

**Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua Unan-León**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Carrera de Farmacia**



**“A la libertad por la Universidad”**

**Evaluación de la calidad de agua de los grifos de la Facultad de Ciencias Químicas  
mediante Métodos Biológicos y Fisicoquímicos, Febrero - Mayo 2014.**

**Monografía para optar al título de Licenciado Químico Farmacéutico.**

**Autores:**

**Br. Franiela Guiomar Vanegas Urey.**

**Br. Harold Paul Rojas Hernández.**

**Tutora:**

**MSc Gloria María Herrera.**

**León, Mayo 2014**

**“2014 Por la Pertinencia y la Excelencia Académica”**

## **Agradecimiento**

*A Dios:*

Por su compañía cada día que nos demoro el llegar hasta el día de hoy, por ser quien nos brindo sabiduría, entendimiento, salud, inteligencia y fuerza espiritual en cada uno de los retos a lo largo de estos años, por permitirnos estar hoy culminando un ciclo mas de nuestras vidas.

*A nuestros padres:*

Por el apoyo incondicional y cada uno de los valores que inculcaron en nosotros, por cada uno de los sacrificios para poder terminar nuestra profesión, por darnos ánimos y siempre confiar en nosotros.

*A nuestros hermanos:*

Por su apoyo, su comprensión, ayuda y cariño que mostraron para nosotros.

A nuestra tutora:

*MSc. Gloria María Herrera*

Por su paciencia, dedicación, su tiempo y su apoyo en cada momento, por darnos un sí y trabajar con nosotros, por brindarnos confianza, conocimiento y amistad para poder realizar este trabajo. Muchas Gracias.

*A Don David Espinoza*

Por su aporte, disponibilidad y participación con sus conocimientos en el desarrollo de nuestras tesis.

## **Dedicatoria.**

Dedico este trabajo principalmente a Dios por darme el privilegio de terminar mi carrera, por ser el pilar fundamental a lo largo del camino recorrido, por haberme apoyado intelectualmente, por el único que siempre me ha dado la sabiduría y el entendimiento para culminar mi carrera.

A mi abuelita por ser un apoyo muy importante en mi vida, por ser la mujer que a dejado sus necesidades por cubrir las mías, por estar conmigo todo este tiempo dándome aliento para seguir adelante, por darme los consejos que me han ayudado a ser el hombre que hoy soy.

A mi madre por ser una mujer decidida y siempre con deseos de superación, por ser esa mujer que cuando necesite ayuda dijo que yo podía solo, por enseñarme a valerme por mí mismo y lograr llegar con su compañía hasta el día de hoy.

A mi hijo por ser el motor que impulsa el deseo de seguir adelante, el deseo de darle una mejor vida a mi familia.

A mi esposa por su apoyo incondicional, por estar siempre a mi lado, en las buenas y en las malas y sobre todo por ayudarme a darle dirección a mi vida.

**Harold Rojas.**

## **Dedicatoria:**

A Dios, porque él me ha permitido llegar hasta el día de hoy, por mi salud, por la sabiduría e inteligencia que a mi brindo todos estos años, por ser quien me lleno de fuerzas, por ser mi amigo fiel, quien escucho cada una de mis necesidades, y respondió a ellas de la mejor manera, por ser quien siempre me levanto cuando caía, por guiarme y acompañarme hasta el día de hoy.

A mis padres, Wiilliam y Janet, por dedicar cada día de sus vidas a formarme, guiarme, aconsejarme y jamás faltarme, por ser los mejores padres, por educarme con el ejemplo e inculcarme los mejores valores, por su confianza, apoyo, escucha y comprensión, por no dejarme sola en ningún momento, a ellos que son mi vida, a ellos que me han heredado lo mejor, esta profesión.

A mis hermanos, por compartir mis alegrías y apoyarme siempre, por su compañía durante muchas horas y por hacer este logro mas fácil.

A cada uno de los docentes que a lo largo de este camino me transmitieron sus conocimientos, en especial a mi tutora MSc. Gloria Maria Herrera que con su paciencia y dedicación me ayudo a finalizar este trabajo investigativo.

A mis amigos, por darme ánimos, por decirme que si podía cuando creí lo contrario, por ayudarme, acompañarme y siempre escucharme, por soñar conmigo este logro y acompañarme hasta el final.

**Franiela Vanegas.**

## INDICE.

<b>Contenido</b>	<b>Páginas</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del Problema.....</b>	<b>6</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>Marco Teórico.....</b>	<b>8</b>
<b>Material y Método.....</b>	<b>39</b>
<b>Resultado y Análisis.....</b>	<b>46</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>51</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>52</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>53</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>58</b>

## Introducción.

El agua es un compuesto en la vida diaria, se necesita para la subsistencia de todos los seres vivos, para la mayoría de los procesos industriales es el fluido de trabajo. Por ser el solvente universal es común encontrar en aguas superficiales y subterráneas un gran número de compuestos que en determinadas concentraciones pueden ser nocivos para la salud de los consumidores, además, pueden contener microorganismos indeseables. Debe realizarse el máximo esfuerzo para lograr que la inocuidad del agua de consumo sea la mayor posible. <sup>(1)</sup>

El agua es esencial para la vida y todas las personas deben disponer de un suministro satisfactorio, la mejora de la calidad del agua potable puede proporcionar beneficios tangibles para la salud. La contaminación del agua es conocida desde la antigüedad; por ejemplo en Roma eran comunes los envenenamientos provocados por el plomo de las tuberías que transportaban el agua. <sup>(1)</sup>

La determinación de la calidad del agua necesita de la implementación de metodologías y técnicas tanto químicas como biológicas con las que podemos detectar no sólo los contaminantes presentes en ellas, sino también los posibles efectos indeseables que pueden ocasionar en el medio ambiente y salud de las personas. Es por esto que se puede decir que la calidad del agua se mide por la presencia y cantidad de agentes contaminantes y para conocerse estos datos es necesario realizar los análisis del agua. Entre estos métodos tenemos los físico-químicos que nos permiten conocer la turbidez, pH, sólidos disueltos; ensayos bacteriológicos como la determinación de enterobacterias y otros microorganismos y ensayos toxicológicos como son el ensayo de *Latuca sativa* y *Allium cepa L.* Bioensayos que se utilizan para identificar la presencia de metales y sustancias tóxicas en el agua, el ensayo *Allium cepa L.*, nos permitirá conocer, si esta agua contiene sustancias que provocan efectos tóxicos, mediante la inhibición del crecimiento de las células meristemáticas de los bulbos de cebolla. <sup>(2)</sup>

El método del número más probable (NMP) es una estrategia eficiente de estimación de densidades poblacionales especialmente cuando una evaluación cuantitativa de células individuales no es factible. La técnica se basa en la determinación de presencia o ausencia (positivas o negativas) en réplicas de diluciones consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en muestras de soluciones. <sup>(2)</sup>

La identificación cualitativa de metales como el plomo en el agua de estudio, será posible al realizar el método de la marcha analítica de cationes del grupo I. <sup>(3)</sup>

Existen una gran cantidad de estudios relacionados o con el fin de determinar la calidad del agua, con el único propósito de conocer si es apta para el consumo humano.

López Laura y colaboradores, realizaron estudios en 1997 con el título Estudios de mutagenicidad, inhibición del crecimiento algal y contaminación química en aguas superficiales de un río urbano en Buenos Aires, Argentina. Se evaluaron los efectos citotóxicos y genotóxicos de muestras de agua provenientes de un río contaminado por afluentes industriales y domésticos. Se utilizaron diversos sistemas biológicos con el fin de seleccionar un ensayo adecuado para el monitoreo continuo, entre estos están el ensayo de Ames y *Allium Cepa*. En las muestras de agua cruda no se obtuvieron efectos genotóxicos en los ensayos de Ames y *Allium Cepa*, dichas muestras si mostraron un alto índice de aberraciones cromáticas en los meristemos terminales de la raíz en el alga *Selanastrum capricomutum*, inhibiendo así el crecimiento. <sup>(4)</sup>

En el año 2006, Un equipo formado por personal del laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias, de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua de León, (UNAN-León), llevó a cabo un diagnóstico preliminar de la calidad de agua para el consumo humano en el sector rural noreste del municipio de León con el apoyo de las propias comunidades y de la Fundación Ecológica y Desarrollo (ECODES) y con la financiación del Ayuntamiento de Zaragoza (España). Se eligieron 69 fuentes de agua, de forma aleatoria, que abastecen el 47.9% de la población de dicho sector.

Se realizaron los análisis microbiológicos completos (Calidad bacteriológica del agua), análisis físico-químicos y análisis de plaguicidas, se tomaron muestras de suelo para conocer su grado de permeabilidad y se realizaron encuestas sobre el estado de los pozos y sobre la condición higiénica sanitaria de la zona. El resultado de éste estudio, bajo la referencia de los parámetros que establecen las Normas CAPRE para agua potable, mostro que el 97.1% de las muestras analizadas no eran aptas para el consumo humano. La contaminación predominante fue la microbiológica con un 97.1% seguida por la contaminación por plaguicidas con 31.3% y la físico-química con 18.8%.<sup>(5)</sup>

Caballero Y. en marzo del 2007 realizo estudios para el Centro de Investigación de recursos acuáticos de Nicaragua de la UNAN-Managua, con el título Análisis del Potencial Hidrológico y Calidad de las Aguas Superficiales en la Subcuenca de Río Ochomogo; éste se elaboró para determinar la disponibilidad del agua superficial y los factores que inciden en la calidad de agua en la subcuenca. Se utilizaron indicadores fisicoquímicos, en las cuales las aguas no presentaron problemas con la excepción del hierro que se encuentra por encima de los límites establecidos por las normas Canadienses (CCME). En cuanto a los análisis microbiológicos indicaron que la contaminación bacteriológica del agua por las diferentes actividades en la Subcuenca; se ve afectada por Coliformes totales y termotolerantes ya que superan los valores de límites establecidos por las diferentes agencias para la protección del medio ambiente de los Estados Unidos, Europa y Canadá. Las concentraciones encontradas de *E.Coli* en todos los sitios de muestreo exceden los parámetros de la calidad del agua, lo que revela una contaminación de origen fecal mientras que la presencia de *Streptococos fecalis* en las aguas confirman una contaminación animal.<sup>(6)</sup>

Carrasco J. y colaboradores, químicos farmacéuticos de la facultad de Ciencias Químicas de la UNAN-León en el año 2013 realizaron en la Comunidad El Paragua del municipio de Malpaisillo, León, Nicaragua, un estudio basado en la utilización de indicadores biológicos, físico químicos y microbiológicos, revelaron que un 10% de las muestras recolectadas tenían presencia de Coliformes totales; las mismas muestras inhibieron el crecimiento de las raíces de *Allium Cepa L.* y mediante el método colorimétrico se determinaron las

concentraciones de plomo en esta zona, presentando estas 2 pmm a 6 pmm del toxico. Teniendo en cuenta cada uno de los estándares, valores y rangos del Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano se concluyo que el agua de la comunidad El Paragua no es apta para el consumo de sus habitantes. <sup>(25)</sup>

Rojas A. y colaboradores, en el 2013 realizaron un estudio en diferentes zonas de Nicaragua, uno de ellos se realizó en pozos abastecedores del municipio de Siuna, en la Región Autónoma del Atlántico Norte utilizando métodos biológicos y fisicoquímicos; teniendo como resultados en la prueba microbiológica de NMP la presencia de Coliformes totales y fecales ya que exceden el límite máximo permisible según lo declarado por el reglamento de la calidad del agua para el consumo humano (DS N0 031-2010-SA); Las muestras tomadas de estos pozos inhibieron el crecimiento normal de las semillas de *Latuca sativa L* en el bioensayo de toxicidad aguada por lo tanto se comprobó la presencia de sustancias tóxicas en éstas aguas, por lo que concluyeron la no potabilidad del agua en éstos pozos. <sup>(7)</sup>

El agua de consumo inocua, según se define, no ocasiona ningún riesgo significativo para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta los años que el personal docente y administrativo llevan laborando en estas instalaciones; así mismo, los alumnos por pasar la mayor parte del tiempo en estas áreas, es de suma importancia conocer las propiedades física y químicas en las que se encuentra esta agua que es ingerida día a día.

El conocer la calidad del agua de esta institución nos ayudará a determinar la potabilidad de la misma, basándonos en la falta de mantenimiento y que estas tuberías han sido usadas desde los años 70, se sospecha de una posible contaminación del vital líquido por el desprendimiento de los metales que las componen.

La química analítica o el análisis químico que realizamos nos permitió determinar cualitativamente la composición química de las diferentes muestras tomadas de los grifos

de las áreas: de lavado del laboratorio de microbiología, área de cafetería del laboratorio Mauricio Díaz Müller, área de cafería de decanatura y área de cafetería del departamento de farmacia industrial y evaluar así la calidad consumible del agua la cual es el principal aspecto por el que realizamos este estudio, utilizamos un método biológico como es el ensayo de toxicidad aguada por *Allium Cepa L*, el ensayo microbiológico del numero más probable, la determinación de bacterias aerobias mesófilas y la marcha analítica de cationes del grupo I para evaluar si el agua puede ser usada para el consumo humano.

### **Planteamiento del problema.**

Los alumnos, el personal docente y administrativo de la Facultad de Ciencias Químicas han alegado que las propiedades del agua han cambiado con el paso del tiempo, muchas veces con un sabor característico a metales, por lo tanto nos planteamos como problema evaluar la calidad del agua en este recinto.

Según los ensayos a realizar en las muestras recolectadas de las diferentes áreas de la Facultad de Ciencias Químicas en las cuales el agua se utiliza para consumo humano, queremos determinar ¿Serán las aguas de esta facultad aptas para el consumo humano? Para esto, utilizaremos el método del número más probable para la identificación de presencia de Coliformes fecales y totales, la determinación de bacterias aerobias mesófilas, el Bioensayo de toxicidad aguada para la determinación de minerales con *Allium cepa L* y el método de la marcha analítica de cationes del grupo I.

**Objetivos:**

**General:**

- ✓ Evaluar la calidad del agua mediante indicadores Biológicos y Fisicoquímicos en el edificio de la Facultad de Ciencias Químicas. León, Nicaragua.

**Específicos:**

- ✓ Identificar la presencia de Coliformes fecales y totales a través del Método microbiológico del Número más probable haciendo uso de la técnica de tubos de fermentación múltiple.
- ✓ Determinar la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas patógenas en las muestras en estudio.
- ✓ Realizar el Bioensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa L* evaluando la inhibición del crecimiento promedio de las raíces de cebolla.
- ✓ Efectuar el método de la marcha analítica de cationes del grupo I para identificar la presencia de plomo en las muestras.

## **Marco Teórico.**

El agua es una de las sustancias más difundidas y abundantes en el planeta tierra. Es parte integral de la mayoría de los seres vivos tanto animales como vegetales, y está presente en cantidad de minerales. El agua potable es fundamental para la vida; las civilizaciones han florecido cerca de abastecimientos adecuados de ese líquido. Las civilizaciones modernas han desarrollado técnicas para transportar el agua a grandes distancias y lograr administrarla de tal manera que se pueda usar y reutilizar en forma adecuada. <sup>(1)</sup>

Hasta el siglo XVIII, esta sustancia denominada apropiadamente “El solvente universal” se creyó que era un elemento y fue el químico inglés Cavendish quien sintetizó agua a partir de la combustión de aire e hidrógeno. Sin embargo los resultados de este experimento no fueron interpretados hasta años más tarde, cuando Lavoisier propuso que el agua no era un elemento sino un compuesto formado por oxígeno y por hidrógeno, siendo su fórmula  $H_2O$  <sup>(2)</sup>.

## **Propiedades Físicas.**

El agua es un líquido inodoro e insípido. Tiene un cierto color azul cuando se concentra en grandes masas. A la presión atmosférica (760 mm de mercurio), el punto de ebullición es de 100 °C, cristalizada en el sistema hexagonal, llamándose nieve o hielo según se presente de forma esponjosa o compacta, se expande al congelarse, es decir aumenta de volumen, de ahí que la densidad del hielo sea menor que la del agua y por ello el hielo flota en el agua líquida. El agua alcanza su densidad máxima a una temperatura de 4 °C (1g/cc). <sup>(25)</sup>

Su capacidad calorífica es superior a la de cualquier otro líquido o sólido, siendo su calor específico de 1 cal/g, esto significa que una masa de agua puede absorber grandes cantidades de calor, sin experimentar apenas cambios de temperatura, lo que tiene gran influencia en el clima. <sup>(25)</sup>

### **Propiedades Químicas.**

El agua es el compuesto químico más familiar para nosotros, el más abundante y el de mayor significación para nuestra vida. Su excepcional importancia, desde el punto de vista químico, reside en que casi la totalidad de los procesos químicos que ocurren en la naturaleza, no sólo en organismos vivos, sino también en la superficie no organizada de la tierra, así como los que se llevan a cabo en el laboratorio y en la industria, tienen lugar entre sustancias disueltas en agua, esto es en disolución. Normalmente se dice que el agua es el disolvente universal, puesto que todas las sustancias son de alguna manera solubles en ella. No posee propiedades ácidas ni básicas, combina con ciertas sales para formar hidratos, reacciona con los óxidos de metales formando ácidos y actúa como catalizador en muchas reacciones químicas. <sup>(25)</sup>

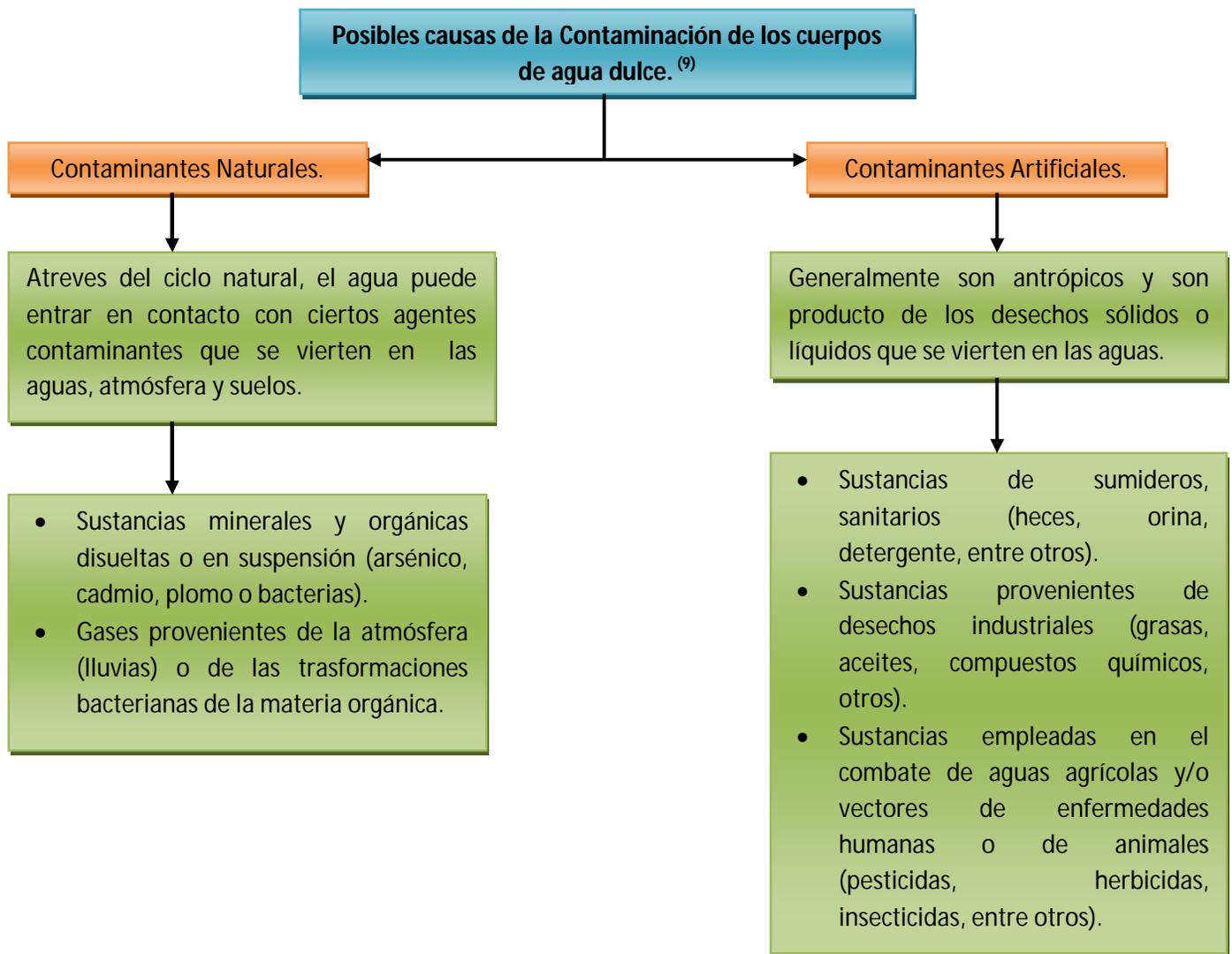
### **Contaminación del Agua.**

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que, como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX, cabe añadir el problema de la escasez, aspecto que está adquiriendo proporciones alarmantes a causa del cambio climático y la creciente desertización que está sufriendo el planeta. <sup>(8)</sup>

El agua potable es el agua de superficie tratada y también puede ser el agua no tratada pero sin contaminación que proviene de manantiales naturales, pozos naturales y otras fuentes. Un agua clara y potable es una necesidad humana básica, sin embargo, el acceso a ella continúa siendo una gran dificultad para muchas comunidades en países en desarrollo. <sup>(9)</sup>

**La contaminación del agua potable puede ser por:**

- Contaminación Química: una gran variedad de productos químicos, como metales, disolventes, pesticidas, herbicidas, productos industriales, detergentes, aceites y combustibles que pueden ser acumulables en el agua.
- Contaminación Microbiológica: gran cantidad de microorganismos patógenos (bacterias, virus y protozoos) pueden contaminar el agua.
- Contaminantes que consumen oxígeno: exceso de materiales biodegradables.
- Material en suspensión y sustancias inamisibles.<sup>(9)</sup>



### **Dependiendo de su origen existen dos tipos de contaminación de las aguas:**

**Contaminación puntual:** es aquella que descarga sus aguas en un cauce natural, proviene de una fuente específica, como suele ser un tubo o dique. En este punto el agua puede ser medida, tratada o controlada. Este tipo de contaminación está generalmente asociada a las industrias y las aguas negras municipales. <sup>(10)</sup>

Las fuentes puntuales descargan contaminantes en localizaciones específicas a través de tuberías o alcantarillas a cuerpos de agua superficial. Los ejemplos incluyen fábricas, plantas de tratamiento industrial, plantas de tratamiento de aguas negras (retiran la mayoría de los contaminantes, pero no todos), minas subterráneas de carbón activas y no activas, minas de oro y pozos petroleros fuera de la costa. <sup>(12)</sup>

**Contaminación difusa:** es el tipo de contaminación producida en un área abierta, sin ninguna fuente específica; este tipo de contaminación está generalmente asociada con actividades de uso de tierra, tales como: la agricultura, urbanizaciones, pastoreo y prácticas forestales. <sup>(10)</sup>

Las fuentes no puntuales son grandes áreas de terreno que descargan contaminantes al agua superficial y subterránea sobre una región extensa, y partes de la atmósfera donde los contaminantes son depositados en las aguas superficiales. Los ejemplos pueden incluir los vertimientos de sustancias químicas en el agua superficial y la infiltración desde tierras de cultivo, lotes de pastura para ganado, bosques talados, tierras urbanas y suburbanas, tanques sépticos, predios de construcción, sitios de estacionamiento, carreteras y deposición ácida, entre otras. <sup>(12)</sup>

### **Calidad del agua.**

La calidad del agua se define como el conjunto de características del agua que pueden afectar su adaptabilidad a un uso específico o al conjunto de parámetros que indican que el

agua puede ser usada para diferentes propósitos como: doméstico, riego, recreación e industria. <sup>(10)</sup>

Contaminación es la acción y efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua, que de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica. <sup>(10)</sup>

Las categorías de contaminación que impactan a los recursos hídricos se derivan de fuentes puntuales y no puntuales. Éstas afectan y alteran las características naturales de los recursos hídricos, ocasionalmente por actividades naturales, pero en su mayoría, el mayor de los impactos es de carácter antropogénico. <sup>(10)</sup>

### **Importancia de la Calidad del Agua.**

El agua contaminada es la mayor fuente global de enfermedades gastrointestinales y otras enfermedades. Los patógenos en el agua contaminada pueden potencialmente contaminar y proliferarse en los alimentos. Los contaminantes químicos en el agua también pueden ser un tema de salud pública. <sup>(11)</sup>

### **Principales indicadores físicos, químicos y biológicos de calidad del agua.**

Los indicadores deberían ser explicados bajo el concepto de sostenibilidad dentro de un proceso lógico, fusionando los aspectos ecológicos, económicos y sociales. Estos se definen ante una situación única y dentro de un escenario específico. <sup>(10)</sup>

Los parámetros de calidad de agua se diferencian según sus orígenes biológicos, químicos y físicos; por causas principalmente de carácter antropocéntricos como el caso del uso de la tierra. Entre ellos se mencionan el pH, turbidez, oxígeno disuelto, nitrato, fosfato, temperatura, demanda bioquímica de oxígeno, sólidos totales, coliformes fecales. <sup>(10)</sup>

### **Indicadores microbiológicos del agua.**

Este tipo de contaminación se relaciona con la presencia de microorganismos patógenos de heces humanas y animales. Es común encontrarlo en los recursos hídricos superficiales, debido a su exposición. Es importante conocer el tipo, número y desarrollo de las bacterias en el agua para prevenir o impedir enfermedades de origen hídrico. Es difícil detectar en una muestra organismos patógenos como bacterias, protozoarios y virus debido a sus bajas concentraciones. Por esta razón, es que se utiliza el grupo de coliformes fecales, como indicador de la presencia de microorganismos. <sup>(10)</sup>

Coliformes fecales: la bacteria coliforme fecal presente en las heces humanas y animales de sangre tibia. Puede entrar en los cuerpos de agua por medio de desechos directos de mamíferos y aves, así como corrientes de agua, acarreado desechos y del agua de drenaje. Los organismos patógenos incluyen la bacteria coliforme fecal, así como bacterias, virus y parásitos que causan enfermedades. <sup>(10)</sup>

### **Indicadores físicos y químicos del agua.**

Los parámetros químicos son más relacionados con los agroquímicos, metales pesados y desechos tóxicos. Este tipo de contaminación es más usual en las aguas subterráneas en comparación con las aguas superficiales. Relacionado por la dinámica del flujo de agua, los contaminantes son más persistentes y menos móviles en el agua subterránea, como es el caso de la contaminación con nitratos por su movilidad y estabilidad, por la presencia de asentamientos urbanos o actividades agrícolas aledañas <sup>(10)</sup>. Dentro de estos indicadores tenemos: <sup>(10)</sup>

- Oxígeno Disuelto.
- Demanda Bioquímica de oxígeno.
- pH o concentraciones de Iones Hidrogeno.
- Turbidez.

- Sólidos Totales Disueltos.
- Conductividad.

### **Ensayos Biológicos para la evaluación de la calidad del agua:**

Los ensayos biológicos son herramientas de determinación y análisis de la toxicidad de un agente, capacidad que es medida a través de las respuestas generadas en los organismos o sistemas vivientes, obteniendo una relación dosis-respuesta. <sup>(26)</sup>

#### **1. Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium cepa* L mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces.**

Cuando un bulbo de cebolla (*Allium sp*) se rehidrata se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz, y por tanto su elongación. <sup>(15)</sup>

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas, luego de un período de 72 horas de prueba. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control. <sup>(15)</sup>

#### **Organismos de prueba.**

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de *Allium sp.* de 1.5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas o raíz. Éstos pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor. <sup>(15)</sup>

Previo al montaje de la prueba, los bulbos deben limpiarse eliminando la epidermis seca y removiendo, con un bisturí o instrumento punzante, los restos de tejido y raíces del área radicular. No se deben dañar las raíces primordiales. Con el fin de eliminar los restos de tejido, es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por 2 horas y dejar secar. <sup>(15)</sup>

### **Almacenamiento de los bulbos de cebolla.**

Se recomienda adquirir los bulbos en vísperas de la realización de pruebas o, en su defecto, almacenarlos en un lugar donde se puedan garantizar condiciones secas y una temperatura entre 10 y 20 °C. En algunas regiones, los bulbos pueden mantenerse almacenados hasta por un año; sin embargo, en zonas geográficas donde la temperatura y la humedad son altas, el almacenamiento está limitado a unos pocos días. <sup>(15)</sup>

### **Control de calidad del material biológico.**

Dado que la prueba con cebollas no requiere mantenimiento de un cultivo, el control de calidad debe enfatizarse en la calidad de los lotes de material a utilizar. Por esa razón, debe darse especial importancia al almacenamiento del material, así como al control de hongos que pueden afectar la viabilidad de las cebollas y su normal desarrollo. Es por ello que se recomienda disponer de un número de cebollas por lo menos 3 o 4 veces mayor al requerido para las pruebas. Su almacenamiento debe hacerse en ambiente exento de humedad, a una temperatura entre 10 y 20 °C. <sup>(15)</sup>

### **Material.**

Tubos de ensayo de vidrio de 10 cm de largo y 1.5 cm de diámetro (o recipientes de mayor tamaño, dependiendo del tipo de bulbos a utilizar), gradillas o soportes para tubos, bisturí y reglilla para hacer mediciones en cm o mm. <sup>(15)</sup>

### **Preparación de diluciones.**

Generalmente, se sugiere el empleo de una serie de 5 concentraciones, un control negativo y 1 o 2 controles positivos. Para su preparación se emplea el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 0.2 o 0.3. <sup>(15)</sup>

Cuando se va a llevar a cabo una evaluación exploratoria, puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas (por ejemplo: 100; 10; 1; 0.1; 0.01), lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la Concentración Inhibitoria Media (CI50). <sup>(15)</sup>

### **Desarrollo de la prueba.**

Cuando se trabaja con bulbos de diámetro pequeño, las pruebas se realizan en tubos de ensayo de 10 cm de longitud x 1.5 cm de ancho. En el caso de bulbos de mayor diámetro pueden utilizarse tubos o recipientes de mayor volumen, dependiendo del tamaño de los mismos. Es importante destacar que la profundidad de los recipientes debe ser tal que, al término de la prueba, la elongación máxima no alcance el fondo del recipiente. <sup>(15)</sup>

En la prueba se utilizan 5 concentraciones de la muestra, un control negativo y 1 o 2 controles positivos, cada una con 12 réplicas. El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado debe hacerse hasta el borde del tubo. A continuación se colocan los bulbos limpios sobre la boca del tubo, cuidando que la zona radicular quede inmersa en el líquido. <sup>(15)</sup>

Los tubos se colocan en una gradilla, la cual se localiza sobre una mesa que no presente vibraciones y se mantienen a temperatura ambiente (20 °C) durante un período de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa. <sup>(15)</sup>

Dos veces al día durante el período de prueba, se debe reponer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para reponer este volumen se utiliza la muestra o dilución correspondiente. Se recomienda inclinar el bulbo sin sacar las raíces del tubo, adicionando cuidadosamente el volumen con ayuda de una pipeta Pasteur. <sup>(15)</sup>

### **Expresión de resultados.**

#### **Medición.**

Al término del período de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, medición que se lleva a cabo con ayuda de una regla común con escala en milímetros. La medición se lleva a cabo colocando la escala en el margen del tubo, se ubica el valor de longitud mínimo y máximo donde incide la mayoría de las raíces y el punto medio se define como el promedio. <sup>(15)</sup>

Se efectúa la estimación en cada tubo y se obtiene el promedio matemático de diez réplicas (los dos valores más extremos se descartan). Para obtener el porcentaje de efecto de inhibición se debe realizar la siguiente operación:

$(\text{Longitud del control} - \text{longitud de la muestra}) \times 100 / \text{longitud del control}$

## **2. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.**

### **Principio de la prueba.**

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en el que se pueden evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos puros o de mezclas complejas en el proceso de germinación de las semillas y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxicos, se determina la inhibición en la germinación y la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocótilo. Es importante destacar que durante el período de germinación y los primeros días de

desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos. Por otra parte, muchas de las reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en semillas o plántulas en general. El éxito o aptitud de una plántula para establecerse en un ambiente determinado es de gran importancia para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo, constituyen indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta. <sup>(16)</sup>

A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto en la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos que no son suficientes para inhibir la germinación; sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocótilo, dependiendo ello del modo y sitio de acción del compuesto. De esta manera, la inhibición en la elongación de la radícula e hipocótilo constituyen indicadores sub letales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria a la proporcionada al estudiar el efecto en la germinación. Este ensayo puede ser aplicado para la evaluación de la toxicidad de compuestos puros solubles, de aguas superficiales (lagos, ríos), aguas subterráneas, aguas para consumo humano, aguas residuales domésticas e industriales, además de lixiviados de suelos, sedimentos, lodos u otras matrices sólidas. A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo de diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbiedad de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pre tratamiento y simplificando el procedimiento de prueba. <sup>(16)</sup>

Si bien, *L. sativa* no es una especie representativa de ecosistemas acuáticos, la información generada a partir de esta prueba de toxicidad proporciona datos acerca del posible efecto de los contaminantes en las comunidades vegetales cercanas a las márgenes de cuerpos de agua contaminados, siendo también una especie interesante de considerar por su importancia desde el punto de vista hortícola. Por otra parte, es de fácil y rápida germinación por lo que es posible desarrollar la prueba en pocos días. <sup>(16)</sup>

Este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental para la evaluación ecotoxicológica de muestras ambientales y compuestos puros, además de la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarios para el registro de estos compuestos. <sup>(16)</sup>

En la incorporación de esta prueba en una batería de bioensayos es importante considerar el compromiso entre la sensibilidad de la especie *L. sativa*, el reducido tiempo de exposición de la prueba con semillas, los bajos costos asociados y que no requiere equipamiento sofisticado, en particular, en la aplicación a muestras ambientales o en el monitoreo de procesos de detoxificación, saneamiento, control de efluentes o reuso de biosólidos. <sup>(16)</sup>

### **Organismos de prueba.**

En este ensayo se usan semillas de lechuga de la especie *Lactuca sativa* variedad mantecosa. <sup>(16)</sup>

### **Obtención, control y conservación de las semillas.**

La obtención de las semillas de lechuga se realiza en semilleras locales, procurando que sean semillas sin curar (sin fungicidas o plaguicidas), con buen poder germinativo y baja variabilidad en la elongación de la radícula e hipocótilo. <sup>(16)</sup>

### **Verificación de la viabilidad de las semillas.**

Previo a la implementación de la prueba, es recomendable verificar que cada lote nuevo de semillas que se utilice tenga un porcentaje de germinación superior al 90%, sincronización en la germinación y baja variabilidad de la elongación de la radícula e hipocótilo (coeficiente de variación  $< 30\%$ ). <sup>(16)</sup>

Es necesario además caracterizar las condiciones de germinación del lote de semillas, evaluando la respuesta frente a la luz (fotoblastismo positivo o negativo: germinación en presencia o ausencia de luz, respectivamente) y la temperatura óptima de germinación. <sup>(16)</sup>

Con el fin de reducir la variabilidad en los resultados, para el caso de semillas no seleccionadas y que presenten gran heterogeneidad en el tamaño, es conveniente realizar una selección previa descartando las fracciones de mayor y menor tamaño y utilizando solamente la fracción más numerosa y de tamaño intermedio. La fracción de menor tamaño puede presentar un alto porcentaje de semillas vanas, mientras que las semillas de mayor tamaño pueden ser más vigorosas, variando la sensibilidad frente a los compuestos tóxicos. <sup>(16)</sup>

Si no es posible obtener lotes de semillas con poder germinativo igual o mayor al 90%, se debe aumentar el número de semillas por caja para obtener un número mínimo de 18 semillas germinadas. Por otra parte, si se desea aumentar la confiabilidad de los resultados, o en caso de contar con semillas que posean una alta variabilidad en la elongación de la radícula de los controles negativos, aún habiéndolas seleccionado de tamaño uniforme, se recomienda aumentar el número de réplicas por tratamiento. <sup>(16)</sup>

Las semillas seleccionadas se almacenan fraccionadas a 4° C, en oscuridad y en ambiente seco. Conservadas en estas condiciones mantienen su vigor al menos durante 2 años. Un indicador de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas es la reducción en el poder germinativo y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de

radícula e hipocótilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas. <sup>(16)</sup>

### **Control de calidad de pruebas.**

Es importante establecer cuáles son los valores de elongación en el control negativo, así como la sensibilidad de las semillas frente al compuesto tóxico de referencia (control positivo), determinando para cada lote de semillas el valor de CE50. Se realizan cartas control para evaluar el crecimiento en los controles negativos (promedio  $\pm 2\sigma$  de la elongación de la radícula) y de la sensibilidad frente al compuesto tóxico de referencia (promedio  $\pm 2\sigma$  de la CE50 para el Zn (II) preparado a partir de sulfato de zinc). <sup>(16)</sup>

Como se mencionó anteriormente, la reducción en el poder germinativo ( $< 90\%$ ) y el aumento en la variabilidad de las medidas de elongación de radícula e hipocótilo en el control negativo a lo largo del tiempo, son indicadores de la reducción de la vitalidad y envejecimiento de las semillas. En este caso se recomienda utilizar un nuevo lote de semillas. <sup>(16)</sup>

### **Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotóxicidad.**

Cada punto final se evalúa comparando el efecto generado en los organismos expuestos a la muestra con respecto a la respuesta en los organismos del control negativo, sujetos a las mismas condiciones de ensayo, excepto por la ausencia de muestra. Terminado el período de exposición (120 horas), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocótilo. <sup>(16)</sup>

### **Interpretación de los resultados.**

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocótilo son efectos sub letales. La inhibición en la germinación podría considerarse como un efecto letal siempre y cuando podamos corroborar que finalizada la exposición a una muestra las semillas no

germinaron por muerte del embrión y que no existe simplemente un retraso en el proceso de germinación, manteniéndose la viabilidad de la semilla. Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el período de exposición la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el período de ensayo, sin renovar la exposición a la muestra, las semillas comienzan a germinar. La vitalidad de las semillas que no han germinado es posible verificarla mediante la prueba de tetrazolium para viabilidad, pudiendo de esta manera asignarle con certeza a la inhibición de la germinación, el valor e importancia de un efecto letal. No obstante esto, la inhibición en la germinación registrada al finalizar la prueba, se considera fitotoxicidad aunque el efecto en la germinación sea reversible. <sup>(16)</sup>

Otro aspecto a considerar es el mayor desarrollo en la elongación de la radícula o el hipocótilo en algunas muestras con respecto al control. La exaltación en un punto final u hormésis no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (por ejemplo Cu, Zn) a bajas concentraciones produzcan exaltación por ser micronutrientes vegetales, esta respuesta debe ser evaluada de manera conjunta con los efectos registrados en otras pruebas. En la aplicación de la prueba con semillas a muestras ambientales conjuntamente con otros organismos como parte de una bacteria, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocótilo o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la bacteria. <sup>(16)</sup>

### **3. Ensayo de toxicidad aguda con el cladócero *Daphnia magna*.**

#### **Principio de la prueba.**

Dentro del grupo de los cladóceros, las especies del género *Daphnia* son las más utilizadas como organismos de prueba o de referencia en pruebas de toxicidad. La amplia distribución geográfica, el importante papel que cumplen al interior de la comunidad zooplanctónica, la facilidad de cultivo en el laboratorio, la reproducción partenogenética (lo cual asegura una uniformidad de respuesta), y el corto ciclo de vida con la producción de un alto número de crías, han hecho de este grupo un ideal para la evaluación de toxicidad, a nivel universal. <sup>(17)</sup>

El género *Daphnia* se ubica dentro del orden cladóceros de la clase crustácea, y especies como *D. magna*, *D. pulex*, y *D. similis*, son utilizadas extensivamente en pruebas de toxicidad, por lo cual existe una extensa información sobre las técnicas de cultivo, los requisitos de temperatura, luz y nutrientes, así como su respuesta a muchos compuestos tóxicos. Específicamente, los ensayos de toxicidad con *D. magna*, permiten determinar la letalidad potencial de sustancias puras, aguas residuales domésticas e industriales, lixiviados, aguas superficiales o subterráneas, agua potable, y agua de poro de sedimentos, entre otros. <sup>(17)</sup>

En las pruebas de toxicidad con *D. magna*, neonatos menores de 24 horas de edad son expuestos a la muestra o compuesto a probar, por un período de 48 horas, al término del cual se cuantifica el número de organismos muertos. Con estos resultados se establece la proporción o porcentaje de mortalidad producida. <sup>(17)</sup>

### **Organismos de prueba.**

Las hembras partenogénicas de *D. magna* pueden obtenerse directamente de compañías proveedoras de materiales biológicos, quienes certifican la especie. También pueden ser obtenidas de otras fuentes como laboratorios especializados donde se llevan a cabo pruebas de toxicidad con este cladóceros o por medio de su recolección en campo; en estos casos la especie deberá ser identificada taxonómicamente. <sup>(17)</sup>

### **Expresión de resultados.**

Para el cálculo de la CL50 y sus respectivos límites de confianza al 95% se utiliza el método Probit, ya sea manualmente o con ayuda de paquetes estadísticos que tengan este procedimiento. <sup>(17)</sup>

### **Determinación de Coliformes Totales y Fecales: Numero más probable.**

Los Coliformes son considerados un grupo de microorganismo que se encuentran comúnmente en el suelo, aguas superficiales y plantas. También están presentes en los intestinos de los animales y humanos. Son usadas como indicadores en pruebas de agua porque su presencia señala que organismos pueden estar presentes en el agua. <sup>(13)</sup>

### **Toma de muestra para análisis microbiológico:**

Las muestras que se tomaran para el análisis deben de ser representativas para poder determinar así su calidad microbiológica. Hay normas para la toma de muestras de agua según sus distintas procedencias (grifos, pozos, depósitos, lagos, ríos, manantiales, etc.). Para su recogida deben utilizarse frascos estériles y deben recolectarse cantidades comprendidas entre 500 y 1000 mL. En todos los casos los envases se llenaran por completo para excluir el aire. Cuando se estime probable que el agua a analizar contenga trazas de cloro, cloraminas y ozono, será necesario neutralizar su efecto bacterisida en el momento del muestreo. Para ello se añadirá una cantidad suficiente de sulfato sódico. Para un volumen de 250 mL son suficiente 0.2 mL de una solución acuosa al 3% de tiosulfato sódico. Su análisis debe comenzar antes de que haya transcurrido 6 horas desde el momento de toma de la muestra. En circunstancias excepcionales las muestras pueden conservarse a una temperatura de 4°C durante un periodo máximo de 24 horas. <sup>(13)</sup>

### **Bacteria Coliforme:**

Incluye *E. Coli* y otras bacterias que se asemejan morfológicas y fisiológicamente. Estos microorganismos con frecuencia difieren entre sí en características pequeñas. Las bacterias Coliformes suelen encontrarse en el aparato digestivo del hombre y animales. *E. Coli* rara vez se encuentra fuera del intestino. <sup>(13)</sup>

Las bacteria Coliformes son bacilos cortos, gran negativos que fermentan la lactosa y forman ácido y gas. Son anaerobios facultativos se multiplican a mayor rapidez a

temperaturas entre 30 y 37°C, crecen en grandes cantidades en medios corrientes como caldo y agar. <sup>(13)</sup>

La colonia de *E. coli* en agar E.M.B (Eosina y azul de metileno), tienen 2 a 4 mm de diámetro, un centro grande de color oscuro e incluso negro, y tienen brillo verde metálico cuando se observan con luz refleja. <sup>(13)</sup>

Se considera que todas las bacterias Coliformes, tienen importancia en el agua desde el punto de vista sanitario, aunque muchos autores han tratado de diferenciar el tipo fecal (*E.coli*) y no fecal (*A. aurogenes*). <sup>(13)</sup>

### **Determinación de los Coliformes totales y fecales.**

Los Coliformes fecales son un subgrupo de los Coliformes totales capaz de fermentar la lactosa a 44°C en lugar de 37°C como lo hacen los fecales. <sup>(13)</sup>

Aproximadamente el 95% del grupo de los Coliformes presentes en heces están formados por *Escherichia coli* y cierta especie de *Klebsiella*. Y que los Coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Estos últimos se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta es la característica que diferencia a Coliformes fecales y totales. La capacidad de los Coliformes fecales de reproducirse en los intestinos de los animales homeotermicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad. Desde hace mucho tiempo se han utilizados como indicador de contaminación fecal. Su presencia se interpreta como una indicación de que los organismos patógenos pueden estar presentes y su ausencia indica que el agua se halla exenta de organismos productores de enfermedades. <sup>(13)</sup>

### **Prueba Presuntiva:**

Para determinar estos Coliformes se va a utilizar el método de cultivo BGBB (dispuesto en tubo), que es un medio selectivo y de enriquecimiento ya que inhibe el crecimiento de microorganismos distintos de los del grupo de Coliformes a la vez que permite que éstos crezcan sin restricción, se distribuye el medio en nueve tubos (tres series de tres tubos) con diez mililitros cada uno de medio de cultivo y agregando 10 mL del agua a la primera serie de tubos, 1 mL de agua a la segunda serie y 0,1 mL a la tercera. Colocaremos en cada tubo una campana Durham para recoger el gas producido y el medio de cultivo se le habrá añadido un indicador ácido-base. Estos tubos se incuban a la temperatura correspondiente según se trate de Coliformes Totales o Fecales durante 24 horas. <sup>(13)</sup>

Los Coliformes son lactosa positiva, es decir, son capaces de fermentar la producción de ácido y gas, estos signos serán los que buscaremos. La reacción será positiva cuando se produce desprendimiento de gas en la campana de Durham por lo menos en un 10% de su capacidad, y el medio vira de color amarillo debido a la formación de ácido. <sup>(13)</sup>

Una reacción positiva por débil que sea, indicara la presencia de Coliformes y habrá que hacer las pruebas confirmativas de IMViC. Se aplicará la técnica del número más probable (NMP). <sup>(13)</sup>

**Método del Número Más Probable para serie de diluciones en replicas de tres por nivel de dilución**

<b>Combinación de tubos positivos.</b>	<b>NMP/100ml.</b>
<b>0-0-0</b>	<b>&lt;3</b>
<b>0-0-1</b>	<b>3</b>
<b>0-1-0</b>	<b>3</b>
<b>0-2-0</b>	<b>-</b>
<b>1-0-0</b>	<b>4</b>
<b>1-0-1</b>	<b>7</b>
<b>1-1-0</b>	<b>7</b>
<b>1-1-1</b>	<b>11</b>
<b>1-2-0</b>	<b>11</b>
<b>2-0-0</b>	<b>9</b>
<b>2-0-1</b>	<b>14</b>
<b>2-1-0</b>	<b>15</b>
<b>2-1-1</b>	<b>20</b>
<b>2-2-0</b>	<b>21</b>
<b>2-2-1</b>	<b>28</b>
<b>2-3-0</b>	<b>-</b>
<b>3-0-0</b>	<b>23</b>
<b>3-0-1</b>	<b>39</b>
<b>3-0-2</b>	<b>64</b>
<b>3-1-0</b>	<b>43</b>
<b>3-1-1</b>	<b>75</b>
<b>3-1-2</b>	<b>120</b>
<b>3-2-0</b>	<b>93</b>
<b>3-2-1</b>	<b>150</b>
<b>3-2-2</b>	<b>210</b>
<b>3-3-0</b>	<b>240</b>
<b>3-3-1</b>	<b>460</b>
<b>3-3-2</b>	<b>1,100</b>
<b>3-3-3</b>	<b>2,400</b>

### **Recuento de Bacterias aerobias mesófilas.**

Las bacterias aerobias mesófilas constituyen un grupo de microorganismos capaces de crecer en un rango de 30 a 37°C. <sup>(27)</sup>

La cuantificación de microorganismos por conteo de colonias, ha sido ampliamente utilizada para determinar poblaciones microbianas viables en el agua, este procedimiento está basado en la presunción de que cada célula microbiana en una muestra se formara a simple vista, con colonias separadas cuando son mezcladas con agar u otro medio solido que permita su crecimiento. <sup>(27)</sup>

El objetivo de este método es el determinar la presencia y la cantidad de bacterias aerobias mesófilas en las muestras analizadas. <sup>(27)</sup>

### **Aplicación.**

Este método puede ser utilizado para cualquier tipo de muestra, con excepción de ciertos productos, donde interviene el proceso de fermentación, tales como ciertos quesos y embutidos, yogurt o de “maduración” natural, ya que estos dan cifras muy elevadas de bacterias. <sup>(27)</sup>

### **Principios y Fundamentos del método.**

El método de conteo de colonias provee una estimación del número de microorganismos viables en una muestra de acuerdo al medio empleado y el tiempo y la temperatura de incubación. <sup>(27)</sup>

Las células microbianas a menudo se encuentran como conjuntos o grupos de células, por tanto, la muestra y las diluciones homogenizadas pueden uniformemente distribuir los conjuntos de bacterias, ya que estos grupos no pueden ser disgregados completamente por ellos mismos. <sup>(27)</sup>

Consecuentemente, cada colonia aparece en el Agar puede aparecer como grupo de células libres y deben ser referidas como Unidades Formadoras de Colonia (UFC).<sup>(27)</sup>

### **Procedimiento:**

- Tomamos 1 ml de la muestra y lo llevamos a un tubo de ensayo que contiene 9 ml de solución de fosfato monobásico de potasio; solución ( $10^{-1}$ ).
- Luego tomamos 1 ml de la solución de concentración  $10^{-1}$  y lo llevamos a otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de fosfato monobásico de potasio para obtener una solución de concentración  $10^{-2}$ .
- De la solución de concentración  $10^{-2}$  tomamos 1 ml y lo llevamos a otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de fosfato monobásico de potasio para obtener una solución de concentración  $10^{-3}$ .
- Tomamos 1 asada de cada una de las 3 diluciones y lo colocamos en una placa petri por duplicado con agar TSC.
- Incubamos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24hrs
- Finalmente tomamos una asada de la dilución  $10^{-3}$  y sembramos en agar cetrimide, medio selectivo para *pseudomona aeruginosa*.
- Incubamos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24hrs

### **Ensayos fisicoquímicos para evaluar la calidad del agua:**

#### **1. Método Colorimétrico Simple para determinar desde 2 p.p.m de plomo en solución acuosa mediante la reacción de proceso de sulfhidración.**

El procedimiento estándar para extraer el plomo soluble consiste en los siguientes pasos:

- a. Se prepara una solución de ácido acético al 4%, tomar de este 50 mL y aforar con agua de grifo a 100 mL.
- b. Se deja la solución para que repose durante 24 horas a temperatura ambiente. Y en este punto la solución está lista para el análisis sobre su contenido de plomo.<sup>(18)</sup>

Además del método colorimétrico visual que se propone, existen varios métodos para cuantificar el plomo disuelto en la solución. El método de la ditizona es uno de los más conocidos, otros métodos están basados fundamentalmente en la utilización de equipos de absorción óptica o atómica. <sup>(18)</sup>

### **Descripción del método:**

Al utilizar el procedimiento estandar para extraer los compuestos de plomo descrito anteriormente, el ácido acético diluido reacciona con los constituyentes de la solución acuosa (agua) produciendo entre otros, acetato de plomo. El acetato de plomo es soluble en agua y la solución final es incolora. <sup>(18)</sup>

El método propuesto consiste básicamente en precipitar el plomo del acetato como sulfuro de plomo, obteniéndose una coloración que tiende a ser más oscura a medida que el contenido de plomo en la solución es mayor. La determinación cuantitativa del contenido de plomo se logra mediante la comparación visual de la muestra problema con una serie de muestras patrón de concentración conocida. <sup>(18)</sup>

### **Preparación de la muestra patrón.**

- a. Se colocan 1.285 grs. De acetato de plomo en un matraz aforado de 1000 ml Y se afora con agua destilada agitando hasta disolver el acetato de plomo. Esta solución contendrá 1000 p.p.m. de plomo (solución A). <sup>(18)</sup>
  
- b. Se toman 20 ml de la solución A y se aforan a 1000 ml para obtener la solución B con 20 p.p.m. de plomo. De ésta última (solución B) se toman 10, 20, 30, 40 Y 50 ml aforando a 100 ml en cada caso, con lo que se obtienen las muestras patrón de 2, 4, 6, 8 Y 10 p.p.m. respectivamente. <sup>(18)</sup>

### **Proceso de Sulfhidración.**

El dispositivo para sulfhidrarse se ilustra en la figura 1 y se procede de la siguiente manera, se colocan 200 grs. Aproximadamente de pirita de hierro en el matraz (I), en el matraz (II) se agregan 150 ml de agua y por último se añade por el embudo de vidrio colocado en el matraz (I) ácido clorhídrico diluido 50% en volumen. Obteniéndose de esta manera ácido sulfhídrico gaseoso. <sup>(18)</sup>

Las muestras patrón deberán sulfhidrase burbujeando cada una de ellas hasta precipitar por completo el sulfuro de plomo. Se obtienen coloraciones que van del amarillo claro (2 p.p.m.) al café (10 p.p.m.). <sup>(18)</sup>

Para analizar el contenido de plomo soluble, se sigue el procedimiento estandar descrito anteriormente y la solución final se sulfhidra hasta que ya no precipite más sulfuro de plomo, a continuación el color de esta muestra se compara visualmente con las muestras patrón que han sido ya preparadas, determinándose de esta manera la concentración de plomo soluble de la muestra problema. <sup>(18)</sup>

Si la coloración de la muestra estudiada es más oscura que la muestra patrón de 10 p.p.m. deberán hacerse diluciones sucesivas hasta poder determinar la concentración de plomo. Es importante hacer notar que la coloración de las soluciones en estudio y las patrón cambian con el tiempo, por lo que se recomienda hacer las determinaciones en el momento de preparar las muestras patrón, de tal forma que la determinación se efectúe en un tiempo no mayor de 1 hora. <sup>(18)</sup>

## **2. Método por espectroscopia molecular UV-Vis (Método de la ditizona).**

### **Principio.**

Se mezcla una muestra acidulada que contenga cantidades del orden de microgramos de plomo con solución reductora amoniacal de citrato-cianuro y se extrae con ditizona en cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) para formar con ditizonato de plomo de color rojo cereza. Se mide

fotométricamente el color de la solución de color mixta. El volumen de muestra tomada para el análisis será de 2 l cuando se emplea digestión. <sup>(19)</sup>

### **Interferencias.**

La ditizona forma complejos coloreados con bismuto,  $\text{Sn}^{2+}$  y  $\text{Tl}^{+}$ , en solución amoniacal débil de cianuro (pH 8,5 a 9,5). En solución amoniacal fuerte (pH 10 a 11,5) de citrato-cianuro, los ditizonatos de estos iones son inestables y sólo se pueden extraer parcialmente. Este método utiliza una extracción única de ditizona, de color mixto, y pH elevado. La interferencia de  $\text{Sn}^{2+}$  y  $\text{Tl}^{+}$  se reduce posteriormente cuando estos iones se oxidan durante la digestión preliminar. Una modificación del método permite la detección y eliminación de la interferencia de bismuto. Las cantidades excesivas de bismuto, talio y estaño pueden eliminarse. La ditizona en  $\text{CHCl}_3$  absorbe a 510 nm; contrólese su interferencia mediante el empleo de concentraciones aproximadamente iguales de ditizona en exceso en muestras, patrones y blancos. <sup>(19)</sup>

El método carece de interferencia para la determinación de 0,0 a 30,0 mg Pb en presencia de 20 mg  $\text{Tl}^{+}$ , 100 mg  $\text{Sn}^{2+}$ , 200 mg  $\text{In}^{3+}$ , así como 1000 mg de cada uno de los siguientes :  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{As}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{V}^{3+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ . Cantidades del orden de gramos de metales alcalinos no interfieren. Existe una modificación para evitar la interferencia de cantidades excesivas de bismuto o estaño. <sup>(19)</sup>

### **Tratamiento preliminar de la muestra:**

En el momento de la toma de muestra acidúlese con  $\text{HNO}_3$ . Añádanse 5 ml de solución 0.1 N de yodo para evitar las pérdidas de compuestos orgánicos de plomo volátiles durante la manipulación y digestión de las muestras. Prepárese un blanco de agua destilada libre de plomo y trátese según el procedimiento completo. <sup>(19)</sup>

**Concentración mínima detectable:**

1.0 mg Pb/ 10 ml de solución de ditizona.

**Selección del método.**

El método espectrométrico de absorción atómica tiene un límite de detección relativamente alto en la modalidad de llama (FAAS) y requiere un procedimiento de extracción de las bajas concentraciones comunes en el agua potable; el método de absorción atómica electrotérmico (ETAAS) es mucho más sensible para las bajas concentraciones y no requiere extracción. El método de plasma acoplado inductivamente (ICP) tiene una sensibilidad similar a la del método de absorción atómica de llama (FAAS). El método de ditizona es sensible y específico como procedimiento colorimétrico (UV-Vis).<sup>(19)</sup>

**3. Espectroscopia de Absorción Atómica.**

Mientras que la mayoría de las técnicas espectroscópicas se utilizan para el estudio y caracterización de moléculas o iones en su entorno cristalino, la espectroscopía de emisión y absorción atómica se usa casi exclusivamente para el análisis de átomos. Por consiguiente, la técnica resulta casi insuperable como método de análisis elemental de metales. En principio, la espectroscopía de emisión puede utilizarse para la identificación y para la determinación cuantitativa de todos los elementos de la tabla periódica.<sup>(20)</sup>

Cuando la transición se produce desde el estado fundamental hasta un estado excitado del átomo mediante la absorción de radiación de una determinada frecuencia (característica para cada átomo), estamos en el caso de las técnicas de absorción. En el caso en que los átomos se lleven previamente a un estado excitado y se mide la intensidad de la radiación emitida a la frecuencia característica correspondiente a la transición desde el estado excitado al estado fundamental, hablamos de técnicas espectrofotométricas de emisión. A continuación se tratan las técnicas espectrofotométricas de absorción atómica, de fotometría de llama y de emisión por plasma.<sup>(20)</sup>

Pueden identificarse tres clases diferentes de procesos de emisión que difieren en cómo la sustancia alcanza el estado excitado previo a la emisión. <sup>(20)</sup>

- a) Emisión a partir de una excitación electromagnética.
- b) Emisión a partir de excitación térmica.
- c) Emisión a partir de excitación eléctrica.

### **Fotometría de llama.**

Es una técnica de emisión que utiliza una llama como fuente de excitación y un fotodetector electrónico como dispositivo de medida. Se trata principalmente de un método de análisis cuantitativo y es uno de los métodos más sencillos y precisos para el análisis de metales alcalinos, la mayor parte de los metales alcalinotérreos y algún otro elemento metálico. También es posible realizar un análisis cualitativo examinando todas las longitudes de onda del espectro de emisión (espectrofotometría de llama o fotometría de llama). Su aplicación es limitada si se compara con la espectroscopía de emisión ordinaria, ya que la energía de la llama permite excitar únicamente de 30 a 50 elementos, siendo este número función del tipo de llama utilizada. La muestra debe estar disuelta. <sup>(20)</sup>

### **4. Espectrofotometría de absorción atómica.**

Es una técnica muy relacionada con la fotometría de llama ya que se utiliza una llama para atomizar la disolución de la muestra de modo que los elementos a analizar se encuentran en forma de vapor de átomos. Ahora bien, en absorción atómica existe una fuente independiente de luz monocromática, específica para cada elemento a analizar y que se hace pasar a través del vapor de átomos, midiéndose posteriormente la radiación absorbida. <sup>(20)</sup>

Dada la estrecha relación existente entre absorción atómica y fotometría de llama es inmediata una comparación entre ellas. En fotometría de llama la sensibilidad es proporcional al número de átomos que se han excitado, mientras que, en absorción atómica

la sensibilidad depende del número de átomos que se encuentran en el estado fundamental. Normalmente, tan sólo un pequeño porcentaje de átomos se encuentran en estado excitado en la llama. Por lo tanto, la absorción atómica da lugar, en general, a una mayor sensibilidad que la fotometría de llama para un gran número de elementos. <sup>(20)</sup>

Además, la absorción atómica es una técnica que presenta menos interferencias y es más simple que la fotometría de llama, lo que explica el espectacular desarrollo de la técnica en los últimos años. Hay que señalar que a pesar de ello, la absorción atómica no ha eliminado el uso de la fotometría, sino que ambos métodos deben considerarse complementarios, siendo la sensibilidad de cada uno de ellos superior a la del otro para determinados elementos. <sup>(20)</sup>

Las ventajas fundamentales de la utilización de la llama como fuente de excitación son que los espectros son muy sencillos y que los resultados cuantitativos tienden a ser más reproducibles. Los espectros son sencillos debido a la baja energía de excitación de la llama que da lugar a pocas líneas de emisión. Este hecho hace disminuir el problema de las interferencias espectrales a partir de líneas y bandas de otros elementos y además no implica la necesidad de un monocromador de elevada resolución. La mayor reproducibilidad de estos métodos se debe al mejor control de las variables en una excitación por llama. <sup>(20)</sup>

Las dos desventajas más importantes de los métodos de emisión en llama son que la energía de excitación es demasiado baja para la mayoría de los elementos y que la muestra debe estar disuelta. En absorción atómica la baja energía no es una desventaja tan importante ya que la misión de la llama, en ese caso, es únicamente atomizar la muestra y formar un vapor de átomos sin excitar; por esta razón es aplicable a un mayor número de elementos que la fotometría de llama. <sup>(20)</sup>

## 5. Marcha Analítica de Metales Pesados.

El procedimiento o esquema de separación y de identificación de los iones que se encuentran en una muestra dada, se conoce como marcha analítica. Una marcha analítica involucra una serie de pasos basados en reacciones químicas, en donde los iones se separan en grupos que poseen características comunes. <sup>(21)</sup>

La marcha analítica de cationes es una técnica de análisis cualitativo que permite la separación e identificación de los cationes presentes en una muestra. Consiste en una serie de pasos sistemáticos basados en reacciones químicas las cuales permiten en primer lugar separar cada catión constituyente de la muestra aprovechando ciertas propiedades particulares como lo es la solubilidad y el pH, y en segundo lugar identificarlos mediante reacciones específicas de cada catión. <sup>(22)</sup>

Los cationes son clasificados en cinco grupos de acuerdo a su comportamiento frente a ciertos reactivos, principalmente frente al ácido clorhídrico, sulfuro de hidrógeno, sulfuro de amonio y carbonato de amonio. La clasificación se basa en si la reacción entre los cationes y el reactivo promueve o no la formación de un precipitado, es decir, se basa en la diferencia de solubilidades de los cloruros, sulfuros y carbonatos formados. Los cinco grupos que constituyen la marcha analítica de cationes son los siguientes:

**Grupo I:** Este grupo está constituido por iones plata ( $\text{Ag}^+$ ), mercurioso ( $\text{Hg}_2^{2+}$ ) y plomo ( $\text{Pb}^{2+}$ ), los cuales se caracterizan por formar precipitados en presencia de ácido clorhídrico diluido. <sup>(22)</sup>

**Grupo II:** Los iones que conforman este grupo generan precipitados al hacerlos reaccionar con sulfuro de hidrógeno en un medio ligeramente ácido. Los cationes que integran el mismo son: mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ), cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ), bismuto ( $\text{Bi}^{3+}$ ), cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ), antimonio III y V ( $\text{Sb}^{3+}$  y  $\text{Sb}^{5+}$ ), arsénico III y V ( $\text{As}^{3+}$  y  $\text{As}^{5+}$ ) y estaño II y IV ( $\text{Sn}^{2+}$  y  $\text{Sn}^{4+}$ ). A su vez,

dichos cationes se clasifican en dos subgrupos: el subgrupo Iia que incluye los primeros cuatro cationes y el subgrupo Iib que incluye los seis cationes restantes. <sup>(22)</sup>

**Grupo III:** Este grupo está integrado por los iones cobalto ( $\text{Co}^{2+}$ ), níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), hierro II y III ( $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ ), cromo ( $\text{Cr}^{3+}$ ), aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ), zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) y manganeso ( $\text{Mn}^{2+}$ ). En este grupo los cationes precipitan al hacerlos reaccionar con sulfuro de amonio en medio neutro o amoniacal. <sup>(22)</sup>

**Grupo IV:** Conformado por los cationes calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), estroncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) y bario ( $\text{Ba}^{2+}$ ) los cuales reaccionan con carbonato de amonio en presencia de cloruro de amonio en medio neutro o ligeramente ácido para generar un precipitado. <sup>(22)</sup>

**Grupo V:** Este grupo está conformado por aquellos cationes comunes que no reaccionan con los reactivos mencionados en los grupos anteriores. Estos cationes son: el litio ( $\text{Li}^+$ ), el magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ), el sodio ( $\text{Na}^+$ ), el potasio ( $\text{K}^+$ ), el hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) y el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). <sup>(22)</sup>

### Proceso Experimental:

1. Tomar un tubo de ensayo con la disolución por analizar. Esta disolución puede contener todos o algunos de los cationes de metales pesados:  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}_2^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , además de otros iones de distinta naturaleza. <sup>(23)</sup>
2. Echar unas gotas de  $\text{HCl}$  2N en el tubo de ensayo. Todos los metales pesados precipitarán en forma de cloruros (no solubles en frío) de color blanco. <sup>(23)</sup>
3. Colocar un embudo con filtro sobre un vaso de precipitado. Decantar el contenido del tubo de ensayo sobre el filtro. Enjuagar el tubo llenándolo con agua destilada y decantando en el filtro. Los cloruros metálicos quedan retenidos en el filtro

mientras que el resto de la disolución (ya sin metales) cae en el vaso de precipitado.  
(23)

4. Calentar agua destilada en un vaso de precipitado con el mechero hasta que empiece a ebullición. Decantar el agua sobre el filtro con un vaso de precipitado limpio debajo. El cloruro de plomo  $PbCl_2$  es soluble en caliente pero los cloruros de mercurio  $Hg_2Cl_2$  y plata  $AgCl$  no lo son y permanecen en el filtro. <sup>(23)</sup>
5. Para comprobar que el plomo ha pasado a la disolución, echamos unas gotas de cromato de potasio en el vaso. Si existe plomo, se formará cromato de plomo de plomo  $PbCrO_4$  que da un precipitado amarillo. <sup>(23)</sup>

## Material y Método.

**Tipo de Estudios:** Estudio de Tipo Experimental.

**Área de Estudio:** Edificio de la Facultad de Ciencias Químicas, UNAN-León. (Agua de Grifo del área de lavado del laboratorio de microbiología, área de descanso del laboratorio Mauricio Díaz Müller, área de la cafetería de decanatura de ciencias químicas y el área de la cafetería del departamento de farmacia industrial).

**Universo de Estudio:** Agua de los diferentes grifos, áreas e instalaciones del edificio de la Facultad de Ciencias Químicas.

**Tamaño de la Muestra:** Agua de 4 áreas de los diferentes departamentos de la Facultad de Ciencias Químicas

### Criterios de Inclusión:

Los puntos de toma de la muestras para el estudio, estén en el área de la Facultad.

Las muestras tienen que ser de grifos donde tomen agua para consumo.

### Criterios de Exclusión:

Los puntos de toma de la muestras para el estudio, que no estén en el área de la Facultad.

Las muestras no tienen que ser de grifos donde no se tome agua para consumo.

### Variables:

- ▲ Existencia de Coliformes Totales y Fecales en agua.
- ▲ Presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas.
- ▲ Inhibición del crecimiento con el bioensayo de toxicidad del *Allium Cepa L.*
- ▲ Reacción del proceso de la marcha analítica de cationes del grupo I.

**Operacionalización de Variables.**

<b>Variable</b>	<b>Concepto</b>	<b>Indicador</b>	<b>Escala</b>
<b>Identificación de Coliformes Totales y Fecales en agua.</b>	Método para la detección y enumeración en agua de organismos <i>Coliformes Totales</i> , organismos Coliformes Fecales prueba presuntiva mediante el cultivo de un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de sus números más probables en la muestra.	Presencia o ausencia de turbidez.  Presencia o ausencia de gas.	NMP/mL
<b>Recuento de microorganismos viables aerobios Mesófilos.</b>	Es la determinación del número de unidades formadoras de colonias de bacterias anaerobias que a partir de 1 g o ml que se desarrollan en agar TSC	<10 UFC/ml la muestra se acepta. >300 UFC/ml la muestra se rechaza	UFC/ml
<b>Bioensayo de Toxicidad del <i>Allium Cepa L.</i></b>	Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo, después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 horas.	Crecimiento de raíces.  Inhibición del crecimiento de las raíces.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cm</li> <li>• %</li> </ul>
<b>Método de la marcha analítica de cationes del grupo I.</b>	Es un proceso de identificaciones para iones inorgánicos en una dilución mediante reacciones químicas en las cuales se produce la formación de complejos o sales de color único y característico.	Cambio de color.	Color Amarillo.

**Reactivos y Cristalería:**

Material	Equipos	Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Beakers de 100 y 500 ml</li> <li>✓ Balones de 50, 100, 250 y 1000ml</li> <li>✓ Probeta de 100 ml</li> <li>✓ Erlenmeyer 250 ml con sus respectivos tapones de hule</li> <li>✓ Gradilla</li> <li>✓ Tubos de ensayo</li> <li>✓ Embudo de vidrio</li> <li>✓ Espátula</li> <li>✓ Tubos de vidrio de 5 mm de diámetro.</li> <li>✓ Pipeta de 25 y 10 ml</li> <li>✓ Bisturí</li> <li>✓ Regla milimetrada</li> <li>✓ Placas petri</li> <li>✓ Asa</li> <li>✓ Mechero</li> <li>✓ Fósforo</li> <li>✓ Papel Aluminio</li> <li>✓ Campana Durham</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Campana de extracción de gases</li> <li>✓ Balanza analítica: Modelo: Sartorius Serie TE214S</li> <li>✓ Incubadora doble a 36°C Precisión Scientific Modelo: 6M</li> <li>✓ Autocable para esterilizar los medios de cultivo Pelton Crane cód: 61139</li> <li>✓ Autoclave para descontaminar cód: 61143</li> <li>✓ Cocina Corning Hot Plate PC-100</li> <li>✓ Baño Maria CMS 392-159.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Acido Clorhídrico concentrado</li> <li>✓ Agua destilada</li> <li>✓ Sulfato de cobre II <math>\text{Cu}(\text{SO}_4)</math> 0.02 M</li> <li>✓ Acido Acético glacial 4%</li> <li>✓ Agua de grifo</li> <li>✓ Caldo lactosado</li> <li>✓ Caldo <i>E. Coli</i></li> <li>✓ Agar Triptica Soya.</li> <li>✓ Agar Cetrimide.</li> </ul>

## **Procedimiento:**

### **1. Recolección de la muestra:**

Nos presentamos en cada una de las instalaciones y áreas en donde tomamos las muestras del agua de grifo.

Procedimos a recolectar estas muestras usando el equipo necesario, guantes, nazobuco, gorro y gabacha para evitar cualquier tipo de contaminación. Las muestras fueron tomadas directamente del grifo con mucho cuidado antes, durante y después de la recolección. El borde del grifo se desinfecto con alcohol y se flameo durante un minuto para eliminar posibles impurezas presente en los diferentes grifos. Recolectamos un litro de agua en recipientes de vidrio de las cuatro diferentes áreas en estudio, estos recipientes fueron esterilizados previamente y se taparon y enumeraron respectivamente cada una de ellas.

### **2. Preparación de las muestras.**

Una vez que realizamos el ensayo microbiológico, las aguas restantes las almacenamos.

### **3. Ensayo Microbiológico para detectar presencia de Coliformes totales y fecales.**

#### **Test presuntivo para Coliformes:**

Preparamos las muestras y disoluciones siguientes:

- a) Elaboramos una disolución 1:10 en el laboratorio y de ella se sacaron disoluciones 1:100 y 1:1000.
- b) Incubamos 9 tubos de caldo lactosado (3 diluciones y 3 tubos de dilución).
- c) Agitamos suavemente cada tubo para una adecuada disolución con el medio de cultivo.
- d) 3 tubos con 10 ml de caldo lactosado y 10 ml de la muestra.
- e) 3 tubos con 5 ml de caldo lactosado y 1 ml de la muestra.
- f) 3 tubos con 5 ml de caldo lactosado y 0.1 ml de la muestra.

- g) El tiempo entre la preparación de la muestra y su inoculación en el medio no fue mayor de 15 min.
- h) Se incubaron a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

#### **Test confirmativo para Coliformes:**

Los tubos que resultaron positivos a las 24 o 48 horas en el test presuntivo se transfirieron al caldo BVB para confirmar Coliformes.

- a) Se mezclaron por agitación el tubo del test presuntivo con caldo BVB.
- b) Se incubaron los tubos BVB a  $37^{\circ}\text{C} \times 48\text{h} \pm 2\text{hrs}$ .

Al final observamos la ausencia de efervescencia en los tubos de fermentación de caldo BVB.

#### **4. Identificación de de Bacterias Aerobias Mesófilos.**

- a) Tomamos 1 ml de la muestra y lo llevamos a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de solución de fosfato monobásico de potasio; solución ( $10^{-1}$ ).
- b) Luego tomamos 1 ml de la solución de concentración  $10^{-1}$  y lo llevamos a otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de fosfato monobásico de potasio para obtener una solución de concentración  $10^{-2}$ .
- c) De la solución de concentración  $10^{-2}$  tomamos 1 ml y lo llevamos a otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de fosfato monobásico de potasio para obtener una solución de concentración  $10^{-3}$ .
- d) Incubamos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24hrs.
- e) Posterior a la incubación tomamos dos asada y se replicaron por duplicado de cada una de las diluciones y lo colocamos en una placa petri con agar TSC.
- f) Incubamos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24hrs
- g) Finalmente tomamos dos asada de la dilución  $10^{-3}$  y se replicaron por duplicado en agar cetrimide, medio selectivo para *pseudomona aeruginosa*.

h) Incubamos a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  por 24hrs

### 5. Procedimiento Bioensayo de Toxicidad Aguda para la determinación de minerales con *Allium cepa L.*

- a) Las cebollas fueron compradas en el mercado de la ciudad de Masaya.
- b) En el laboratorio precedimos a lavarlas con agua destilada, secarlas y pelarlas con ayuda de un bisturí, retiramos varias capas hasta dejarlas aproximadamente de 1.5 cm de diámetro y también cortamos las raíces que estas presentaban dejando únicamente el primordio central.
- c) Preparamos una solución de sulfato de cobre II 0.02 M que fue nuestra solución patrón.
- d) Como blanco utilizamos agua destilada.
- e) Luego preparamos diluciones de las muestras de las 4 diferentes aéreas de la facultad a concentraciones de 0.25 ml/ml, 0.5 ml/ml, 0.75 ml/ml y 1 ml/ml.
- f) Se llenaron cada uno de los tubos de ensayo, teniendo 8 replica por cada dilución.
- g) Colocamos los bulbos de cebolla en el borde de cada uno de los tubos de ensayo de tal manera que el primordio estuviese en contacto con las soluciones.
- h) Tomando en cuenta las condiciones del ensayo, durante el tiempo de la prueba rellenamos los tubos dos veces al día durante 72 horas.
- i) Cumplidas las 72 horas medimos la longitud de las raíces una por una luego calculamos el promedio de las replicas de cada una de las concentraciones de cada muestra.
- j) Por último obtuvimos el porcentaje de inhibición, usando la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{\text{Long. de control} - \text{Log. de la muestra}}{\text{Long. de control}} \times 100$$

### 6. Método de la marcha analítica de cationes del grupo I.

- a) Preparamos una solución 2N de HCl, colocando en un balón de 50ml, 8.27ml de HCl puro y lo aforamos con agua destilada.

- b) Preparamos una solución 6N de HCl, colocando en un balón de 50ml, 24.83ml de HCl puro y lo aforamos con agua destilada.
- c) Colocamos 3ml de agua de una de una de nuestras muestras en un tubo de ensayo, y le agregamos 1ml de HCl 2N.
- d) Filtramos esta solución y lavamos el papel filtro con agua caliente.
- e) Finalmente le agregamos 2 gotas de  $K_2MnO_4$ .
- f) Observamos el cambio de color del agua.
- g) Realizamos este procedimiento para cada una de nuestras 4 muestras con las dos diferentes normalidades del HCl.

### **Procesamiento y análisis de la información:**

Cuando terminamos de realizar cada una de las pruebas experimentales y obtivimos los resultados, graficamos e interpretamos los mismos, utilizando los programas de Microsoft Office 2010 y Microsoft Word 2010.

**RESULTADOS Y ANALISIS.****1. Ensayo microbiológico para determinación de Coliformes totales y fecales por el método del Número Más Probable.****Tabla N° 1****Prueba presuntiva para Coliformes Fecales y Totales.**

<b>Agua de las diferentes áreas de la Facultad de Ciencias Químicas</b>			
<b>Numero de Mx.</b>	<b>10<sup>1</sup></b>	<b>10<sup>2</sup></b>	<b>10<sup>3</sup></b>
<b>1</b>	Neg.	Neg.	Neg.
<b>2</b>	Neg.	Neg.	Neg.
<b>3</b>	Neg.	Neg.	Neg.
<b>4</b>	Neg.	Neg.	Neg.

Lectura: Muestra 1: Agua del Laboratorio de Microbiología. Muestra 2: Agua del Laboratorio Mauricio Díaz Müller. Muestra 3: Agua del área de Decanatura. Muestra 4: Agua del Departamento de Farmacia Industrial.

Se calculó la densidad microbiana utilizando el método del número más probable, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, para la determinación de bacterias Coliformes totales y bacterias Coliformes fecales esta prueba consiste básicamente en la capacidad de este grupo microbiano en fermentar la lactosa con la producción de ácido y gas al incubarlo.

En esta tabla mostramos los resultados de esta prueba microbiológica, observándose ausencia total en cada una de las diluciones de las diferentes muestras recolectadas en las instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas. De acuerdo a estos resultados las muestras cumplen con los requisitos de calidad microbiológica para el agua potable, permitiéndonos así, clasificarlas por medio de esta prueba como agua apta para el consumo humano.

Tabla N° 2

## Determinación de Bacterias Aerobias Mesófilas.

Agua de las diferentes áreas de la Facultad de Ciencias Químicas				
Numero de Ms.	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	Observación
1	-	-	-	Ausencia
2	+	+	+	>300 UFC/ml <i>Presencia de Pseudomona aeruginosa</i>
3	-	-	-	Ausencia
4	+	+	+	>300 UFC/ml <i>Presencia de Pseudomona aeruginosa.</i>

Lectura: Muestra 1: Agua del Laboratorio de Microbiología. Muestra 2: Agua del Laboratorio Mauricio Díaz Müller. Muestra 3: Agua del área de Decanatura. Muestra 4: Agua del Departamento de Farmacia Industrial. (+) Presencia de bacterias aerobias mesófilas. (-) Ausencia de bacterias aerobias mesófilas.

Para el recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas de las muestras a analizar se tomo dos asadas y se replicaron por duplicado en agar cetrimide, para determinar la presencia de *Pseudomona aeruginosa* por la coloración fluorescente que presentaron los tubos con solución de Fosfato Monobásico de Potasio Ph 7 y las placas que contenían agar TSC estas muestras se incubaron a 37°C ± 1 por 48 horas posterior a la incubación se valoro la fluorescencia, característica de este tipo de bacterias, obteniendo como resultado la presencia de *Pseudomona aeruginosa*. En la muestra dos y en la muestra cuatro.

Por medio de esta prueba microbiológica, podemos rechazar la muestra 2 y la muestra 4 según los estándares y reglamentos existentes en relación a la calidad del agua, clasificando estas muestras como no aptas para el consumo humano dado que la patogenicidad de este tipo de bacterias es elevado, y clasificada como una de las principales causas de infecciones en la piel y tejidos blandos, neumonía adquirida en la comunidad, sepsis e infecciones localizadas.

Tabla No 3.

**Bioensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa* L mediante la inhibición del crecimiento promedio de sus raíces.**

N° De Re.	Muestra No 1.				Muestra No 2.				Muestra No 3.				Muestra No 4.				P.	B.
	Concentración ml/ml																	
	0.25	0.5	0.75	1	0.25	0.5	0.75	1	0.25	0.5	0.75	1	0.25	0.5	0.75	1		
1	1	1.2	0.2	0.4	0.8	1	0.5	0.5	0.6	0.4	0.2	0.3	0.8	0.5	0.5	1	0.1	0.9
2	0.6	0.3	0.3	0.3	2.1	0.9	0.5	0.5	0.7	0.7	0.5	0.2	0.7	0.4	0.8	0.3	0	2.3
3	0.9	0.6	0.8	0.4	1.3	0.8	1	0.2	0.3	2.3	0.1	0.3	0.4	0.7	0.6	0.5	0	2
4	0.6	0.6	0.4	0.4	0.8	0.6	0.3	0.2	1.8	0.4	0.3	0.2	1.3	0.5	0.5	0.3	0.2	0.8
5	0.5	0.5	0.5	0.2	0.2	0.5	1.2	0.3	0.6	0.7	0.2	0.3	0.8	0.5	0.4	0.4	0.1	0.7
6	0.4	0.6	0.3	0.4	2	1.3	0.3	0.4	1.1	0.1	0.4	0.4	0.4	0.9	0.6	0.4	0	0.9
7	1.4	0.4	0.2	0.2	0.4	0.4	0.3	0.3	0.8	1	0.4	0.2	0.3	0.5	0.5	0.5	0.1	1.2
8	0.9	0.7	0.6	0.5	1	0.5	0.4	0.5	0.9	0.4	0.8	0.3	0.2	0.7	0.5	0.5	0	1
Pro	0.78	0.6	0.41	0.35	1.19	0.75	0.56	0.36	0.85	0.75	0.36	0.27	0.6125	0.58	0.55	0.49	0.06	1.21
%	35.7	50	66.3	71.4	12.2	38.7	54.08	70.40	30.61	38.77	70.41	77.55	50	52.04	55.10	60.20	0	0

Lectura: Muestra 1: Agua del Laboratorio de Microbiología. Muestra 2: Agua del Laboratorio Mauricio Díaz Müller. Muestra 3: Agua del área de Decantura. Muestra 4: Agua del Departamento de Farmacia Industrial.

En este bioensayo se evaluó la presencia de metales pesados en las muestras de agua de las cuatro diferentes áreas de la Facultad de Ciencias Químicas, mediante la inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium cepa L.*

Se utilizó una concentración patrón que fue una solución de sulfato de cobre y un blanco usando para esta agua destilada.

Los resultados de esta prueba nos demuestran que las concentraciones de cada una de las diluciones de nuestras cuatro muestras, causan una importante inhibición del crecimiento de las raíces de nuestra especie, en comparación con nuestro blanco en el cual el crecimiento es mayor, y nuestro patrón nos demuestra el crecimiento casi nulo de las raíces de *Allium cepa L.* Por lo tanto a mayor concentración de muestra, mayor será el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces.

El bioensayo de toxicidad de *Allium cepa L.* nos refleja la presencia de forma cualitativa de plomo, en cada una de las muestras de las diferentes áreas de la Facultad de Ciencias Químicas, tomando en cuenta la toxicología clínica del plomo en el cuerpo humano como son enfermedades del tracto urinario, degeneración axónica, alteraciones menstruales, infertilidad, alteraciones en las funciones cardíacas, hepáticas, tiroideas, afectaciones al sistema nervioso y enfermedades gastrointestinales todo esto por la concentración de plomo en la sangre determinamos que ninguna de las muestras en estudio son aptas para el consumo humano.

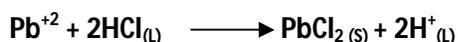
**Tabla No 4.****Método de la Marcha Analítica.**

Muestra Problema	¿Presencia de plomo?
I	Si
II	Si
III	Si
IV	Si

Lectura: Muestra 1: Agua del Laboratorio de Microbiología. Muestra 2: Agua del Laboratorio Mauricio Díaz Müller. Muestra 3: Agua del área de Decanatura. Muestra 4: Agua del Departamento de Farmacia Industrial.

El procedimiento de este método analítico nos brindó por su naturaleza un resultado cualitativo, ya que fue mediante la presencia de una coloración amarillenta característica en cada una de las muestras, que nosotros pudimos identificar la presencia de plomo en cada una de ellas.

La reacción para la identificación de plomo es iónica y la solubilidad es directamente proporcional con la temperatura, por la naturaleza del dicromato de potasio que es mayormente soluble en caliente que en frío, la determinación de color amarillo se logró al agregar el identificador a las muestra con una temperatura mayor a los 37°C. Dicha reacción está dada en la siguiente ecuación:



Se da un precipitado de  $\text{PbCl}_2$  el cual es mucho mas soluble en caliente que en frío, el precipitado se trata con agua caliente para que en ella quede solubilizado el  $\text{PbCl}_2$ .



El  $\text{PbCl}_2$  disuelto, se identifica en caliente mediante una solución de  $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , este provee iones  $\text{CrO}_4$  para precipitar el  $\text{PbCrO}_4$  de color amarillo.

## Conclusiones.

Después de los resultados obtenidos y analizados del presente estudio concluimos que:

Se realizó el ensayo microbiológico del Número más probable y se comprobó la ausencia total de Coliformes fecales y totales en cada una de las muestras por lo tanto están dentro de los límites permisibles según lo declarado por el reglamento de la calidad de agua para consumo humano en esta prueba, sin embargo se determinó la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra 2 y 4, lo que implica que ambas muestras no son aptas para consumo humano por la alta patogenicidad de esta bacteria una vez que es ingerida y alojada en el cuerpo humano.

Mediante el bioensayo de toxicidad de *Allium cepa L.* Identificamos la presencia de metales pesados en las cuatro diferentes muestras por la clara inhibición del crecimiento de las raíces de cebolla, de tal manera que esta prueba nos permite clasificar el agua proveniente de estos 4 grifos como no aptas para el consumo humano.

En relación al método de la marcha analítica, las muestras en estudio presentaron trazas de plomo en su composición debido al evidente cambio de color que presentaron. Quedando clara la contaminación por este metal resultante de la composición y tiempo que llevan en función las tuberías e instalaciones de la Facultad de Ciencias Químicas.

Por lo tanto concluimos que de acuerdo a los resultados de cada uno de los ensayos realizados, el agua de grifo que actualmente se está consumiendo en el área de lavado del laboratorio de microbiología, área de descanso del laboratorio Mauricio Díaz Müller, área de la cafetería de decanatura de ciencias químicas y el área de la cafetería del departamento de farmacia industrial no son aptas para el consumo humano.

### **Recomendaciones.**

Posterior a la obtención de los resultados y conclusiones a que se llegó luego del presente trabajo investigativo sugerimos las siguientes recomendaciones:

1. Proponer el estudio para la identificación de diversos tipos de bacterias que puedan estar presente en el agua y causen un potencial daño a la salud humana.
2. Se recomienda que además de llevar acabo ensayos cualitativos para metales pesados en el agua se desarrollen ensayos que permitan cuantificar las concentraciones de cada uno de estos metales.
3. Sugerimos la utilización de aparatos de purificación y/o filtración para cada uno de los grifos destinados al agua de consumo humano.

### **Bibliografía.**

1. Guías para la calidad del agua potable [recurso electrónico]: incluye el primer apéndice. Vol. 1: Recomendaciones. Tercera edición. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3\\_es\\_full\\_lowres.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3_es_full_lowres.pdf)  
Revisado: 16/02/14.
2. Zumaeta M.A. (2004). Manual para Análisis básicos de Calidad del agua de bebida. Disponible en: [http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/Biblioteca/Manuales\\_Guias\\_LibrosDW/manual%20 analisis%20basicos%20CA.pdf](http://www.bvsde.paho.org/CD-GDWQ/Biblioteca/Manuales_Guias_LibrosDW/manual%20 analisis%20basicos%20CA.pdf) Revisado: 16/02/14.
3. Pellerano, R. G. – Romero, C.H. – Acevedo, H.A. – Vázquez, F.A. (2005). Determinación de plomo en aguas superficiales por Espectrofotometría en Fase Sólida. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/8-Exactas/E-021.pdf>  
Revisado: 17/02/14.
4. López L. (1998). Estudios de Mutagenicidad, inhibición del crecimiento algal y contaminación química en aguas superficiales de un río urbano de Buenos Aires Argentina. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37014104>.  
Revisado: 16/02/14.
5. UNAN-León. (2008). Calidad de Agua y Salud en el Sector Rural Noroeste de León (Nicaragua). Disponible en: [http://www.ecodes.org/documentos/cooperacion/PMnov\\_2008.pdf](http://www.ecodes.org/documentos/cooperacion/PMnov_2008.pdf). Revisado: 17/02/14.
6. Caballero Y. (2007). Potencial Hidrológico y Calidad de las Aguas Superficiales en las Subcuencas de Río Ochomogo. Centro para la Investigación de Recursos

- Acuáticos de Nicaragua. (CIRA/UNAN). Managua. Disponible en: <http://www.cira-unan.edu.ni/media/documentos/ycaballero.pdf> Revisado: 17/02/14.
7. Rojas A; Mendoza E. (2013). Evaluación de la Calidad de Agua Potable Mediante Métodos Biológicos y Fisicoquímicos en Pozos Abastecedores del Municipio de Siuna. Revisado: 24/02/14.
  8. Barceló L; López A. (2003) Contaminación y Calidad del Agua: El problema de los contaminantes emergentes. Instituto de Investigaciones Química Ambientales-CSIC (Barcelona). Disponible en: <http://www.unizar.es/fnca/varios/panel/15.pdf> Revisado: 24/02/14
  9. Flores F.G (2007) Contaminación de agua. Disponible en internet: [http://www.ugr.es/~fgarcia/pdf\\_color/tema4%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf](http://www.ugr.es/~fgarcia/pdf_color/tema4%20%5BModo%20de%20compatibilidad%5D.pdf) Revisado: 08/03/14.
  10. Mejia M. (2005) Analisis de la calidad del agua para consumo humano y percepción local de las tecnologías apropiadas para su desinfección a escala domiciliaria, en la microcuenca. El Limon, San Jeronimo, Honduras. Disponible en: <http://orton.catie.ac.cr/REPDOC/A0602E/A0602E.PDF> Revisado: 08/03/14.
  11. Source: © 2010 Michigan State University and DQS-UL MSS, original at <http://www.fskntraining.org>, licensed using Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported. Disponible en: [http://fskntraining.org/sites/default/files/spanish/FSKN\\_04\\_Water-Quality-Traducci%C3%B3n.pdf](http://fskntraining.org/sites/default/files/spanish/FSKN_04_Water-Quality-Traducci%C3%B3n.pdf) Revisado: 08/03/14.
  12. Water Environment Federation-WEF. Sitio sobre promoción y avances de la calidad del agua en la industria. Disponible en: <http://www.wef.org> Revisado: 10/03/14.

13. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Instituto interamericano de cooperación para la agricultura. (2001). Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos. Disponible en:  
<http://books.google.com.ni/books?id=HcsOAQAIAAJ&pg=PR1&lpg=PR1&dq=manual+de+procedimientos+para+el+control+microbiologico+de+alimentos&source=bl&ots=u6jbiRBjYk&sig=6hFmU-lZQAu-sDjAQGZmXuYD4M&hl=es&sa=X&ei=gzWfU4OyLJG2sASUsYD4Cw&ved=0CCIQ6AEwAQ#v=onepage&q=manual%20de%20procedimientos%20para%20el%20control%20microbiologico%20de%20alimentos&f=false>. Revisado: 11/03/14.
14. Castro J.M. (2010). Análisis Microbiológico del agua. Disponible en:  
[http://www.upct.es/~minaees/analisis\\_microbiologico\\_aguas.pdf](http://www.upct.es/~minaees/analisis_microbiologico_aguas.pdf) Revisado 29/03/14. Revisado: 10/03/14.
15. Romero P. (2008). Ensayo Toxicológico para la Evaluación de Sustancias Químicas en Agua y Suelo. Disponible en:  
<http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/573.pdf> Revisado: 12/03/14.
16. Dsaz M; Ronco A. y Granados Y. (2004). Ensayos de toxicidad aguda con bulbos de cebolla *Allium Cepa L.* mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento de raíces. Disponible en:  
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap2.pdf> Revisado: 12/03/14.
17. Sobrero M. y Bronco M. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa L.* Disponible en:  
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap4.pdf> Revisado: 19/03/14.
18. Díaz M.C; Granados Y.P y Ronco A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con el cladóceros *Daphnia magna*. Disponible en:  
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap1.pdf> Revisado: 19/03/14.

19. Oíaz A, García J., Ocampo J. y Valdez A. (1997). Método Colorimétrico Simple para determinar plomo soluble en esmaltes cerámicos. Centro de Investigación de Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en: [http://rmf.smf.mx/pdf/rmf/26/3/26\\_3\\_525.pdf](http://rmf.smf.mx/pdf/rmf/26/3/26_3_525.pdf) Revisado: 19/03/14.
  
20. Xarxa Telemàtica Educativa de Catalunya. Método de Espectroscopia Molecular UV-Vis. (Método de la Ditizona). Disponible en: [http://www.xtec.cat/~gjimene2/llicencia/students/bscw.gmd.de\\_bscw\\_bscw.cgi\\_d32876665-1\\_Pb\\_6tecnicasanalisi.html](http://www.xtec.cat/~gjimene2/llicencia/students/bscw.gmd.de_bscw_bscw.cgi_d32876665-1_Pb_6tecnicasanalisi.html) Revisado: 19/03/14.
  
21. Martos F; Durán J; Román M; Nogueras M. (2004) Espectroscopia de Absorción Atómica. Disponible en: [http://www.xtec.cat/~gjimene2/llicencia/students/bscw.gmd.de\\_bscw\\_bscw.cgi\\_d32817116-3\\_AAS\\_final.html](http://www.xtec.cat/~gjimene2/llicencia/students/bscw.gmd.de_bscw_bscw.cgi_d32817116-3_AAS_final.html) Revisado: 22/03/14.
  
22. Fernández A.C. (2001). Análisis Cualitativo Marcha Analítica de Cationes. Disponible en: <file:///C:/Users/Franiela/Downloads/Marcha+analitica.desbloqueado.pdf> Revisado: 22/03/14.
  
23. Alexéiev, V.N. (1975); Curtman, Luís J. (1959). Practica Marcha Analítica de Cationes Grupos. Disponible en: [http://webdelprofesor.ula.ve/ingenieria/lauraitm/guiaLQA/Practica\\_2.pdf](http://webdelprofesor.ula.ve/ingenieria/lauraitm/guiaLQA/Practica_2.pdf) Revisado: 22/03/14.
  
24. Fundamentos de Química (2000). Reguladora de pH Analítica de Metales Pesados. Disponible en:

<http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/quimbiotec/FQpractica8.pdf>

Revisado: 29/03/14

25. Carrasco J; Centeno G; Chávez I. (2013). Determinación de la Calidad del Agua Mediante Indicadores Biológicos y Fisicoquímicos en la Comunidad el Paragua. Malpaisillo. León. Nicaragua. 29/03/14

26. Belmonte Viteri, C. A. (2009). Monitoreo de la calidad del agua del rio Caoní en el sector de Puerto Quito-Provincia de Pichincha (Doctoral dissertation, Universidad Internacional SEK). Disponible en: <http://repositorio.uisek.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/363/1/Monitoreo%20de%20la%20calidad%20del%20agua%20del%20rio%20Caon%C3%AD%20en%20el%20sector%20de%20Puerto%20Quito%20-%20Provincia%20de%20Pichincha>

Revisado: 29/03/14

27. Landis, W. G & Yu M. (2003). Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems (3a Ed.). Florida: Lewis Publishers. Disponible en: <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358027/358027/leccin36tiposdebioensayos.html> Revisado: 29/03/14

28. Ministerio de agricultura y ganaderia .(2001). Manual de procedimientos para el control microbiológico de alimentos. Disponible en: <http://books.google.com.ni/books?id=HcsOAQAIAAJ&pg=PR1&lpg=PR1&dq=manual+de+procedimientos+para+el+control+microbiologico+de+alimentos&source=bl&ots=u6ja9VBj-r&sig=YoLyjF92hbmCr1oOTlOdZs0Tw&hl=es&sa=X&ei=CdSCU7jlEanksATBjYDQDA&ved=0CC0Q6AEwAA#v=onepage&q=manual%20de%20procedimientos%20para%20el%20control%20microbiologico%20de%20alimentos&f=false>

Revisado: 30/03/04

# ANEXOS

**Tabla #1.****Límites máximos permisibles de parámetros microbiológicos.**

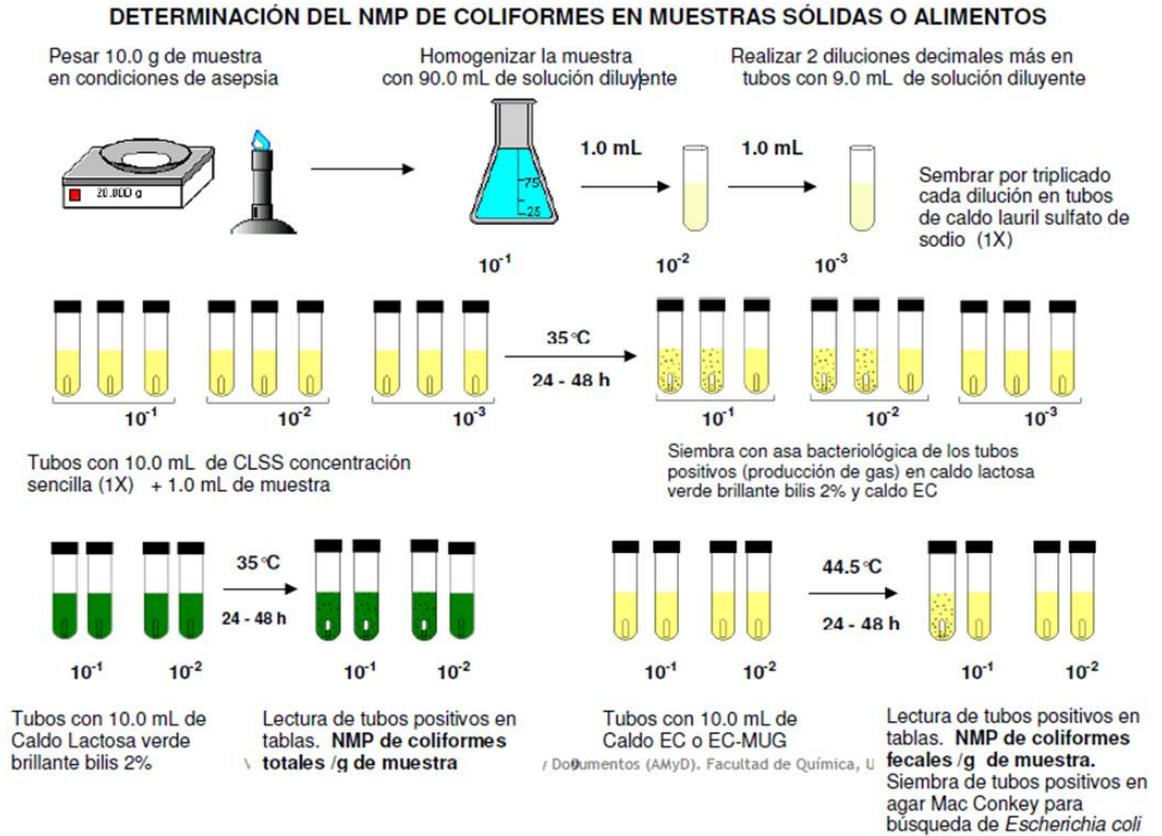
Origen	Parámetros	Límites de Medida	Valor recomendable	Valor admisible
Agua tratada.	Coliformes totales	NMP/100ml	Neg.	≤ 1
	Coliformes Fecales	NMP/100ml	Neg.	Neg.

**Tabla #2****Límites permisibles de parámetros microbiológicos para el agua potable.**

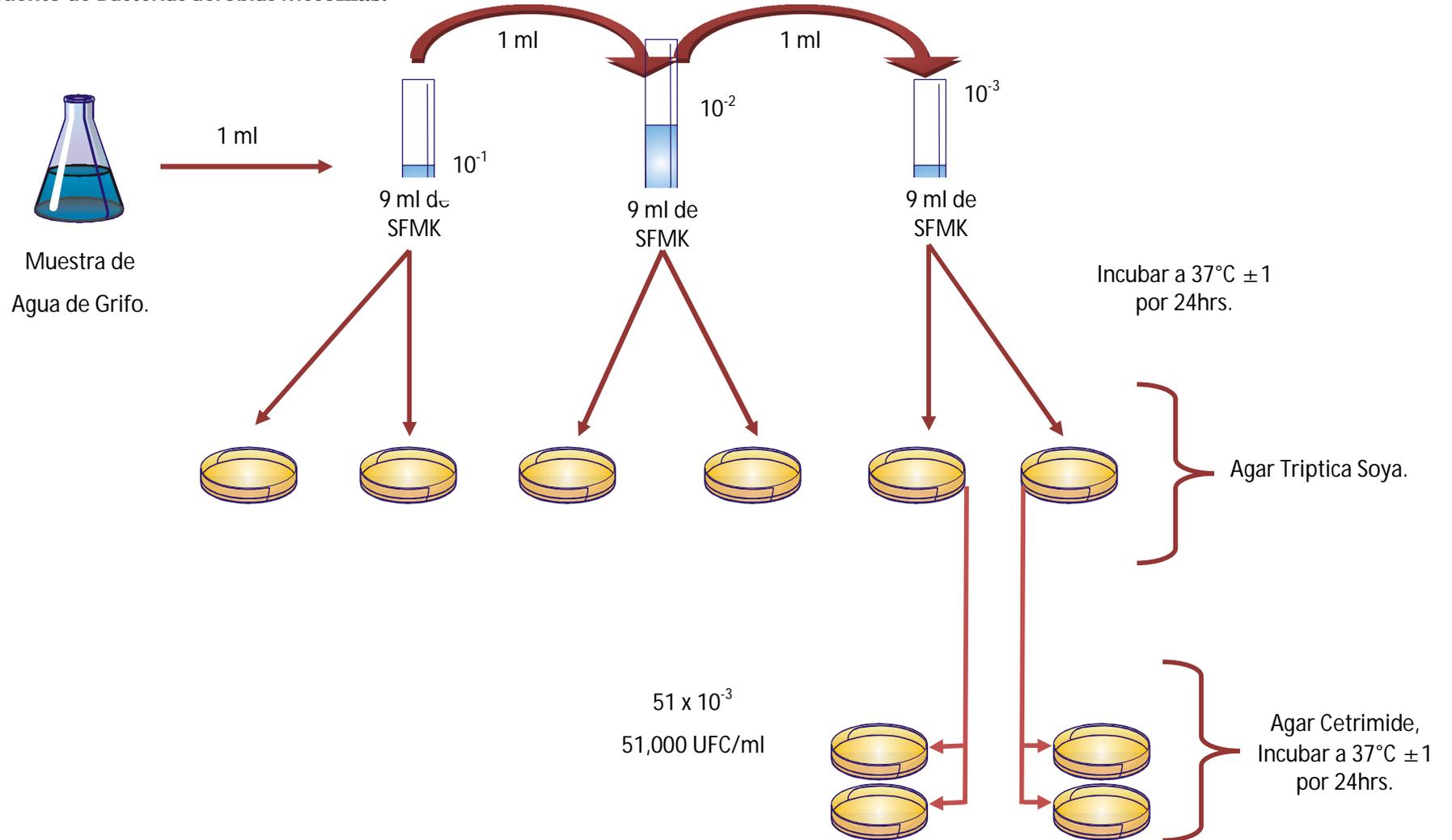
Parámetro	Límites permisible.
Bacterias Aerobias Mesofilas	500 UFC/ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausente/100ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausente/100ml

**Imagen #1.**

**Prueba Microbiológica del Número Más Probable.**



### Recuento de Bacterias aerobias Mesófilas.



### Imagen #3

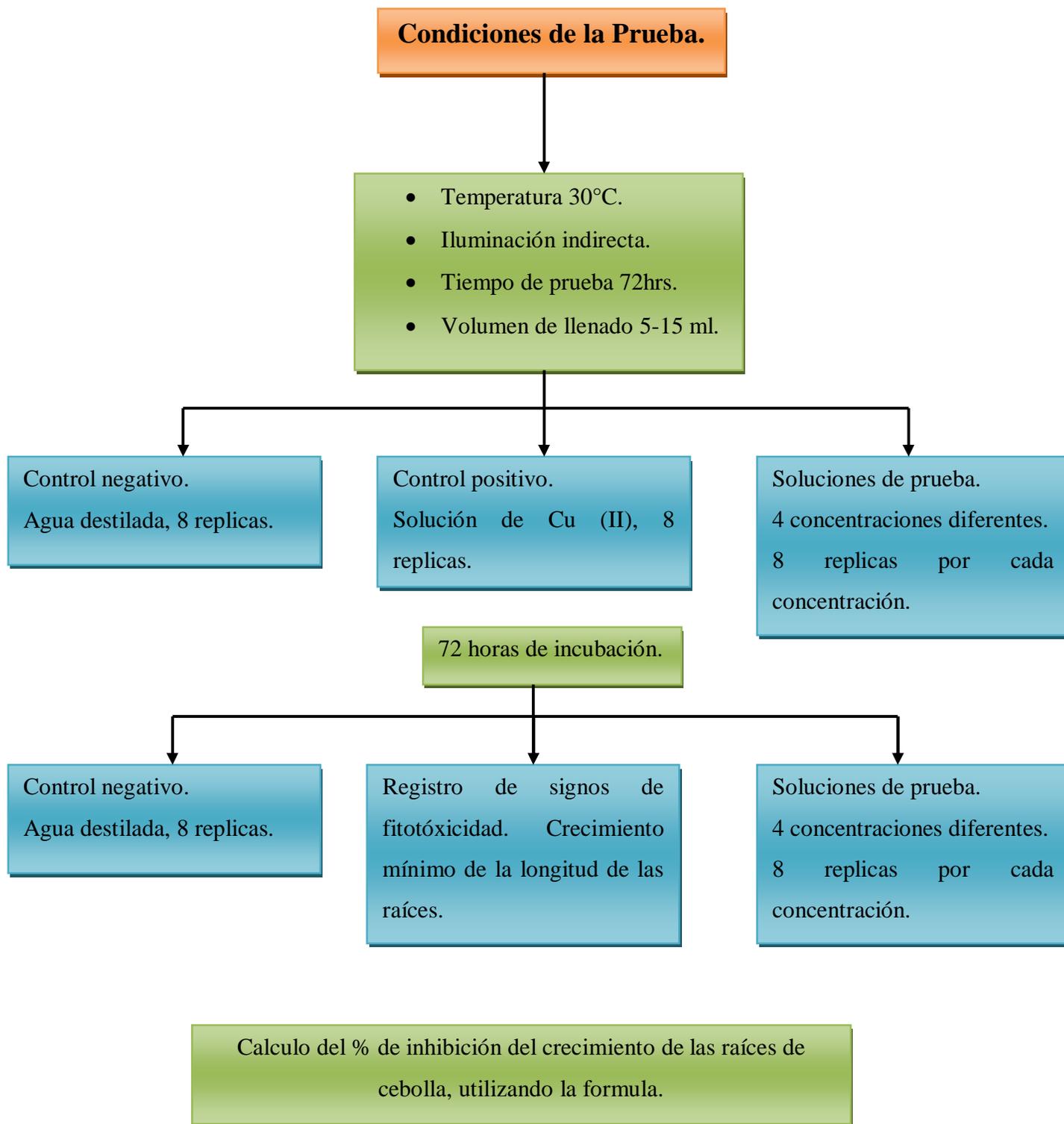
#### 1. Bioensayo de Toxicidad con *Allium Cepa L.*



1. Preparación de las diluciones.
2. Limpieza y pelado de bulbos.
3. Bulbos limpios y listos para colocarlos en los tubos de ensayo.
4. Ubicación de los bulbos en los tubos con exposición directa a las soluciones del bioensayo.
5. Relleno de los tubos con cada una de las soluciones.

6. Medición de la longitud de las raíces al finalizar el tiempo de exposición del bioensayo.

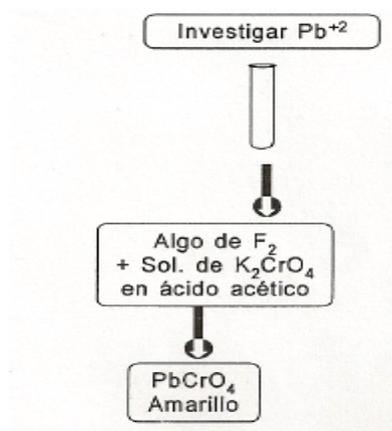
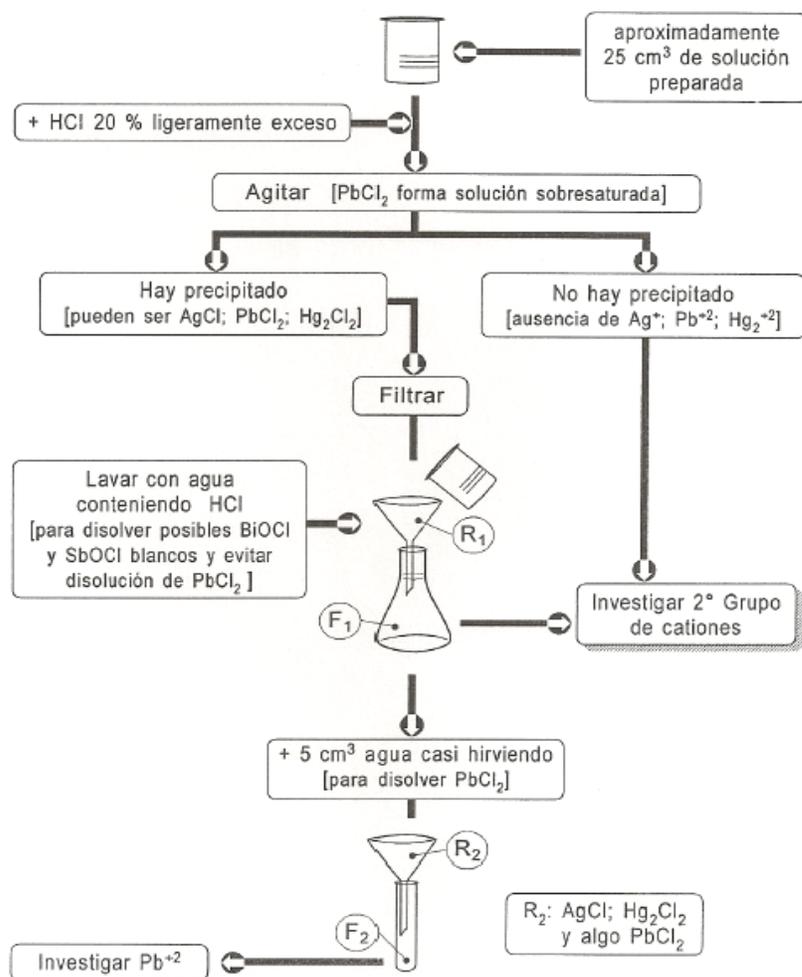
**Bioensayo de Toxicidad con *Allium Cepa L.***



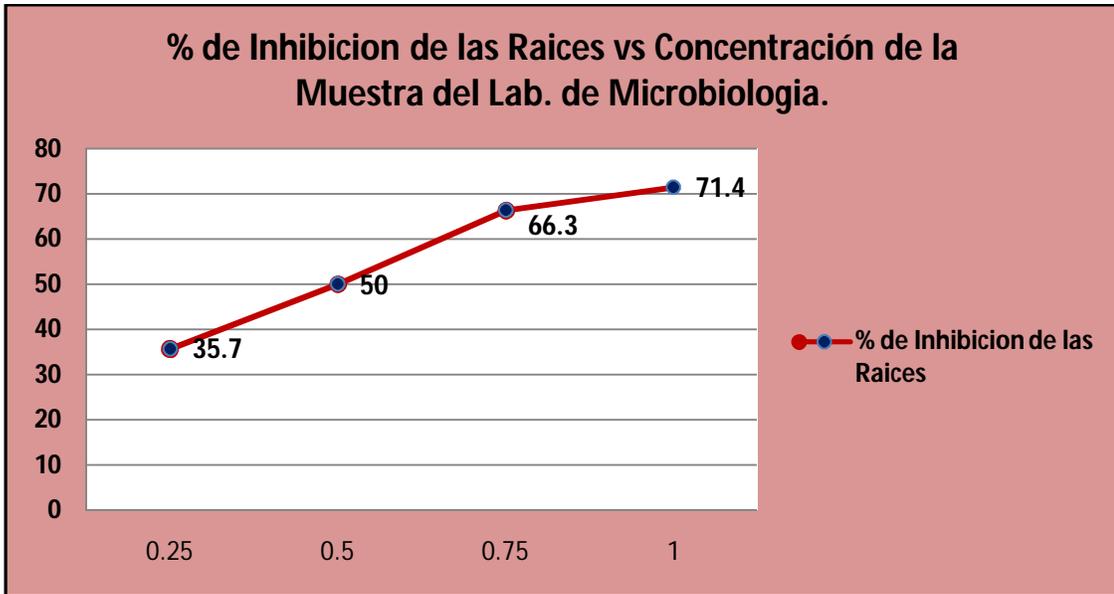


**Imagen #4**

**Método de la Marcha Analítica de Cationes del Grupo I.**



**Grafico #1.**



**Grafico #2.**

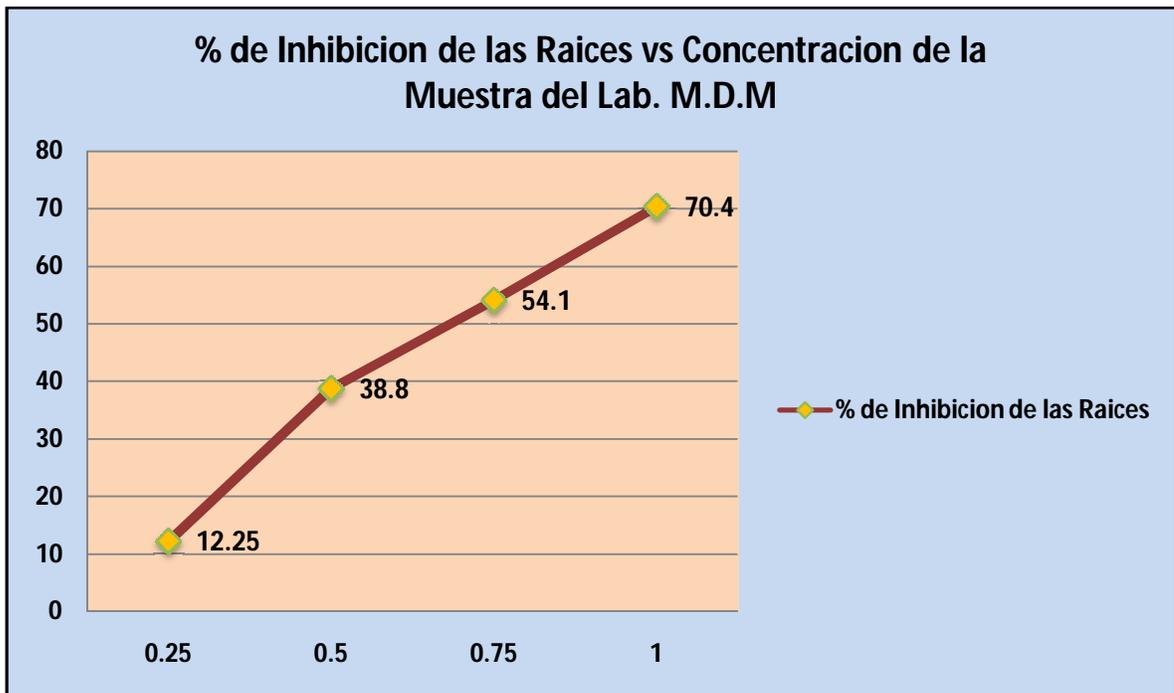


Grafico #3.

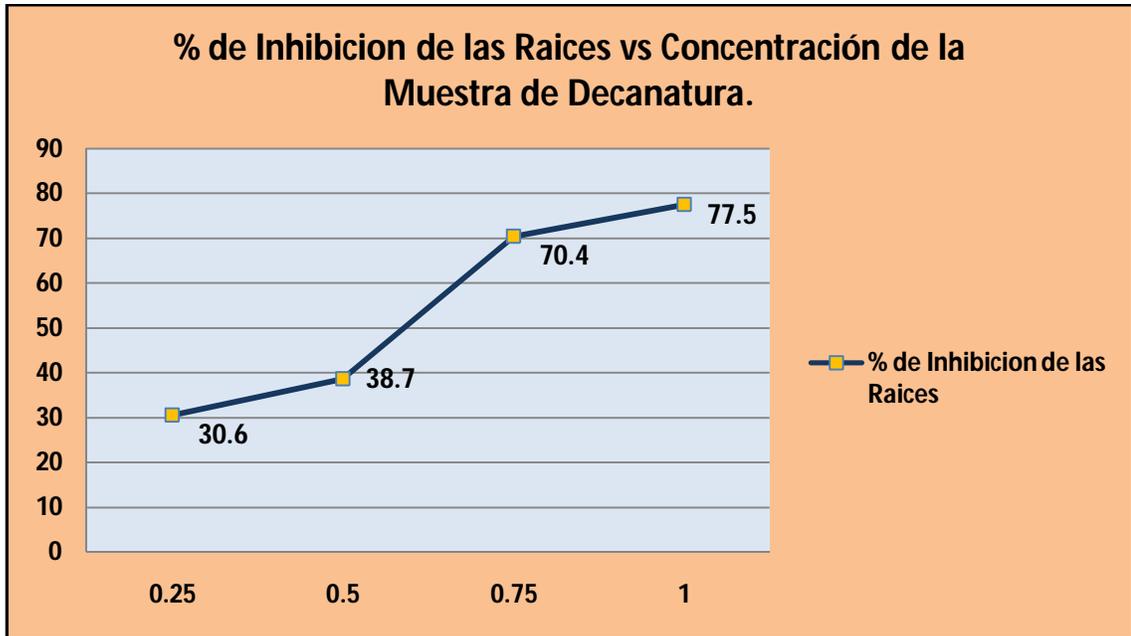
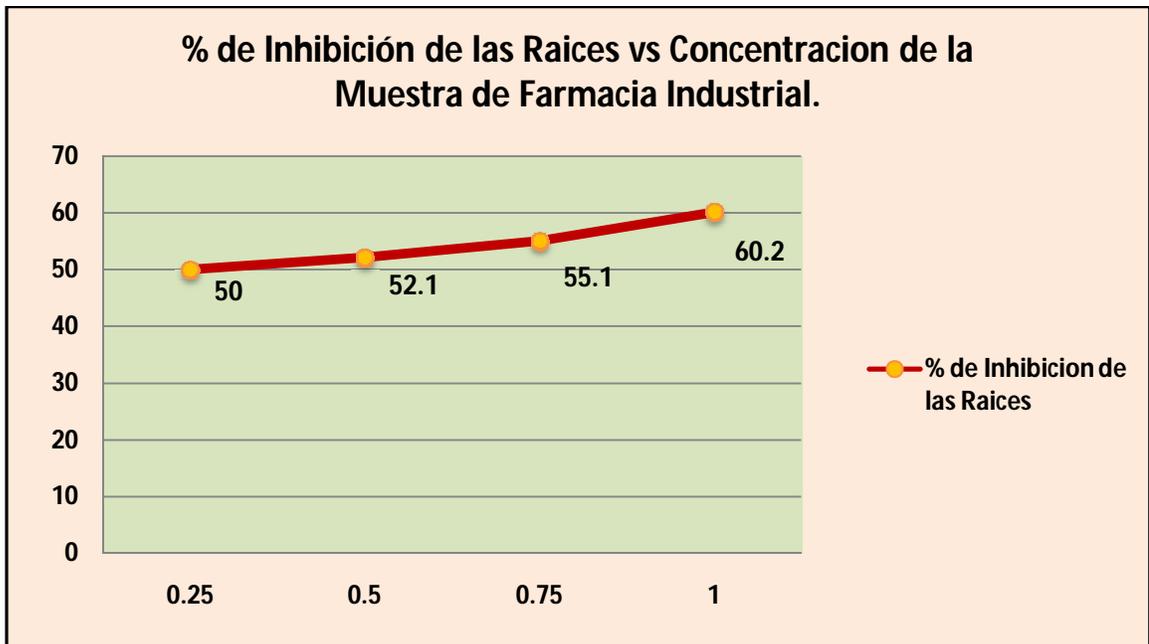


Grafico #4.



## Glosario

**Meristemático:** Dentro de los tejidos vegetales, los tejidos meristemáticos son los responsables del crecimiento vegetal.

**Genotóxico:** son agentes físicos (temperatura, luz ultravioleta, radiaciones ionizantes, radiaciones electromagnéticas, etc.) o productos químicos (agentes alquilantes, acridina, oxidantes, agentes redox, epóxidos alifáticos, etc.) capaces de alterar la información genética celular.

**Antropicos:** es decir, lo originado por la actividad humana (factores antrópicos, riesgos antrópicos, etc.).

**Hipocótilo:** es el término botánico usado para referirse a una parte de la planta que germina de una semilla.

**Hormesis:** fenómeno de respuesta a dosis caracterizado por una estimulación por dosis baja y una inhibición para dosis altas, que resulta en una curva de respuesta a nuevas dosis en forma de J o de U invertida.

**Tangible:** la palabra tangible se utiliza para nombrar lo que puede ser tocado o probado de alguna manera.

**Antropogénico:** El término antropogénico se refiere a los efectos, procesos o materiales que son el resultado de actividades humanas a diferencia de los que tienen causas naturales sin influencia humana.

**Fotoblástismo:** Respuesta de las semillas a la luz. Las semillas son fotoblásticas positivas cuando requieren luz para germinar y fotoblásticas negativas cuando su germinación se inhibe con la luz. Existen muchas semillas que son insensibles a la luz y se denominan indiferentes.

**Primordio:** estado todavía rudimentario en el cual se encuentra un organismo.

**Pirita:** mineral en pequeños tamaños, de forma irregulares.

**Plántula:** etapa del desarrollo del esporófito, que comienza cuando la semilla sale de su dormancia y germina.

**Lixiviados:** líquido resultante de un proceso de percolación de un fluido a través de un sólido. El lixiviado generalmente arrastra gran cantidad de los compuestos presentes en el sólido que atraviesa.

## Abreviaturas

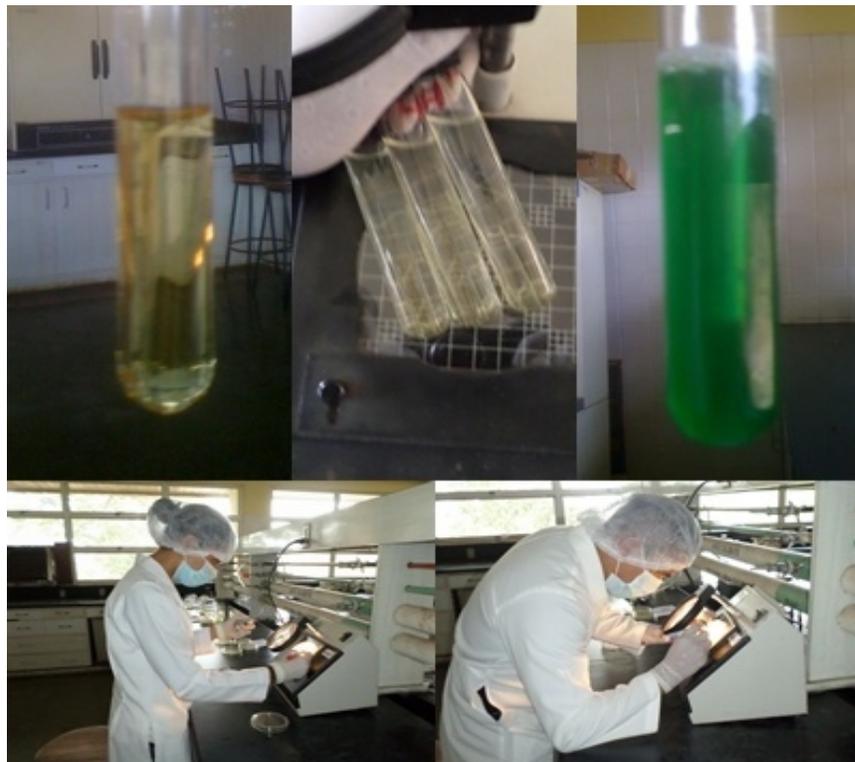
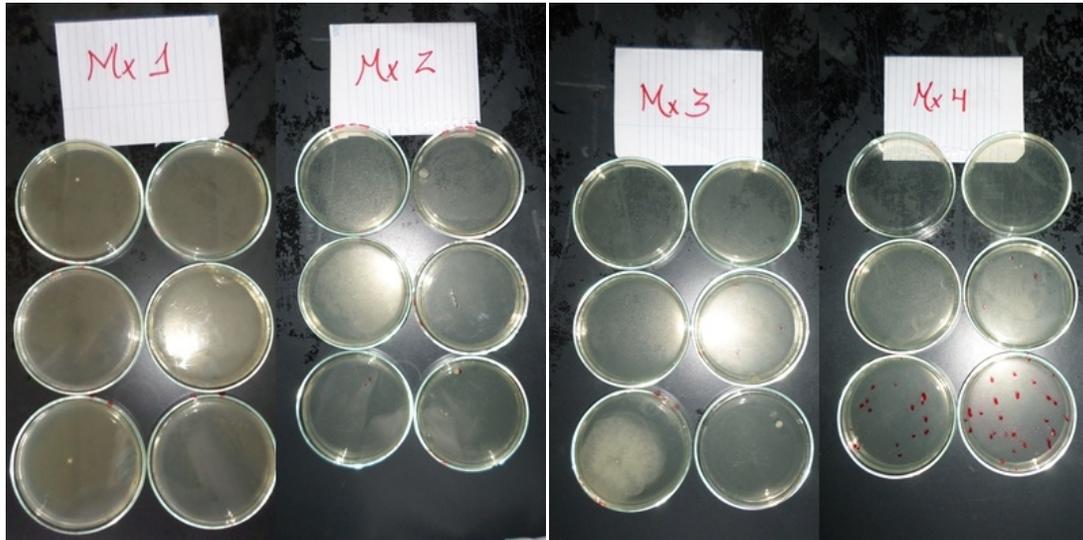
- **NMP:** Numero Más Probable.
- **ECODES:** Fundación ecológica y desarrollo.
- **CAPRE:** comité coordinador regional de instituciones de agua potable y saneamiento de Centroamérica.
- **CCME:** Canadian Council of Minister of the Environment.
- **PPM:** Partes por millón.
- **INVIC:** Prueba utilizada en microbiología para la identificación de bacterias. Se compone de cuatro pruebas: Indol, rojo de metilo, voges-proskauer y citrato. El resultado de este test se expresa mediante símbolos de positivo o negativo, según el resultado de cada prueba, siguiendo siempre el orden establecido por las iniciales del método.
- **FAAS:** sensibilidad similar de absorción atómica.
- **ETAAS:** Absorción atómica electrométrica.
- **ICP:** Plasma acoplado inductivamente.
- **BVB:** caldo bilis verde brillante.
- **BGGB:** brilliant green biles broth.

## Imágenes de los ensayos realizados.

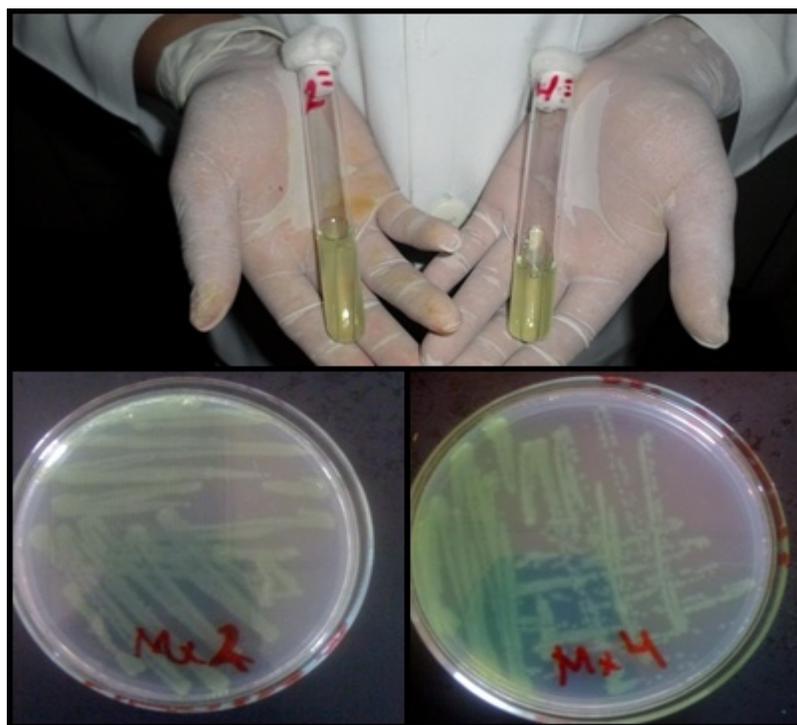
### 1. Recolección de las Muestras de Agua.



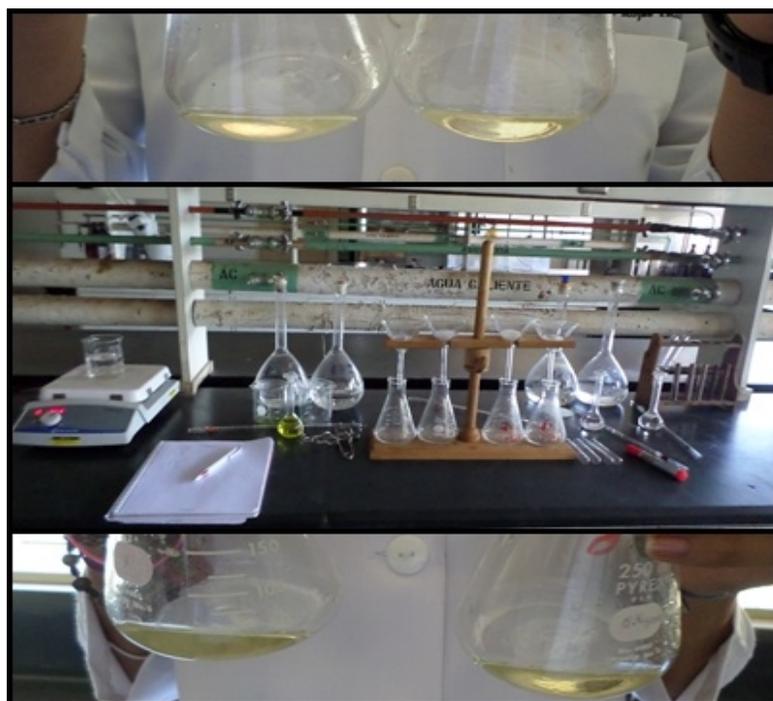
**2. Ensayo microbiológico para detectar Coliformes totales y fecales por el método del NMP.**



### 3. Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.



### 4. Método de la marcha analítica de cationes del grupo I.



5. Bioensayo de toxicidad *Allium cepa L.*

