. Consiste en un lecho de arena que descansa sobre uno de grava. El agua ingresa por la parte superior y se filtra lentamente por la arena fina, operación que se acelera cuando llega a la grava, por la que atraviesa más rápidamente.

Desinfección: Aunque la carga microbiana puede haber quedado retenida en el filtro de arena fina, es necesario desinfectar el agua.

A partir de la cloración de las aguas, se han podido controlar la mayoría de las enfermedades de transmisión hídrica como el cólera y las disenterías bacterianas.

El desinfectante utilizado casi universalmente es el gas Cloro, pudiéndose utilizar también el método de la ozonación.



PROCESO DE POTABILIZACION DEL AGUA EN NICARAGUA

La medida de la concentración de Cloro activo residual en el final de la línea de provisión (grifo domiciliario), garantiza la correcta desinfección del agua. El ministerio de salud (**MINSA**) estipula un mínimo de 0,30-0,60 mg/L (o ppm) de Cloro.

Clasificación y designación de las aguas envasadas destinadas para el consumo humano

1. Agua purificada
2. Agua fluorada
3. Agua de manantial
4. Agua mineral
5. Agua desmineralizada

Consideraciones Generales

- La fuente de abastecimiento de agua debe estar autorizada por la autoridad sanitaria correspondiente.



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

- El lavado y desinfección de envases deberá realizarse con soluciones sanitizantes que no alteren las características del producto y evitando la contaminación por el arrastre de las mismas.
- Las plantas purificadoras de agua deben estar diseñadas y establecidas en instalaciones que permitan cumplir correctamente con el Reglamento Técnico Unión Aduanera Centroamericana de Buenas Prácticas de Manufactura.
- Los medios de transporte, recipientes, tuberías y tanques deberán construirse de manera que:
 - No contaminen el agua destinadas al envasado
 - Pueden lavarse y desinfectarse eficazmente
 - Proporcione una protección eficaz contra la contaminación, incluidos el polvo, humos
- Las instalaciones tendrán un abundante suministro de agua potable para la limpieza y desinfección. El agua deberá conducirse por tuberías completamente separadas del agua de operaciones para imposibilitar la contaminación del producto con tuberías distintas o con válvulas para prevenir el flujo inverso.
- La planta deberá tener sistema e instalaciones adecuados de desagüe y eliminación de desechos. Estarán diseñadas, construidas y mantenidas de manera que se evite el riesgo de contaminación del agua.



EL AGUA EMBOTELLADA NO SIEMPRE ES MEJOR QUE LA DEL GRIFO

Respecto a la seguridad sanitaria del agua envasada respecto a la de la red de abastecimiento por tuberías, puede indicarse que si bien el agua del grifo puede estar contaminada por distintos elementos químicos, físicos y microbiológicos, es más fácil de controlar en los sistemas de distribución y de reducir el riesgo de toda la población que cuando algunas sustancias están presentes en las botellas. El agua en las botellas se almacena durante periodos de tiempos más largos y a mayores temperaturas que en el caso de las instalaciones de un sistema de abastecimiento, lo cual puede favorecer el crecimiento de algunos microorganismos.

Hay una gran variedad de marcas de agua embotellada y muchos consumidores la compran, pensando que su calidad es mucho mejor que la del agua que pueden obtener del grifo. Esta clase de agua cuesta más y, en ocasiones, puede estar contaminada. El riesgo de enfermedad por contaminantes en el agua es relativamente pequeño para la mayoría de los consumidores, pero es mayor para quienes, por su edad o condición física, son más susceptibles a enfermarse.

El agua embotellada es mucho más costosa que el agua municipal. "En ocasiones el agua embotellada está más contaminada que el agua regular". "Un nombre original y una etiqueta atractiva no garantizan que el agua sea pura".

Legalmente, el agua embotellada puede contener cierta cantidad de la bacteria *E. coli* u otra bacteria fecal, a diferencia del agua municipal. Otras diferencias se encuentran en el tratamiento y pruebas que se realizan en ambos tipos de agua. Los distribuidores de agua municipal deben tratar el agua para matar patógenos, cosa que no se requiere a los embotelladores de agua. Los niveles de bacteria en el agua municipal se miden cientos de veces al mes; en el agua embotellada, sólo una vez a la semana. Los distribuidores de agua municipal hacen pruebas



trimestrales para ver el contenido de sustancias químicas sintéticas; los de agua embotellada, sólo una vez al año.

En la mayoría de los adultos, la mayoría de los contaminantes microbianos que se encuentran en el agua pueden causar sólo problemas de salud pasaderos. Si provocan alguna enfermedad microbiana, tiende a durar un día o dos y, por sus síntomas, muchos la consideran "influenza estomacal".

Los bebés, las mujeres embarazadas y lactantes, las personas mayores o que toman medicamentos que suprimen el sistema inmunológico o quienes tienen limitado el funcionamiento de este sistema por enfermedad corren un riesgo mayor.

No es necesario tomar una actitud alarmista, pero se cree que los consumidores deben comprender el riesgo. No hay manera de eliminar los microorganismos del agua a menos que se hierva y, sin realizar pruebas costosas no hay manera de asegurarse de que el agua se encuentra libre de sustancias químicas posiblemente dañinas.

Requisitos Sanitarios de las plantas y Proceso de las Envasadoras de Agua

1. La planta deberá ser construida de manera tal que los pisos, paredes y techos puedan ser limpiados adecuadamente y mantenidos en buenas condiciones sanitarias.
2. La planta deberá contar con espacio suficiente para almacenamiento de equipos, envases y otros materiales, así como también deben estar alejados de las paredes.
3. La planta debe ser ventilada para minimizar los olores, gases o vapores tóxicos y condensación en el procesamiento, embotellamiento y en los recintos para el lavado y el saneamiento de recipientes, impidiendo la entrada de humo, polvo, vapores u otros.
4. Con iluminación adecuada, protegidas sobre las áreas de procesamiento.

El alumbrado no deberá alterar los colores.



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

5. La planta deberá tener mallas milimétricas de manera tal que impida la entrada de animales, insectos, roedores y/o plagas.
6. Las instalaciones para lavarse las manos, deberán disponer de medios adecuados y en buen estado para lavarse y secarse las manos higiénicamente, con lavamanos y abastecimientos de aguas calientes y/o frías (o con la temperatura debidamente controlada).
7. Los vestidores y comedor para los trabajadores se ubicaran separados de las operaciones de la planta y áreas de almacenamiento.
8. El llenado, tapado, cerrado, sellado y empacado de los envases deben ser hechos de manera higiénica para no producir contaminación del agua envasada.
9. Los tanques de almacenamiento deben estar provistos de tapas para evitar la introducción de cualquier materia extraña. Las conexiones hacia las tuberías deberán estar provistas de filtros fácilmente limpiables o reemplazables.
10. La limpieza y sanitización de los utensilios y equipos deberán ser conducidos de tal manera que protejan contra la contaminación del agua, superficies de contacto o material de empaque.
11. Se usaran envases y tapones no tóxicos. Todos los depósitos y tapones deben ser inspeccionados para asegurarse de que están libres de contaminación.
12. Efectuar monitoreos de llenado, tapados y sellados por inspección visual o electrónica de los recipientes.
13. La planta debe registrar y mantener la información en cuanto a producto, volumen de producción de lote y distribución del producto terminado, para asegurarse que la producción de agua envasada esta conforme a las especificaciones de calidad descrito en la presente norma.
14. No deberá depositarse ropa, ni objetos personales en la zona de procesamiento.
15. Efectuar monitoreos de la calidad del agua envasadas después del procesamiento y antes del embotellamiento, para asegurar la uniformidad y



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

efectividad del proceso de tratamiento de acuerdo a los métodos establecidos en la norma (NTON 03 040 03).

16. Todos los recipientes defectuosos o no higiénicos deberán ser descartados.
17. Los recipientes utilizados como envase primario deberán ser lavados, saneados e inspeccionados antes de comenzar a ser llenados, tapados y sellados.
18. El personal que labora en las plantas envasadoras de agua deberá cumplir con la NTON 03 026-99 Norma Sanitaria de Manipulación de Alimentos. Requisitos para Manipuladores.

PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Generalidades:

La presencia de coliformes totales y fecales en el agua es signo determinante de contaminación la cual resulta un inconveniente en el procesamiento ya que al proliferar, podría causar intoxicaciones. Este método permite conocer la calidad sanitaria del agua a través de medios de cultivos.

Normas que fijan la calidad de las aguas potables (purificadas)

Las normas de potabilización de las aguas en vigor son múltiples en el mundo y sus niveles de referencia son sensiblemente diferentes. Como ejemplo se puede citar:

- Norma técnica obligatoria nicaragüense.

Organismos coliformes (total de coliformes)

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Desde hace tiempo se reconoce que los organismos del grupo coliformes son un buen indicador microbiano de la calidad del agua de bebida. Se denominan organismos coliformes las bacterias Gram negativo, en forma de bastoncillos, que pueden formarse en presencia de sales biliares u otros agentes tensioactivos con propiedades de inhibición del desarrollo similares y fermentan la lactosa a 35 – 37°C produciendo ácido, gas y aldehídos en el plazo de 24 – 48h. Son también oxidadas Gram negativas y no forman esporas.

Tradicionalmente se consideraba que las bacterias coliformes pertenecían a los géneros *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*. No obstante, el grupo es heterogéneo comprende bacterias que fermentan la lactosa como *Enterobacter cloacae* que pueden hallarse tanto en las heces como en el medio ambiente (aguas ricas en nutrientes, suelos, materias vegetales en descomposición) y también en el agua de bebida con concentraciones de nutrientes relativamente elevadas y comprende especies que nunca o casi nunca se encuentra en las heces y que pueden multiplicarse en agua potable de calidad relativamente buena.

Calidad bacteriológica

El agua destinada a la bebida no debe transmitir patógenos. Como el indicador bacteriano mas numeroso y específico de la contaminación fecal, tanto de origen humano como animal, es *Escherichia coli* en las muestras de 100 ml de cualquier agua de bebida no se debe detectar esa bacteria ni organismos coliformes termo resistente.

PARAMETROS BACTERIOLOGICOS Y ORGANOLEPTICOS DEL AGUA ENVASADA

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Parámetros Bacteriológicos

Origen	Parámetro	Valor recomendado	Valor máximo admisible	observaciones
A. Todo tipo de agua de bebida	Coliforme fecal	Neg	Neg	
B. Agua que entra en el sistema de distribución	Coliforme fecal	Neg	Neg	
	Coliforme total	Neg	≤4	En muestras no consecutivas
C. Agua en el sistema de distribución	Coliforme total	Neg	≤4	En muestras puntuales No debe ser detectado en el 95% de las muestras anuales
	Coliforme fecal	Neg	Neg	

Parámetros organolépticos

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Parámetro	Unidad	Valor recomendado	Valor máximo admisible
Color verdadero	mg/L (Pt-Co)	1	15
Turbiedad	UNT	1	5
Olor	Factor dilución	0	2 a 12 °C 3 a 25 °C
Sabor	Factor dilución	0	2 a 12 °C 3 a 25 °C

Envase y Etiquetado

El producto objeto de esta norma se debe envasar en recipientes de tipo sanitario, elaborado con materiales inocuos, que no transmitan ninguna sustancia toxica, ni olores ni sabores desagradables, que tengan tapa inviolable, sello o banda de garantía y resistente a distintas etapas del proceso, de tal manera que no reaccionen con el producto o alteren sus características físicas, químicas y organolépticas.

Cuando se utilicen para el envasado de agua bolsas u otras formas no rígidas (envase flexible) estos deben ser de material virgen, de color blanco lechoso, de alta o baja densidad, su densidad será entre 0.91 y 0.96 g/cm³. Por ejemplo el Polietileno, PEBD admite fácilmente el termo sellado. Este material no debe liberar olores desagradables. No debe reaccionar con el producto o alterar con sus características físicas, químicas y organolépticas.

Se debe cumplir con la Norma de Etiquetado para alimentos pre envasados NTON 03 021-99 Norma de etiquetado de alimentos pre envasados para consumo humano.

Almacenamiento y Transporte

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Las condiciones de almacenamiento y transportación deberán cumplir con las normas higiénicas sanitarias vigentes.

NMP

Investigación y recuento en medio líquido

Para la detección de Enterobacteriaceae lactosa-positivas (coliformes), se aprovechan ciertas características que la diferencian de otras Enterobacteriaceae como por ejemplo, su capacidad para fomentar la lactosa con producción de ácido y gas en presencia de sales biliares.

Material:

- Tubos de ensayo de 16×160 mm
- Gradillas
- Pipetas estériles de 10 y 1ml
- Estufa de cultivo

Medio de cultivo:

Caldo lactosado biliado verde brillante (brilliant green bile lactose: BGBL)

Composición:

- | | |
|-------------------|----------|
| • Lactosa | 10g |
| • Bilis de buey | 20g |
| • Verde brillante | 0,0133g |
| • Agua destilada | 1,000 ml |



Disolver. Ajustar el pH a 7.4. Distribuir en tubos de ensayo con campana

Durham a razón de 121 °C durante 20 minutos.

Fase presuntiva

Técnica: se preparan en una gradilla tres series de tres tubos cada uno, cada tubo contendrá 10 ml de BGBL. En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1ml de la dilución de la muestra al 1:10.

En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1ml de la dilución de la muestra al 1:100.

En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1ml de la dilución de la muestra al 1:1000.

Incubar las tres series a $31 \pm 1^\circ\text{C}$, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas.

La reacción es positiva cuando se produce desprendimiento de gas en la campana Durham, por lo menos 1/10 parte de su volumen, como consecuencia de la fermentación de la lactosa con formación de ácido y gas en presencia de sales biliares a una temperatura comprendida entre 30-37 °C.

Interpretación: la aparición de gas o ácido en los tubos a las 48 ± 3 horas, constituye una presunta reacción positiva. Los tubos con este tipo de reacción deben ser estudiados en la fase confirmativa.

La ausencia de crecimiento ácido o de formación de gas al finalizar las 48 ± 3 horas de incubación indica una reacción negativa. El límite arbitrario de 48 horas para la observación excluye sin ninguna duda a los miembros ocasionales del grupo Coliforme que crecen de manera muy lenta.



Fase confirmatoria

Procedimiento: llévese a la fase de confirmación todos los tubos primarios en los que haya aparecido cualquier cantidad de gas o de crecimiento ácido a las 24 horas de incubación. Si se observa una fermentación activa o un crecimiento ácido antes de las 24 horas, los tubos llevarán el medio de confirmación sin esperar a que transcurran las 24 horas. Si hay otros tubos primarios con crecimiento ácido después de 48 horas de incubación también se llevarán a la fase confirmativa.

Agitar suavemente los tubos primarios que muestren gas o crecimiento ácido suficiente para que se produzca una resuspensión de los microorganismos. Con un asa estéril de 3mm de diámetro, pásese un asa completa de cultivo al tubo de fermentación que contiene el medio verde brillante de lactosa bilis o introdúzcase un aplicador de madera estéril en el cultivo, de al menos 2,5cm, retírese rápidamente e introdúzcase hasta el fondo en el tubo de fermentación con el medio mencionado. Retírese rápidamente y deséchese el aplicador. Repítase esta operación en todos los tubos posiblemente positivos.

Incúbese el medio verde brillante de lactosa bilis a $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 3 horas.

La formación de cualquier cantidad de gas en el vial invertido en el medio de fermentación verde brillante de lactosa bilis a las 48 ± 3 horas constituye un resultado positivo en la fase confirmatoria. Calcúlese el valor del NMP a partir del número de tubos positivos.



Procedimiento alternativo: utilícese únicamente en aguas contaminadas o residuales que se sepa presenten sistemáticamente resultados positivos.

En caso de que todos los tubos sean positivos en dos o mas diluciones consecutivas durante 24 horas, llévase solo a la fase confirmatoria aquellos con diluciones mas altas (menor muestra de inculo) y todos los que presenten gas o crecimiento acido después de las 48 horas.

Pruebas para Coliformes Fecales (medio EC)

La prueba para coliformes fecales permite diferenciar entre los coliformes de origen fecal (intestino de los animales de sangre caliente) y los procedentes de otras fuentes.

a) Medio EC:

Triptosa o trípticasa	20,0 g
Lactosa	5,0 g
Mezcla de sales biliares o sales biliares nº 3	1,5 g
Fosfato de hidrogeno dipotasico, $K_2 HPO_4$	4,0 g



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Fosfato de hidrogeno potásico, $K_2 HPO_4$	1,5 g
Cloruro de sodio, NaCl	5,0 g
Agua destilada	1 L

Añádase los ingredientes deshidratados al agua, mézclense cuidadosamente caliéntese para disolverlos.

El pH debe ser de $6,9 \pm 0,2$ después de la esterilización. Antes de esterilizar, colóquese la mezcla en los tubos de fermentación, cada uno con un vial invertido y con una cantidad de medio suficiente para que cubra al menos parcialmente al vial después de la esterilización.

Ciérrense los tubos con tapones de metal o de plástico resistente al calor.

b) Procedimiento: estúdiense todos los tubos de fermentación presuntivos que hayan mostrado alguna cantidad de gas o un fuerte crecimiento en la prueba de confirmación.

1) Agítese suavemente o gírense los tubos de fermentación que muestran gas o un fuerte crecimiento. Con un asa estéril de metal de 3mm de diámetro o un aplicador de madera estéril, pásese el cultivo de cada tubo de fermentación al medio EC.



2) Incúbese los tubos con medio EC inoculados en un baño de agua $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.

Depositense todos los tubos con EC en un baño de agua antes de que transcurran 30 min de la inoculación y manténgase a una profundidad suficiente como para que el agua del baño este a un nivel superior al que tiene el medio en los tubos.

- c) Interpretación: se considera como reacción positiva la aparición de gas en un medio EC a las 24 horas o menos de incubación. La falta de gas (a veces se produce crecimiento) constituye un resultado negativo, que indica que el origen de los microorganismos no es el aparato digestivo de los animales de sangre caliente.

Análisis microbiológico de rutina

Los procedimientos para la detección y enumeración rutinaria de los coliformes y otros microorganismos indicadores están cuidadosamente prescritas por la American Public Health Association (Asociación de Salud Publica) y sociedades afiliadas, y son puestas diariamente en practica.

1. Recuento de una placa estándar: Prueba ideada para enumerar la población viable "total" y no para detectar los microorganismos o patógenos que puedan estar presentes. El procedimiento se emplea



como guía para determinar la eficiencia del tratamiento. Se acepta generalmente que el agua correctamente tratada debe contener menos de 100 colonias por ml.

2. Prueba para Coliformes: Una serie de pruebas, la de presunción, la de confirmación y la terminada, se llevan a cabo en su orden sistemático y de acuerdo con los resultados de cada paso.
3. Enumeración de los coliformes: la prueba de presunción se puede utilizar para estimar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra determinada.

Enumeración por el procedimiento del número más probable (NMP). Se inoculan múltiples tubos que contienen caldo de lauril-triptosa con volúmenes diferentes de la muestra (por ejemplo 5 tubos con 10 ml, 5 tubos con 1 ml y 5 tubos con 0.1 ml).

Si se conoce el número de tubos positivos y negativos en cada dilución, es posible calcular el número más probable de coliformes presentes en un volumen dado de agua.

La combinación de los números de tubos positivos y negativos proporciona un índice de la solución que habitualmente se expresa como el "número más probable (NMP) de bacterias coliformes por 100ml de muestra". La cantidad de microorganismos presentes no es absoluta, es decir, el índice representa el número de coliformes que más frecuentemente que cualquier otro número, dará el resultado abordado en la tabla.



Aplicación al agua no contaminada

A continuación se describe el procedimiento aplicable para analizar agua relativamente exenta de contaminación, como el agua tratada de las centrales depuradoras.

- A) Destapar el frasco de la muestra.
- B) Con el tapón en posición, agitar energéticamente el frasco para conseguir una dispersión homogénea de las bacterias. (Si el frasco esta completamente lleno, retirar el tapón y tirar unos 20-30 ml de agua; después, volver a tapar y agitar. De esta manera se asegura una mezcla homogénea).
- C) Con una pipeta estéril de 10ml, inocular 10ml de la muestra en cada uno de cinco tubos que contengan 10ml de caldo presunto (doble potencia). Anadir 50ml de caldo presunto. Se aconseja agitar suavemente los tubos para distribuir uniformemente la muestra por todo el medio.
- D) Incubar los tubos a 35 °C o 37 °C durante 24 horas.
- E) Al final del periodo de incubación de 24 horas, examinar cada tubo para comprobar la posible presencia de gas. Si esta presente el gas puede verse en el tubo de Durham; si no se ve gas, agitar suavemente el tubo; si se observa alguna efervescencia (pequeñas burbujas), el tubo debe considerarse positivo.
- F) En un cuadro como el que se presenta aquí, anotar el número de tubos positivos a las 24 horas.



- G) Volver a incubar los tubos negativos durante otro periodo de 24 horas. Al final de este periodo, observar de nuevo los tubos en busca de la posible presencia de gas, como en el apartado.
- H) Se presume que la producción de gas después de 24 o 48 horas de incubación se debe a la presencia de coliformes en la muestra.
- I) Anotar el número de tubos positivos después de 48 horas.
- J) Para confirmar la presencia de coliformes termo tolerantes, incubar los tubos de subcultivo procedente de cada tubo presuntamente positivo durante 24 horas a $44\pm 0.5^{\circ}\text{C}$.
- K) Después de las 24 horas de incubación, examinar cada tubo de caldo para observar si hay crecimiento y presencia de gas en el tubo de Durham. Anotar los resultados en el cuadro.
- L) Añadir a cada tubo de agua de triptona aproximadamente 0.1 ml de reactivo de Kovacs y mezclar suavemente. La presencia de indol viene indicada por un color rojo en el reactivo de Kovacs, formando una película sobre la fase acuosa del medio.
- M) Las pruebas confirmatorias positivas para el indol, el crecimiento y la producción de gas muestran la presencia de E.coli. El crecimiento y la producción de gas en presencia de indol confirman la presencia de coliformes termos tolerantes.

DISEÑO METODOLOGICO

Tipo de estudio: experimental.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Universo: Bolsa y botellas de agua purificada de consumo humano comercializada en la ciudad de León para un total de 3 marcas de agua en bolsa y 4 marcas de agua en botella

Área de estudio: El presente trabajo fue desarrollado en el laboratorio de control de calidad microbiológica de la carrera de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas.

Muestra: 5 bolsas por marca y 5 botellas por marca, de agua comercializadas de las de mayor demanda en el departamento de León ; para lo cual se tomo un total de 7 marcas A,B,C,D,E, F, G, respectivamente correspondiendo 4 marcas para botella y 3 marcas para bolsas..

Para su determinación utilizamos un tipo de muestreo no probabilístico, a conveniencia del investigador.

Criterios de Selección: Accesibilidad geográfica, marcas reconocidas y frecuencia en el comercio.

Unidad de análisis: cada botella y cada bolsa.

Variables: En el caso de nuestra investigación el factor a determinar y estudiar será la identificación de coliformes fecales y totales, Bacterias Aerobias Mesofilas y las normas de etiquetado en el agua purificada de libre comercialización.

MATERIALES Y EQUIPO

En el desarrollo de la parte experimental se utilizo el siguiente equipo de laboratorio.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

- Cristalería
- Cocina

- Incubadora

- Balanza

- Autoclave

- Horno

- Mechero

Equipo metálico:

- Espátula
- Gradillas metálicas

Material de laboratorio descartable:

- Algodón
- Papel de aluminio

- Guantes

- Boquillas



- Zapatos quirúrgicos
- Gorros quirúrgicos

Reactivos:

- Caldo lactosado
- Caldo tripti caseína soja
- Agar verde brillante
- Caldo E. coli

PROCEDIMIENTO

Para iniciar nuestro ensayo hicimos uso de las referencias bibliográficas para constatar si existía algún estudio sobre el análisis de agua purificada realizada en nuestro país por parte de alguna organización a fin a la salud, encontrando solo un estudio relacionado a esta investigación.

1. Recolección de la muestra: para realizar este proceso iniciamos seleccionando las marcas de agua purificada de mayor consumo en la población correspondiendo a 3 marcas de bolsa y 4 de botella, las que fueron compradas y recolectadas por los investigadores en los puntos de mayor venta de las mismas; que en el caso de las marcas correspondiente a botellas fue el supermercado, mientras tanto las de bolsa fueron tomadas de tres diferentes puntos: terminal de buses, mercado la estación y mercado central. Después de recolectar las muestras se procedió a la verificación de las especificaciones de etiquetado para cada muestra.



2. Preparación de medios de cultivo: El medio utilizado fue el caldo de Lauril – Triptosa preparándose a dos concentraciones diferentes tanto simple como doble, realizándose los cálculos respectivos para cada uno de ellos pesando para la primera concentración 3.25 g y para la segunda 6.40 g. Luego de esto se transfirió cada concentración a un distinto erlenmeyer de 250 ml, añadiéndole 20 ml de agua destilada para disolver el caldo con ayuda de agitación para después aforar hasta 250ml. Después se transfirió el caldo a los tubos de ensayos de cada muestra, para la concentración doble 1:10 se tomaron tres tubos añadiéndole 10 ml de caldo y para la concentración simple 1:100 y 1:1000 correspondiendo a tres tubos para cada una se añadió 5 ml a cada tubo; procediendo después a esterilización del medio por medio de autoclave en calor húmedo a 121 °C de 15-20 minutos.

3. Esterilización de materiales: Los materiales a esterilizar fueron las gabachas, guantes, boquillas, gorros, pipetas de 5, 10 ml, erlenmeyer de 250 ml y placas petri. Para dicha esterilización se utilizo la autoclave a 121° C por 15min.

4. Técnica: realizamos el análisis en el área estéril.

4.1 Se lavaron las bolsas con agua destilada, luego se desinfectaron las muestras limpiando las roscas de las botellas y las orillas de las bolsas con un trozo de algodón empapado de alcohol al 70%. Para obtener la muestra de las bolsas se utilizo una tijera pequeña estéril.

4.2 Fase Presuntiva:

El método a utilizar fue el NMP, se crea un pool esto se realiza vertiendo una cantidad representativa (aprox. 50%) de 4 de las 5 unidades de cada muestra en un erlenmeyer de 250 ml, luego se descartan 150ml del mismo hasta obtener 100ml que es la solución de trabajo. La unidad restante se utiliza como muestra de referencia, del pool se tomaron 10 ml los que se agregaron a la tubos con concentración 1:10, 1ml a los tubos con concentración 1:100 y 0.1ml a los tubos de concentración 1:1000, luego se transfirió 1ml de la solución a las placas petri que contienen Agar tripti caseína soja. Se incubaron las muestras por 48 horas a

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



una temperatura de 37°C. Pasado el tiempo de incubación en las placas petri se observa la formación de colonias y se realiza el recuento de las mismas. En los tubos si presentan gas en la campana Durham, se presume presencia de coliformes y se realiza la fase confirmativa.

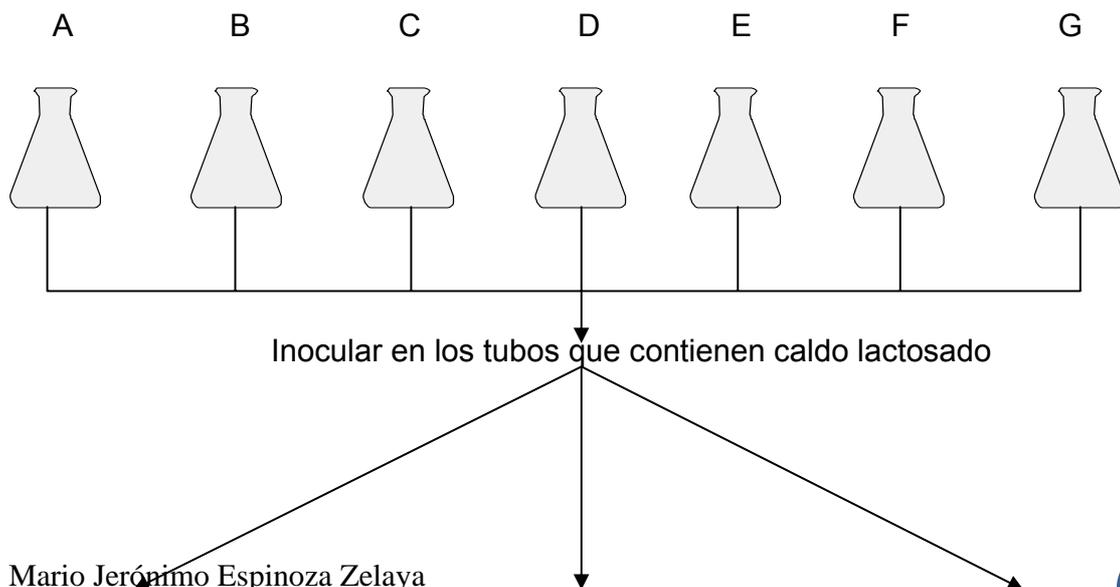
4.3 Fase Confirmativa:

Se procedió a la realización de la fase confirmativa, preparando los medios selectivos como es el agar *verde brillante* para detectar coliformes totales y caldo *E. Coli* para coliformes fecales.

Después con ayuda de pipetas de 1 ml transferimos 0.1 ml de la muestra que contienen gas: A, B, y G, a los tubos conteniendo *agar verde brillante* y *caldo E. Coli*. Finalmente se incubo en baño María el caldo *E. Coli* a 45 °C por 48 horas y el agar verde brillante en incubadora a 37°C por 48 horas. Al cumplirse el tiempo de incubación se procedió a la lectura de resultados.

ESQUEMATIZACION DE PROCEDIMIENTO

Con cada una de las siete muestras realizar un pool.



Mario Jerónimo Espinoza Zelaya
Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

10ml del pool en los tubos con concentración 1:10

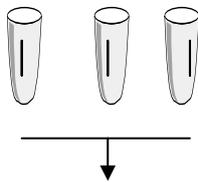
1ml del pool en los tubos con concentración 1:100

0.1ml del pool en los tubos con concentración

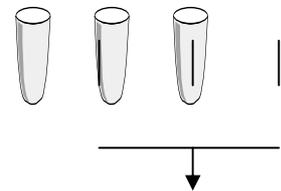
Todos estos se incuban a una temperatura de 37 °C por 48 horas.

- ❖ Si al momento de lectura de resultados, a los tubos que presentan formación de Gas se realizara la fase confirmativa.

Fase Confirmativa



Agar verde brillante



Caldo E.coli Se

Esta fase se realiza inoculando 0.1ml de los tubos que presentaron formación de Gas, en Agar verde brillante para detectar coliformes Totales este se incuba en horno 37 °C por 48 hrs y Caldo E.coli para detectar coliformes Fecales en baño María 45 °C por 48hrs .

RESULTADOS

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



TABLA N° 1

Comprobación de especificaciones de etiquetado.

Muestras	Nombre del producto	Fecha de elaboración	Fecha de vencimiento	Numero de registro sanitario
A	+	+	+	+
B	+	+	+	+
C	+	+	+	+
D	+	+	+	+
E	+	+	+	+
F	+	+	+	+
G	+	+	+	+

+: Cumple

TABLA N° 2

Fase Presuntiva

Muestras de bolsas	Concentración doble 1:10			Concentración simple					
				1:100			1:1000		
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
A	G/+	G/+	G/+	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-
B	G/-	G/-	G/-	G/+	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-
C	G/-	G/-	G/-	G/+	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Muestras de botella	Concentración doble 1:10			Concentración simple					
	1:10			1:100			1:1000		
D	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3
	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-
E	G/-	G/-	G/-	G/+	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-
F	G/-	G/-	G/-	G/+	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-
G	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/-	G/+	G/-	G/-

G: gas +: presencia -: ausencia

TABLA N°3

Fase confirmativa

Detección de coliformes Totales y Fecales en agua purificada.

Tipo de análisis: Numero mas probable (NMP)

Muestras	C.T	C.F	BAM
A	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml
B	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml
C	Ausencia	Ausencia	<10 UFC/ ml
D	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml
E	Ausencia	Ausencia	<10 UFC/ ml
F	Ausencia	Ausencia	<10 UFC/ ml
G	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml



TABLA N°4

Comprobación de resultados.

Tipo de análisis: Numero mas probable (NMP)

Muestras	C.T	C.F	BAM
A	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml
B	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml
G	Ausencia	Ausencia	>300 UFC/ ml

Fuente: Primaria: obtenidos de investigación y resultados de la práctica.

CT: coliformes totales

CF: coliformes fecales

BAM: bacterias aerobias mesofilas



ANALISIS DE RESULTADOS

Análisis N°1:

Resultados de las muestras en bolsas

Al finalizar el análisis microbiológico a las tres muestras de agua purificada en bolsa en el cual se realizó la fase presuntiva con las muestras y terminado el tiempo de incubación, se procedió a la lectura de resultados encontrándose que en los tres tubos de la concentración 1:10 correspondiente a la muestra A presentaban formación de gas en la campana Durham al igual que en un tubo de la concentración 1:100 de la muestra B, dicha formación de gas se presume presencia de coliformes totales y fecales, es por ello que se procedió a realizarle la prueba confirmativa únicamente con las muestras que presentaban gas. La muestra C no presentó gas en la campana Durham, por lo que no se le realizaron las pruebas confirmativas.

Pasado el tiempo de incubación el agar selectivo verde brillante (prueba confirmatoria) no mostró formación de gas en ninguna de las concentraciones lo que indica la ausencia de coliformes totales, pero probablemente si otro tipo de bacterias. En el caldo para E. coli no se formó gas a ninguna concentración, lo cual indica la ausencia de coliformes fecales, por lo que podemos decir que cumple con los parámetros bacteriológicos para agua envasada, para coliformes pero no para otro tipo de bacterias.

A todas las muestras de bolsas se les realizó el recuento de bacterias aerobias mesófilas encontrándose que en las muestras A y B, se encontró mayor de 300 UFC/ ml, que interpreta como con presencia de este tipo de bacterias a esa concentración; y en la muestra C menor de 10 UFC/ ml, que indica como resultado aceptable para este tipo de bacteria, quedando como la única muestra de bolsa que cumple con las especificaciones de la USP 30 correspondiente a no más de 100 UFC/ ml.



Resultados de las muestras en botellas

Al igual que las muestras en bolsas, se observó presencia de gas en un tubo de la concentración 1:1000 de la muestra G que permite presumir la presencia de coliformes en esta muestra, estas además presentaban turbidez que es indicativo probable de la presencia de otro tipo de bacterias y levaduras.

En las tres muestras restantes (D, E, F) no se observó la presencia de gas ni turbidez en ninguna de las concentraciones, por lo que interpretamos como ausencia de coliformes o de otro de bacterias.

Al mismo tiempo observamos el crecimiento de Bacterias Aerobias Mesofilas en las placas petri de las muestras D y G con un recuento mayor de 300 UFC/ml por lo cual no cumple con las especificaciones de la USP 30 que corresponde a no más de 100 UFC/ml.

Posterior a la prueba presuntiva, para la muestra G como lo indica el método, se llevo a cabo la fase confirmativa únicamente debido a que encontró gas en la fase presuntiva (mencionada anteriormente) transfiriéndose 0.1ml del tubo que contenía gas al tubos con agar selectivos, luego este se incubo por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se obtuvieron los siguientes resultados:

El agar selectivo verde brillante no mostro formación de Gas lo que indica ausencia de coliformes Totales en las tres muestras, pero probablemente si otro tipo de bacterias, y al igual en el caldo selectivo E. Coli no se formo gas mostrando ausencia de coliformes fecales por lo cual podemos decir que cumple con los parámetros bacteriológicos para agua envasada.

Análisis N°2: comprobación de resultados

En esta fase de comprobación, el procedimiento se realizo solamente con las muestras A, B y G (muestras de referencia de análisis N°1), que en dicho análisis presentaron formación de gas en la fase presuntiva. En este análisis los resultados

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

fueron iguales a los encontrados en el primer análisis por lo que podemos decir que aunque en la fase presuntiva hubo aparición de gas, no se confirma la presencia de coliformes en las muestras A, B y G; por lo que cumple con los parámetros bacteriológicos del agua envasada correspondiente a coliformes, pero no cumplen con las especificaciones de calidad microbiológica por la presencia de Bacterias Aerobias Mesofilas (Farmacopea USP 30).



CONCLUSION

Terminado el ensayo microbiológico del agua purificada que se comercializa tanto en bolsas como de botellas llegamos a la siguiente conclusión:

- En las muestras analizadas tanto en bolsas como de botellas, no se encontró presencia de coliformes totales y fecales, lo cual significa que este aspecto cumple con los estándares establecidos por el MINSA.
- En el caso de la cuantificación de Bacterias Aerobias Mesofilas las muestras C, E, y F, cumplen con las especificaciones de la farmacopea USP 30, mientras que las muestras A, B, D y G, no cumplen con las especificaciones anteriores.
- En la comprobación de las especificaciones de la etiqueta todas las muestras cumplen con este requerimiento.

Por tanto podemos decir que las muestras A, B, D y G de agua purificada no cumple con los estándares requeridos por el órgano de salud y las muestras C, E, y F son aptas para el consumo de la población, ya que estas cumplen con las especificaciones de calidad microbiológica para Bacterias Aerobias Mesofilas según la farmacopea USP 30 y con los parámetros bacteriológicos para coliformes fecales y totales.



RECOMENDACIONES

Al Minsa como ente regulador de agua envasada para consumo humano:

- Realice este análisis por lo menos cada seis meses e investigue su debido registro sanitario.



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

- Aplique la ley 182 para protección de los consumidores.
- Que realice inspecciones a los locales donde se envasa y procesan estos productos.
- Verificar, mediante un estudio si estos productos tienen registro sanitario a los que los obliga la ley de protección de los consumidores.

BIBLIOGRAFIA

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya
Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

1. Guías para la Calidad del Agua Potable. Vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad. Organización Mundial de la Salud. OMS Ginebra 1998. Segunda edición. Volumen I. Pág. # 17 y 23.
2. Guías para la Calidad del Agua Potable. Vigilancia y control de los abastecimientos de agua a la comunidad. Organización Mundial de la Salud OMS Ginebra 1998. Segunda edición. Volumen III. Pág. # 211, 212, 213, 214, 215, 216.
3. Laboratorio de Microbiología del Agua, Departamento de Biología Facultad de Ciencias, UNAN LEON. Diagnostico preliminar de la calidad del agua de consumo en las comunidades del sector rural noroeste del municipio de León.
4. Para el análisis de aguas potables y residuales. Métodos Normalizados. Pág. # 980, 981, 982, 983.
5. Pascual María del Rosario, Calderón Vicente. Microbiología Alimentaria. Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas. Segunda edición. Pág. # 18 – 20 y 405 – 413.
6. Trobisher Martin, Hinsdill Ronald. Microbiología. Quinta edición. Pág. # 714, 715, 716.
7. <http://www.saludcapital.gov.co/ListasVsp/Protocolos/Protocolos%20Salud%20Ambiental/agua%20envasada.pdf>
8. http://potablewater.iespana.es/aguas_envasadas.htm



9. <http://www.dga.cl/secuencias/junior/2003/Trabajos2003/004.pdf>

10. <http://es.wikipedia.org/wiki/Agua>

11. [www.codexalimentarius.net/download/._Norma General para las aguas potable/embotellada/engvasada](http://www.codexalimentarius.net/download/._Norma%20General%20para%20las%20aguas%20potable/embotellada/engvasada) (distinta de las aguas minerales naturales).

12. www.mific.org. Directrices para la aplicación del sistema de análisis de riesgo y puntos críticos de control. NTON 03-001-98.



ANEXOS



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Índice NMP y 95% de límites de fiabilidad para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se emplean tres porciones de 10 ml, tres de 1 ml, tres de 0.1 ml. (según OPS y OMS)

Nº de tubos con reacción positiva			NMP Por 100ml	Límites de confianza del 95%	
3 de 10ml	3 de 1ml	3 de 0.1ml		Más bajos	Más altos
0	0	1	3	<1	9
0	1	0	3	<1	13
0	0	0	4	<1	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	49
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	48	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

FOTOS DE RESULTADOS

1. Verificación de etiquetado





Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008



2. Fase presuntiva

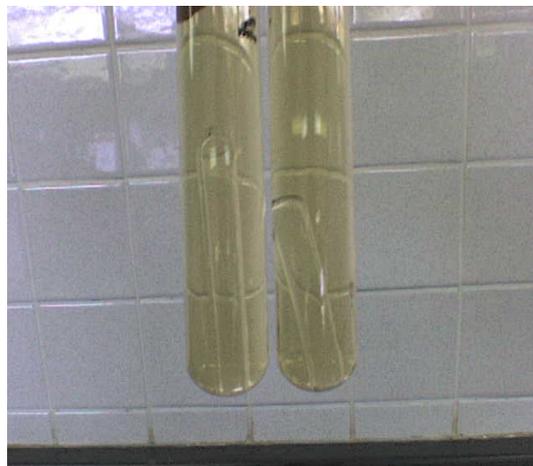
Tubos que presentaban formación de gas.



Tubos sin formación de gas



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

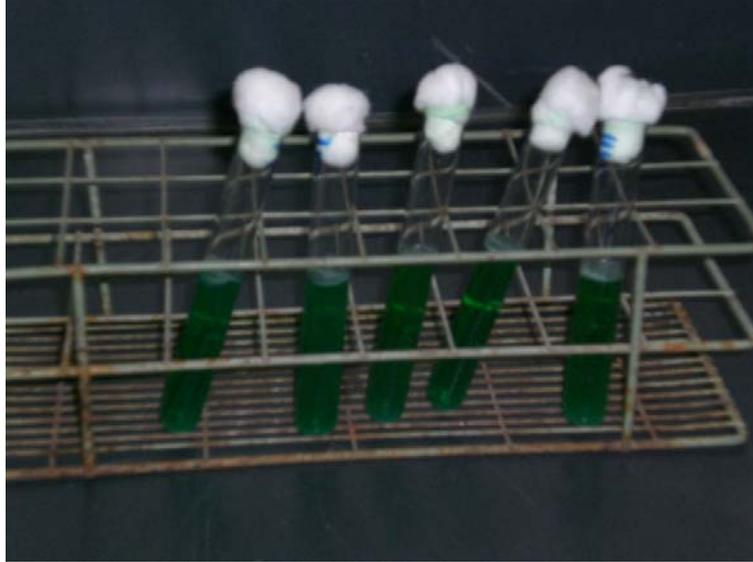


3. Fase confirmativa

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya
Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008



4. Recuento de Bacterias Aerobias Mesofilas

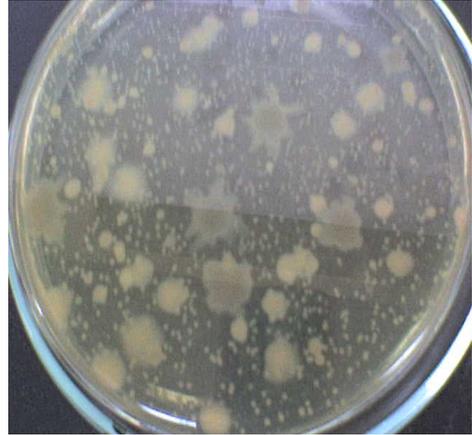
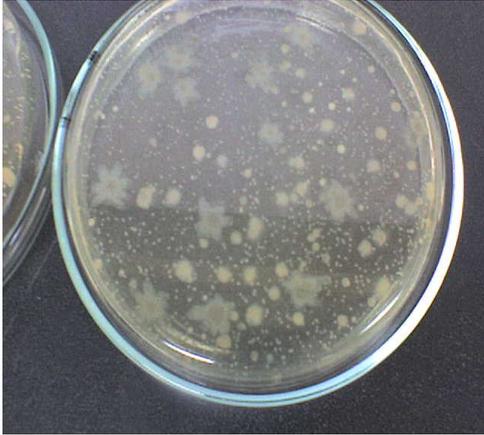
Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Placas conteniendo BAM >300 UFC/ ml

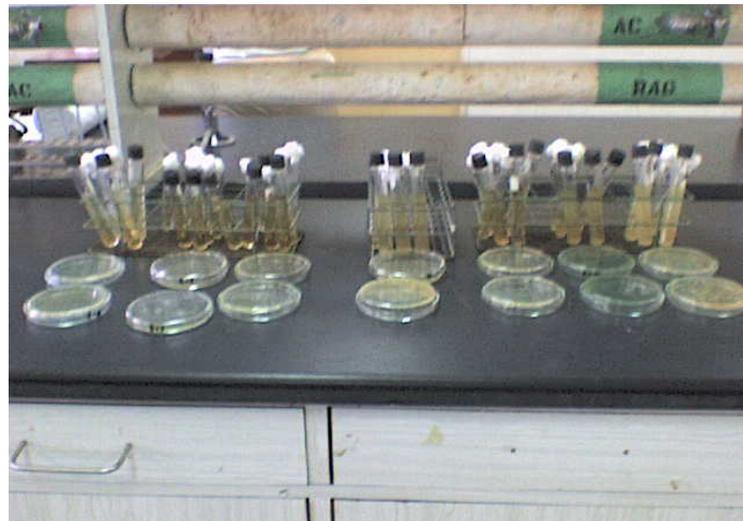
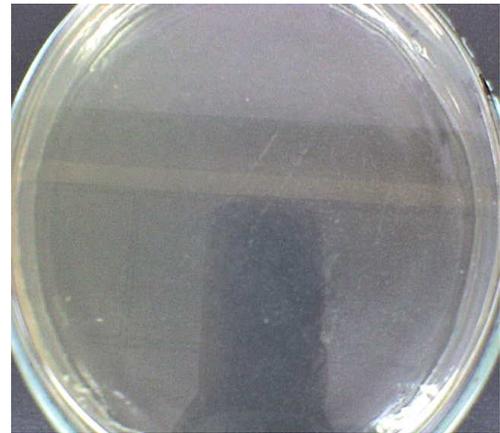
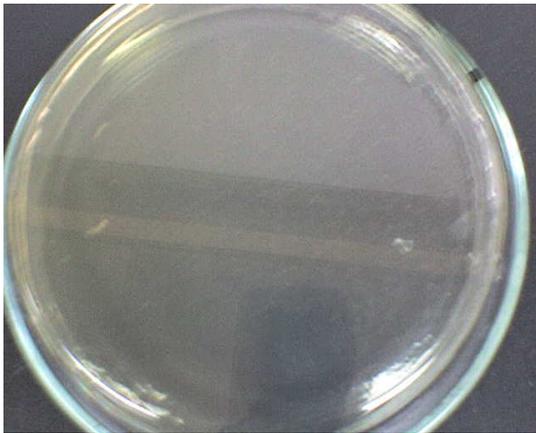


Mario Jerónimo Espinoza Zelaya
Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Placas conteniendo BAM <10 UFC/ ml



5. Control de ambiente y medio
Mario Jerónimo Espinoza Zelaya
Oscar Alberto Jirón Ruiz



GLOSARIO

Según la Norma de Especificación de Calidad Sanitaria de Agua Envasada NTON 03 040-03, existen definiciones sobre los diferentes tipos de agua.

Definiciones:

Aguas subterráneas: aguas como el agua de manantial, el agua de pozo artesiano y el agua de pozo que se originan en acuíferos subterráneos. Las aguas subterráneas pueden clasificarse de manera amplia como protegidas o aguas no protegidas. Las aguas subterráneas protegidas no están directamente influenciadas por el agua de superficie o las condiciones ambientales de la superficie y por lo tanto son adecuadas desde el punto de vista microbiológico.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

Agua artesiana: agua obtenida de un pozo que perfora el manto acuífero ubicado por encima del nivel freático. El agua artesiana debe cumplir con los requisitos de agua natural.

Agua de pozo: agua de un orificio perforado, excavado o de alguna manera construido en la tierra para obtener agua de acuífero.

Agua potable: es aquella que satisfaciendo las especificaciones de calidad, no causa efectos nocivos al ser humano.

Agua purificada: el nombre del agua que ha sido producido por destilación, deionización, osmosis inversa u otros procesos adecuados apropiados.

Agua desmineralizada: agua tratada, que no contiene minerales.

Agua destilada: agua purificada, que ha sido evaporada y luego condensada.

Agua fluorada: agua envasada que contiene flúor, la etiqueta debe especificar si la fluoración es natural o agregada, además debe cumplir con la norma de esta normativa.

Agua tratada: agua potable que ha pasado por un tratamiento posterior, como filtración, para ser envasada en empaques adecuados.

Agua envasada: es aquella apta para el consumo humano, contenida en recipientes herméticamente cerrados, de materiales, formas y capacidades diversas, aprobadas por las autoridades competentes y que es adecuada para el consumo directo sin que sea necesario tratamiento ulterior y con cierre inviolable el cual deberá permanecer en tal condición hasta que llegue a manos del consumidor final.

Agua de manantial: es al agua procedente de una formación subterránea, donde el agua fluye naturalmente hasta la superficie de la tierra se conoce como agua de manantial, además debe cumplir con la norma de calidad de esta normativa.



Agua mineral: el agua que contiene no menos de 250 partes por millón (PPM) de sólidos totalmente disueltos (TDS) provenientes de un recurso aprovechado o manantial. El agua mineral debe distinguirse de los otros tipos de agua por su constante nivel y proporciones relativas de elementos minerales. No se pueden añadir minerales a esta agua.

Envase primario: es todo recipiente que tiene contacto directo con el producto, con la misión específica de protegerlo de su deterioro, contaminación o adulteración y de facilitar su manipulación.

Envase secundario: cualquier recipiente que contiene alimentos para su entrega como un producto único, que los cubre, total o parcialmente y que incluye los embalajes y envolturas. Un envase puede contener varias unidades o tipos de alimentos previamente envasados cuando se ofrece al consumidor.

Etiqueta: es todo rotulo, marbete, inscripción, imagen u otra forma descriptiva o grafica ya sea que este impreso, marcado, gravado en relieve, adherido al empaque o envase del producto.

Flujo inverso: salida de un liquido en dirección o en el sentido contrario.

Definiciones de algunos términos

Coliformes fecales: Los microorganismos que tienen las mismas propiedades de los Coliformes totales, a una temperatura de 44 ó 44.5°C. También se les asigna Coliformes termo resistentes o termo tolerantes.

Coliformes totales: Bacilo Gram negativo no esporulado, que puede desarrollarse en presencia de sales biliares u otros agentes tensoactivos con similares propiedades de inhibición de crecimiento, no tiene citocromo oxidasa y fermenta la lactosa con producción de ácido, gas y aldehído a 35 ó 37°C, en un período de 24 a 48 horas.

Mario Jerónimo Espinoza Zelaya

Oscar Alberto Jirón Ruiz



Análisis Microbiológico del Agua Purificada que se Comercializa en Bolsa y Botella en la Ciudad de León 2008

E. Coli: Son presuntos *E. Coli*, las bacterias Coliformes fecales que fermentan la lactosa y otros sustratos adecuados como el manitol a 44 ó 44.5 °C con producto de gas, y que también producen indol a partir del triptófano. La confirmación de que en verdad se trata de *E. Coli* se logra mediante el resultado positivo en la prueba con el indicador rojo de metil y la comprobación de la ausencia de síntesis de acetilmetil carbinol y de que no se utiliza el citrato como única fuente de carbono. La *E. Coli* es el indicador más preciso descontaminación fecal.