

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA - León.
FACULTAD DE CIENCIA QUÍMICAS.
CARRERA DE FARMACIA.**



öA la Libertad por la Universidadö.

**Evaluación de la Calidad del Agua comercializada en bolsitas en la ciudad de León
mediante métodos Biológicos y Físico-Químicos, Marzo 2014.**

Monografía para optar al Título de Licenciado Químico Farmacéutico.

AUTORES:

- ✓ **Br. Jorge Eduardo García Cisneros.**
- ✓ **Br. Milagros del Socorro Jirón Quintanilla.**
- ✓ **Br. Noelia Mercedes Jirón Quintanilla.**

Tutora:

MSc. Gloria María Herrera

Julio, 2014.

2014: Por la Pertinencia y la Excelencia Académica.

ÍNDICE

✚	Introducción	1
✚	Planteamiento del Problema	8
✚	Objetivos	10
✚	Marco Teórico	12
✚	Diseño metodológico	48
✚	Resultados	57
✚	Análisis de Resultado	61
✚	Conclusión	66
✚	Recomendaciones	68
✚	Bibliografía	70
✚	Anexos	76

AGRADECIMIENTO

A Dios amadísimo padre lleno de amor y misericordia y a nuestra Madre Santísima que nos permiten coronar nuestros estudios y poder realizar nuestros sueños para aportar nuestros conocimientos adquiridos a nuestra sociedad a lo largo de estos años.

A nuestros Padres: por el don de la vida y su amor desinteresado que por su esfuerzo hemos logrado culminar nuestras metas de estudios.

A la MSc Gloria María Herrera por su dedicación y paciencia en transmitimos sus conocimientos y poder concluir con satisfacción nuestra monografía.

A los docentes hombres y mujeres que han sido pilares llenos de sabiduría, que nos regalaron la semilla del saber que hoy germina para florecer en nuestra sociedad. En especial a Gladys Rojas y David Espinoza por su apoyo incondicional y su tiempo brindado.

Jorge Eduardo García.
Milagros Jirón Quintanilla.
Noelia Jirón Quintanilla

DEDICATORIA

A Dios al padre celestial elevamos nuestro agradecimiento por permitirnos la oportunidad de tener una familia, el poder estudiar y concluir nuestros estudios universitarios.

A nuestra Madre Santísima de la Merced por ser la luz que ilumina nuestro camino y llena de saber nuestras vidas.

A nuestra Familia: Ligia y Noel por ser nuestros progenitores que nos regalaron la existencia, por darnos a conocer principios y valores, por brindarnos su apoyo en cada momento de nuestras vidas. A Roberto por sus lazos de hermandad.

A nuestros abuelos: Francisco Quintanilla y Roberto Jirón (q.p.d) que aunque no estén con nosotros sabemos que desde el cielo interceden por nosotras. Mercedes y Gloria Ardila por su amor y ejemplo para ser personas de bien.

A nuestros tíos por su apoyo incondicional, especialmente a Verónica Barrios por brindarnos su ayuda desinteresada a lo largo de estos años, por su dedicación y entrega hacia nosotras para lograr salir bien en nuestras clases.

A personas que no son de nuestra familia pero que siempre han estado con nosotras dándonos su apoyo incondicional, ánimos de seguir adelante y aconsejándonos en todos los momentos de nuestra vida.

Milagros del Socorro y Noelia Mercedes Jirón Quintanilla.

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen Santísima primeramente por haberme llenado de sabiduría durante mi vida y a lo largo de estos 5 años de estudios y poder finalizarlos.

A mi madre María Celia Cisneros por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por ser fuente de inspiración para superarme, para ser un buen hijo, buen hermano; alentándome cada día con su amor de madre, sin ella no hubiera llegado hasta este punto de mi vida, mi amor incondicional siempre estará contigo madre.

A mi tía Nicolasa de los Ángeles Cisneros, por ayudarme en todo los aspectos tanto económicamente, como emocionalmente, que desde largo me apoya incondicionalmente para lograr mis metas.

A mi hermanos María de la Concepción García Cisneros, Julio Cesar Téllez Cisneros y Sergio Ramón Téllez Cisneros por su apoyo y por su sabiduría a lo largo de estos años.

A mi papá que me apoyó siempre en las buenas y en las malas.

Gracias por todo sin ustedes no hubiera llegado hasta donde he llegado.

Jorge Eduardo García Cisneros.



INTRODUCCIÓN



Al agua se le conoce como el solvente universal porque disuelve más sustancias que cualquier otro líquido. Esto significa que el agua en su recorrido (ya sea por nuestro cuerpo o en la tierra), irá disolviendo y tomando consigo a su paso compuestos importantes, nutrientes y minerales.²⁰

El agua es la única sustancia natural que se encuentra presente en los tres estados físicos (líquido, sólido y gaseoso) a las temperaturas que se presentan en la Tierra. Por ejemplo, se halla en forma líquida en los mares, ríos y en grandes depósitos subterráneos. En su estado sólido la encontramos en las cumbres de las montañas nevadas o en los glaciares en forma de nieve o hielo. Asimismo, se halla en estado gaseoso como vapor de agua en el ambiente y formando las nubes.²⁰

El control sanitario del agua de consumo humano es un objetivo prioritario de la salud pública. La legislación nacional debe estar destinadas a garantizar que el agua de consumo sea salubre y limpia, eliminando o reduciendo la concentración de contaminantes microbiológicos y físico-químicos que puedan afectar a la salud humana.¹⁹

El agua es un factor que puede convertirse en un vehículo para la adquisición de diversas enfermedades en el ser humano. Actualmente, existen descritas más de 20 enfermedades en las que el agua actúa directa o indirectamente en su aparición, algunas de ellas con alto impacto en términos de morbilidad y mortalidad.¹⁸

En numerosas ocasiones el agua que se comercializa en bolsas plásticas proviene de fuentes superficiales expuestas a la contaminación debidas a la exposición y arrastre de partículas orgánicas e inorgánicas.¹⁸

Existen diversos factores que influyen en la calidad del agua que consume una población. Entre éstos se encuentran: la presencia o ausencia de fuentes de



abastecimiento; la infraestructura de redes de almacenamiento y distribución de agua y por último, los aspectos culturales y socioeconómicos que condicionan la aceptación o rechazo a ciertas formas de abastecimiento y potabilización de agua.¹⁸

La calidad del agua está dada por las características físicas, químicas y biológicas que ésta presenta. El análisis de los minerales disueltos, número de bacterias, pH y temperatura entre otros, determinan si una fuente de agua es recomendable para un uso particular. El agua adecuada para beber se llama agua potable, y aunque contiene algunos sólidos disueltos, son de tipo y concentración tal que no representan riesgos para la salud humana, aunque algunas veces esta puede estar contaminada, debido a números factores que están relacionados como las redes de distribución y la falta de un tratamiento correcto.²⁰

Esto ha creado una gran desconfianza sobre la potabilidad del agua del grifo, siendo esta la principal razón para que la población prefiera una alternativa de consumo como es el agua envasada en bolsas o en botellas plásticas, que a pesar de su costo la mayoría de las personas la toman confiados en su calidad. Debido al aumento de la aceptación y la demanda del agua envasada, esta industria es una de las de mayor auge con tasa de crecimiento del 7% anual, a nivel mundial, lo que incrementa el riesgo de afectar la salud de un mayor número de consumidores, en caso de que esta agua no cumpla con los estándares microbiológicos y fisicoquímico de calidad.¹⁷

La contaminación microbiológica del agua envasada se ha reportado en países de todo el mundo, tales como la India, Brasil, Colombia, en donde se han encontrados bacterias heterotróficas, *Coliforme faecales*, coliformes totales, *Escherichia coli*, *enterococos*, *pseudomonas aeruginosa*, entre otros.¹⁷

El uso de bioindicadores se está proponiendo como una nueva herramienta para conocer la calidad del agua, esto no quiere decir que desplace al método tradicional de los



análisis fisicoquímicos. Su uso simplifica en gran medida las actividades de campo y laboratorio, ya que su aplicación solo requiere de la identificación de los organismos basándose en índices de diversidad, ajustados a intervalos que califican la calidad del agua.²¹

La calidad microbiológica del agua de consumo humano es de gran importancia y el monitoreo de un indicador bacteriano tal como los Coliformes totales debe dársele la más alta prioridad dentro de la política de la calidad del agua. Por otra parte, la contaminación química también es importante, pero ello no está asociado con efectos agudos sobre la salud humana y por lo tanto debe tener una menor prioridad que la evaluación de la contaminación bacteriológica y que muchas veces resulta irrelevante en zonas donde enfermedades relacionadas con el agua y enfermedades parasitarias muestran elevados índices de prevalencia.²¹

En Nicaragua el negocio del agua envasada en bolsa o botella inicio en 1994, cuando las autoridades registraron la llegada de las primeras marcas, desde esa fecha y hasta ahora, el país ha tenido unas 50 marcas en bolsa y botella, pero actualmente sólo hay unas 40, porque se sacaron del mercado a unas 10, ya que no cumplían con los requisitos higiénicos-sanitarios.¹⁸

En la ciudad de León, Nicaragua, al igual que en muchas ciudades del país se ha incrementado el número de envasadoras de agua en bolsa y la comercialización es alta entre los distintos sectores de la población. Sin embargo, no se cuenta con una investigación amplia, que abarque aspectos de calidad del agua que se consume a diario, por lo tanto el objetivo de este estudio es evaluar la calidad microbiológica y físico-química del agua envasada en bolsas que se comercializan en diferentes puntos de la ciudad de León y su viabilidad para el consumo humano.



Diversos estudios se han realizado por diferentes organismos e instituciones relacionados con la calidad del agua destinadas al consumo, las cuales se mencionan a continuación.

Una investigación realizada por estudiantes de la carrera de Biología de la Universidad Autónoma de Nicaragua en el año 2000, titulado "Diagnóstico de la calidad del Agua de consumo en las comunidades rurales de Abangasca Sur y Troilo del municipio de León" concluyó que, una vez realizados los estudios microbiológicos y físico-químicos correspondientes, el agua de pozo de Abangasca Sur, no tiene muy buena calidad, de acuerdo con las normas de calidad del agua para consumo humano o normas CAPRE (Comité coordinador regional de instituciones de agua potable y saneamiento de Centro América, Panamá y República Dominicana) y de la OPS, debido a que exceden los valores recomendados de concentración de sustancia o densidad bacteriana y que la contaminación de las aguas es de origen fecal, por lo cual no eran aptas para su consumo.¹⁴

César Julio Cáceda, realizó un estudio en el 2005 en Perú, que lleva por tema: "Aplicación de Bioensayos en la medición de Toxicidad por metales pesados en fuentes superficiales de agua para consumo humano" en este estudio se evaluó el efecto tóxico potencial de metales pesados de una muestra de agua del Río Santa sobre el crecimiento de la raíz de *Allium cepa* y *Lactuca sativa*. De acuerdo con los resultados obtenidos la aplicación de bioensayos con *Allium cepa* fue más sensible a la presencia de metales de plomo y cromo con respecto a *Lactuca sativa*.¹⁰

Un estudio realizado en marzo del 2007 por el Centro para la 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 del Río Ochozogo", el cual se llevó a cabo para determinar la disponibilidad del agua superficial y los factores que inciden en la calidad del agua en la subcuenca. Se utilizaron indicadores físicos-químicos en las cuales las aguas no presentaron problemas a excepción del hierro



que se encuentra por encima de los límites establecidos por las Normas Canadienses (CCME). En cuanto aspectos microbiológicos la presencia de indicadores de contaminación, indican contaminación bacteriológica del agua por las diferentes actividades en la subcuenca. Los Coliformes totales y termotolerantes superan los valores límites establecidos por las diferentes Agencias para la Protección del Medio Ambiente tanto de los Estados Unidos, Europa y Canadá. Las concentraciones encontradas de *E. coli* en todos los sitios de muestreo exceden los criterios de calidad de agua lo que evidencian, una contaminación de origen fecal, mientras que la presencia de *Streptococcus fecalis* en las aguas confirman una contaminación reciente de origen animal.⁹

Otro estudio realizado en el año 2008, por estudiantes de la UNAN- León, en el cual verificaban la calidad microbiológica del Agua purificada comercializadas en bolsas y botellas en la ciudad de León, dicha verificación se realizó mediante la utilización del método del número más probable en donde se determinó la presencia de Coliformes fecales y totales, además de cuantificar Bacterias Aerobias Mesófilas, aplicando los valores establecidos por el MINSA y por la Farmacopea USP para este tipo de aguas. Llegando a la conclusión que no todas las aguas analizadas cumplían con los requisitos establecidos y por lo tanto no todas eran aptas para consumo humano.¹³

Una investigación realizada en marzo del 2013 por estudiantes de la carrera Farmacia titulado "Determinación de la Calidad del Agua Mediante Indicadores Biológicos y Fisicoquímicos en la Comunidad El Paragua, Malpaisillo, León" y en la que utilizando el método del número más probable para determinar la presencia de Coliformes fecales y totales, así como la realización de ensayos de biotoxicidad mediante el método de *Allium cepa* L, e identificando la presencia de metales pesados a través del proceso de sulfhidración, concluyeron, que las aguas analizadas no todas cumplían con los reglamentos establecidos y por lo tanto no eran aptas para el consumo humano. ¹⁵



El sector del agua envasada ha crecido rápidamente en los últimos años en todo el mundo puesto que genera grandes ganancias, por lo que se ha convertido en el sector más dinámico de toda la industria de alimentos y bebidas y el consumo de esta agua envasada aumentan cada año a nivel mundial, y Nicaragua no está exenta.

León se encuentra ubicada en una zona tropical de Nicaragua con temperaturas que oscilan entre 26-33°C con un máximo de 42°C, lo que hace de esta ciudad un lugar caluroso casi todo el año por lo que la demanda de agua para tomar es abundante. A pesar que la mayoría de los hogares tiene abastecimiento de agua potable, en las calles la gente compra para su consumo el agua envasadas en botella o en bolsas, las cuales son vendidas por comerciantes ambulantes a precios accesibles y de bajo costo con el concepto de agua purificada.

La oferta y el consumo de agua en bolsitas en las calles es abundante pero la calidad de esas aguas no es confiable, puesto que son elaboradas en fábricas artesanales y son embolsados sin ningún control o medidas higiénicas sanitaria adecuadas, por lo que se pueden contaminar fácilmente con agentes transmisores de enfermedades, por lo tanto, esta contaminación representaría un problema de salud pública; es por eso que se necesita urgentemente de análisis de contaminantes a fin de evitar el incremento de la prevalencia de las enfermedades relacionadas con la calidad del agua en donde en los últimos años según el Ministerio de Salud ha reportado un aumento de casos de enfermedades relacionadas con la calidad del agua.²⁰

Por lo antes señalado, es importante evaluar la calidad microbiológica, biológica y química del agua envasada, comercializada y consumida en bolsita en diferentes puntos de la ciudad de León, para asegurar si es o no apta para el consumo humano, puesto que es un indicador confiable para detectar riesgos a la salud de la población, y predispone al desarrollo de muchas enfermedades.



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el punto de vista microbiológico y biológico, el examen de la calidad sanitaria del agua tiene por objeto determinar la presencia de ciertos grupos de bacterias y sustancias, que revelen una contaminación reciente por sólidos disueltos, materia fecal o materia orgánica, siendo el criterio más utilizado, la identificación de sustancias sólidas y la determinación de microorganismos que ésta contiene.

Por lo antes expresado, se refleja la importancia del constante monitoreo de la calidad del agua de consumo humano. De aquí nace la necesidad de realizar una investigación donde se evalúe la calidad microbiológica, biológica y química del agua envasada y comercializada en bolsas plásticas y posteriormente distribuida en establecimientos de la ciudad y verificar si no genera riesgo para la salud del consumidor. Es por eso que nos planteamos:

¿Es el Agua que se comercializa y distribuye en Bolsas plásticas en los diferentes puntos de la ciudad de León, de calidad en base a criterios Microbiológicos, Biológicos y Químicos, según normas internacionales?



OBJETIVOS

Objetivo General.

- Evaluar la Calidad microbiológica y físico-química del Agua envasadas en bolsitas y comercializada en varios puntos de la ciudad de León, Marzo 2014.

Objetivos Específicos.

- Determinar la presencia de Coliformes Fecales y Totales mediante el Método del Número más Probable en el agua de bolsa comercializada en León.
- Detectar la presencia de Bacterias Aerobias Mesófilas en las muestras de agua en bolsa.
- Inferir la presencia de sustancias citotóxicas mediante el método *Allium cepa* L.
- Efectuar el ensayo cualitativo de la Marcha analítica para Comprobar la presencia del ión plomo en las muestras en estudio



MARCO TEÓRICO



El término agua, generalmente, se refiere a la sustancia en su estado líquido, pero la misma puede hallarse en su forma sólida llamada hielo, y en forma gaseosa denominada vapor.⁵

La molécula de agua está formada por dos átomos de Hidrógeno unidos a un átomo de oxígeno por medio de dos enlaces covalentes. El ángulo entre los enlaces H-O-H es de 104'5°. El oxígeno es más electronegativo que el hidrógeno y atrae con más fuerza a los electrones de cada enlace.⁵

El término calidad del agua es relativo, referido a la composición del agua en la medida en que ésta es afectada por la concentración de sustancias producidas por procesos naturales y actividades humanas. Como tal, es un término neutral que no puede ser clasificado como bueno o malo sin hacer referencia al uso para la cual el agua es destinada. De acuerdo con lo anterior, tanto los criterios como los estándares y objetivos de calidad del agua variarán dependiendo de si se trata de agua para consumo humano (agua potable), para uso agrícola o industrial, para recreación, para mantener la calidad ambiental, etc.⁵

Cuando se habla de agua de consumo humano se refiere a:

- a) El agua utilizada para beber, cocinar, preparar alimentos en sus diferentes etapas, higiene personal y otros usos domésticos.
- b) El agua utilizada en la industria de alimentos (para la limpieza de superficies y elaboración de los mismos).⁵
- c) La suministrada en una actividad comercial o pública, ejemplo: centros comerciales, hoteles, restaurantes, casas rurales, escuelas, oficinas, etc.⁵

Los límites tolerables de las diversas sustancias contenidas en el agua son normadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS), y por los gobiernos nacionales, pudiendo variar ligeramente de uno a otro. La calidad del agua está determinada por la hidrología, la fisicoquímica y la biología de la

masa de agua a que se refiera. Las características hidrológicas son importantes ya que indican el origen, cantidad del agua y el tiempo de permanencia, entre otros datos.⁵

El agua debe reunir dos características:

1. Estar exenta de sustancias y microorganismos que sean peligrosos para los consumidores.⁵
2. Estar exenta de sustancias que le comuniquen sensaciones sensoriales desagradables para el consumo (color, turbiedad, olor, sabor).⁵

Definiciones técnicas para agua potable:

- Agua potable: Es el agua apta para el consumo humano, la cual debe estar exenta de organismos capaces de provocar enfermedades y de elementos o sustancias que pueden producir efectos fisiológicos perjudiciales.
- Agua tratada: Corresponde al agua cuyas características han sido modificadas por medio de procesos físicos, químicos, biológicos y microbiológicos.
- Agua Clorada: Es el agua sometida a un proceso de desinfección por medio de cloro y sus derivados en concentraciones que cumplen la norma.

Parámetros fisicoquímicos.

El agua no debe presentar sabores u olores que pudieran resultar desagradables para la mayoría de los consumidores. Los consumidores evalúan la calidad del agua de consumo basándose principalmente en sus sentidos. ⁵

Los componentes microbianos, químicos y físicos del agua pueden afectar su aspecto, olor o sabor y el consumidor evaluará su calidad y aceptabilidad basándose en estos criterios. Aunque es posible que estas sustancias no produzcan ningún efecto directo sobre la salud, los consumidores pueden considerar que el agua muy turbia, con mucho color, o que tiene un sabor u olor desagradable es insalubre y rechazarla. ⁵



En casos extremos, los consumidores pueden evitar consumir agua que es inocua pero inaceptable desde el punto de vista estético, y consumir en cambio agua de otras fuentes cuyo aspecto sea más agradable pero que puede ser insalubre.⁵

Deberá ser prácticamente incolora, inodora, insípida, límpida y transparente. Puede ser ingerida o utilizada en el procesamiento de alimentos de cualquier cantidad, sin temor por efectos adversos sobre la salud.⁵

- 1) Estado físico: sólida, líquida y gaseosa.
- 2) Color: incolora.
- 3) Sabor: insípida.
- 4) Olor: inodoro.
- 5) Densidad: 1 g./c.c. a 4°C.
- 6) Punto de congelación: 0°C.
- 7) Punto de ebullición: 100°C.
- 8) Presión crítica: 217,5 atm.
- 9) Temperatura crítica: 374°C.⁶

Propiedades Químicas del Agua:

1. Reacciona con los óxidos ácidos: Los anhídridos u óxidos ácidos reaccionan con el agua y forman ácidos oxácidos.
2. Reacciona con los óxidos básicos: Los óxidos de los metales u óxidos básicos reaccionan con el agua para formar hidróxidos. Muchos óxidos no se disuelven en el agua, pero los óxidos de los metales activos se combinan con gran facilidad.
3. Reacciona con los metales: Algunos metales descomponen el agua en frío y otros lo hacían a temperatura elevada.
4. Reacciona con los no metales: El agua reacciona con los no metales, sobre todo con los halógenos, por ejemplo: Haciendo pasar carbón al rojo sobre el agua se

descompone y se forma una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno (gas de agua).

5. Se une en las sales formando hidratos: el agua forma combinaciones complejas con algunas sales, denominándose hidratos.⁶

En algunos casos los hidratos pierden agua de cristalización cambiando de aspecto, y se dice que son eflorescentes, como le sucede al sulfato cúprico, que cuando está hidratado es de color azul, pero por pérdida de agua se transforma en sulfato cúprico anhidro de color blanco.⁶

Ensayos Microbiológicos para la evaluación de la calidad del agua:

Características microbiológicas

Las bacterias son los organismos vivos más numerosos que existen, por lo mismo están presentes casi en todas partes, el agua subterránea no es la excepción, por este motivo es necesario realizar pruebas bacteriológicas para determinar el grado de contaminación que tiene la misma.³

El agua puede contener pequeñas contaminaciones de aguas negras, las cuales no pueden ser detectadas mediante análisis físicos o químicos, en cambio, las pruebas bacteriológicas se han diseñado de tal manera que puedan detectarlas.³

Pruebas bacteriológicas de contaminación

Se presupone que el objetivo de los análisis microbiológicos del agua es para determinar la existencia de microorganismos patógenos en ella. Sin embargo, esto no es verdad, por las siguientes razones:

- a. Los organismos patógenos llegan al agua en forma esporádica y no sobreviven mucho tiempo; por lo tanto, pueden no estar en una muestra analizada.



- b. Si se encuentran en pequeñas cantidades pueden pasar desapercibidos a los procedimientos empleados.
- c. Se necesitan 24 horas o más para obtener resultados de los exámenes y si se encuentran microorganismos patógenos, muchas personas pueden haber tomado agua antes de que se conozcan los resultados y así haberse expuesto a la infección.³

Los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua, proceden de las descargas intestinales de hombres y animales. Además, ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli*, y varios microorganismos similares, denominados coliformes, estreptococos fecales (como *Streptococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*), son habitantes normales del intestino grueso del hombre y animales y en consecuencia siempre están en las materias fecales. Así pues, la presencia de cualquiera de estas especies en el agua es evidencia de contaminación fecal y el camino está abierto a los patógenos ya que se encuentran en las materias fecales.³

Puesto que los exámenes de laboratorio para encontrar microorganismos patógenos en el agua tienen las desventajas anteriormente mencionadas, se han desarrollado técnicas para detectarlos en las excretas, particularmente los del grupo Coliformes. Este propósito ha probado ser satisfactorio en la práctica y tiene las siguientes ventajas:

- Los microorganismos coliformes, sobre todo *E. coli*, habitan constantemente en el intestino humano en grandes cantidades. Se estima que una persona, en promedio, excreta al día miles de millones de estos microorganismos
- Estos microorganismos viven más tiempo en el agua que los patógenos.
- Obviamente, una persona sana en general no elimina microorganismos patógenos, pero puede desarrollarse una infección intestinal y esos microorganismos aparecerán en las materias fecales. Así, la presencia de coliformes en el agua se toma como señal de alarma, pues ha sido contaminada peligrosamente.³

El grupo coliformes comprende todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gramnegativos, no esporulados que producen ácido y gas al fermentar la lactosa. Las especies clásicas de este grupo son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. *E. Coli*, como ya ha sido señalado, es un habitante normal del intestino humano y de los animales. *Enterobacter aerogenes* es más frecuente en granos y plantas pero también en las materias fecales.³

Como estas especies tienen gran semejanza en su aspecto morfológico y características de cultivo, es necesario recurrir a pruebas bioquímicas para diferenciarlas. Reacciones que tengan las siguientes cuatro características son muy importantes para lograr este propósito:

1. Capacidad para producir indol. *E. Coli* lo produce, y *Ent. Aerogenes* no.
2. Cantidad de ácido producida en un medio especial de caldo glucosado adicionado del indicador rojo de metilo. Los dos microorganismos producen ácido de la glucosa. Sin embargo, *E. Coli* produce un pH más bajo, lo que hace que vire al rojo de metilo, mientras que *Ent. Aerogenes* no cambia el color. ³
3. Capacidad para producir acetilmetilcarbinol en un medio de peptona glucosado. Este compuesto químico se detecta por la reacción de Voges - Proskauer. *E. coli* no produce acetilmetilcarbinol mientras que *Ent. aerogenes* sí lo hace. ³
4. Utilización de citrato de sodio. *Ent. aerogenes* es capaz de utilizar el citrato de sodio como su única fuente de carbono, esto es, se desarrollará en un medio de cultivo químicamente definido en el cual el citrato de sodio es el único compuesto de carbono. *E. coli* no se desarrollará en estas circunstancias. Por conveniencia, a estas pruebas se les ha designado en forma colectiva reacciones IMViC (I=indol, M= rojo de metilo, Vi= reacción Voges-Proskauer y C= citrato). ³

Número más Probable. (NMP)

Los microorganismos Coliformes son un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos.⁷

Los agentes patógenos transmitidos por el agua constituyen un problema mundial que demanda un control urgente mediante la implementación de medidas de protección ambiental a fin de evitar el incremento de las enfermedades relacionadas con la calidad del agua. Los microorganismos Coliformes son bacilos Gram negativos, no es postulados, aerobios o anaerobios facultativos, y fermentan la lactosa a 35 °C con la producción de ácido y gas.⁷

Coliformes fecales: Incluye *E. coli* y algunos *Klebsiella* y *Enterobacter sp.*
Temperaturas de incubación: 44.5 o 45° C por 24 horas.⁷

El grupo de los microorganismos Coliformes es el más ampliamente utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El uso de los Coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.
- La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.
- La demostración y la cuenta de microorganismos Coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.⁷



La valoración del contenido microbiano de una muestra de agua por el método del Número más probable supone la utilización de tablas numéricas que tienen en cuenta los volúmenes de agua y las cantidades de tubos sembrados en una o más series.⁸

Realmente consiste en tratar estadísticamente el número de tubos de cada serie sembrada que resulten positivos después de su incubación.⁸

Material y Substancias utilizados en la técnica Número más probable (NMP):

1. Muestras de agua potable de diferente origen (grifo, purificada y embotellada, tinaco, sistema u otro), de un volumen mínimo de 100 mL.
2. 5 Tubos de 20 x 180 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 20mL de caldo lactosado ó lauril triptosa estéril de doble concentración.
3. 10 Tubos de 18 x 150 mm campana Durham en su interior, conteniendo 10mL de caldo lactosado estéril de simple concentración.
4. 1 Pipeta de 10 mL graduada en décimas, estéril.
5. 2 Pipetas de 1 mL graduadas en décimas, estériles.
6. 10 Tubos de 18 x 150 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 10mL de caldo Lactosa bilis verde brillante (LBVB) estéril de concentración sencilla.
7. 10 Tubos de 18 x 150 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 10mL de caldo *Escherichia coli* estéril de concentración sencilla.
8. Mechero Bunsen.
9. Cerillos ó encendedor.
10. Asa bacteriológica.
11. Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 20 x 200.
12. Agitador de tubos Vortex.
13. Incubadora a 35 °C.
14. Baño incubadora para Coliformes Fecales a temperatura constante de 44 °C (± 0.5 °C).⁸

Técnicas del Número más Probable. (NMP)

Descripción de la metodología de análisis:

La técnica del NMP o Número Más Probable, comprende siempre una prueba presuntiva y otra confirmativa.

Esto es así porque una positividad en un tubo de la prueba presuntiva no indica necesariamente la presencia del grupo bacteriano a determinar (Coliformes Totales, Coliformes Fecales o *Streptococos* Fecales), sino tan solo es una presunción, que habrá de confirmarse posteriormente.⁸

Sin embargo, una negatividad en la prueba presuntiva permite dictaminar la ausencia de dicho grupo bacteriano en el agua examinada.⁸

La denominada prueba presuntiva consiste en una metodología de tipo general para cualquier grupo de bacterias, mientras que la prueba confirmativa es específica.⁸

Prueba presuntiva de la técnica del Número Más Probable (NMP):

Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.

1. Preparar tres series sucesivas de 5 tubos con caldo lactosado, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla.
2. Etiquetar las series con 10, 1 y 0.1mL.
3. Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces antes de tomar el volumen que se va a inocular, a efecto de homogeneizar.
4. Antes y después de realizar las inoculaciones, la boca del frasco de la muestra deberá ser flameada con objeto de evitar contaminación.
5. Inocular con una pipeta de 10mL este volumen de muestra en la serie de tubos con caldo de doble concentración, con otra pipeta de 1mL para 1mL de muestra en la segunda serie de tubos con concentración sencilla.
6. Igualmente con la misma pipeta podrá inocularse la tercera serie de tubos con 0.1mL de muestra.⁸

Normalmente, siempre que no se sospecha que el agua contenga elevada carga bacteriana, solo se inoculan estas tres primeras series de tubos.⁸

En caso contrario, será necesario inocular otras series y por lo tanto, realizar diluciones de la muestra original:

1. Incubar todos los tubos a una temperatura de 35 °C durante 24-48 horas.
2. Después de 24 horas de incubación efectuar una primera lectura para observar si hay tubos positivos, es decir, con producción de ácido, si el medio contiene un indicador de pH, turbidez y producción de gas en la campana Durham.⁸

Al hacer esta verificación es importante asegurarse que la producción de gas sea resultado de la fermentación de la lactosa en cuyo caso se observará turbidez en el medio de cultivo y no confundir con burbujas de aire.⁸

Para evitar este tipo de confusiones es recomendable revisar las campanas Durham antes de proceder a la inoculación y desechar aquellos que contengan burbujas de aire ó de alguna manera eliminar éstas y así poder utilizarlos.

1. De los tubos que en esta primera lectura den positivos, ya se pueden hacer las pruebas confirmatorias para Coliformes totales y Coliformes fecales.
2. En caso de no apreciarse alguno o todos los cambios mencionados en el resto de los tubos, continuarán en incubación 24 horas más.
3. Después de 48 horas (± 2 horas) a partir de la inoculación, se hace la lectura final.
4. Si pasadas estas 48 horas tampoco se aprecia turbidez ni producción de gas, los tubos se toman como negativos.⁸

Interpretación de resultados de la prueba presuntiva NMP:

Si el total de tubos son negativos: el examen se da por terminado, reportando la ausencia de Coliformes Totales y Fecales en la muestra analizada.



Todos aquellos tubos que den positivos para prueba presuntiva se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la prueba confirmatoria para Coliformes Totales y Fecales.⁸

Prueba confirmatoria para Coliformes Totales:

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos previamente para homogeneizar, inocular con tres tubos conteniendo caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB).
2. Incubar durante 48 ± 3 horas a 35 ± 0.5 °C.
3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.⁸

Interpretación:

Si se observa turbidez y producción de gas:

- La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez, se consideran NEGATIVOS, estableciéndose el código para efecto del cálculo del NMP.⁸

Prueba confirmatoria para Coliformes Fecales:

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo *E.C.* (*Escherichia coli*).
2. Incubar durante 24 horas a 44 °C (± 0.5 °C), observar presencia de turbidez y gas.⁸

Interpretación de la prueba confirmatoria anterior:

- Si se observa turbidez y producción de gas: la prueba se considera positiva, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del Número más Probable (NMP).
- Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: se reporta la ausencia de Coliformes fecales.⁸

Cálculos del Número Más Probable (NMP):

De acuerdo a los tubos positivos en las pruebas confirmativas para Coliformes Totales y Fecales:

- 1- Establecer los códigos correspondientes para calcular el NMP de Coliformes Totales y Fecales en 100mL de agua.
- 2- En caso de no encontrar en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP}/100\text{ml} = \frac{\text{Número de tubos positivos} \times 100}{\sqrt{\text{ml de muestra en tubos negativos} \times \text{ml de muestra en todos los tubos}}}$$

Elaboración y Presentación de resultados de la prueba Número más probable (NMP).

Los resultados se elaboran de la siguiente manera:

- ✓ Si únicamente se inoculan tres series de cinco tubos cada una con 10, 1 y 0.1mL de muestra, la lectura de los resultados nos permite tener dos códigos de valores uno para Coliformes Totales y otro para Coliformes Fecales los cuales leídos en la tabla del NMP dará el valor de bacterias correspondientes en 100 mL de muestra, de manera directa.
- ✓ Si se han realizado diluciones, se ha de obtener una serie final con valor cero.
- ✓ A continuación se establece el triplete de valores correspondiente a las tres series anteriores a la del valor cero que podrá ser leída en la tabla del NMP.



- ✓ Para efectos de expresar el valor obtenido basándose en 100 mL de muestra habrá de dividirse el resultado de la tabla por el volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central de cada triplete escogido.
- ✓ Se tendrá un triplete de valores para cada tipo de determinación.

En general se tiene:

$$\text{NMP}/100\text{ml} = \frac{\text{NMP Leído en la tabla}}{\text{Volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central (ml)}}$$

Los resultados obtenidos se expresarán de la siguiente manera:

NMP DE COLIFORMES TOTALES: _____ / 100mL

NMP DE COLIFORMES FECALES: _____ / 100mL.

MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).

3 TUBOS 1 ml 1:10	3 TUBOS 1 ml 1:100	3 TUBOS 1 ml 1: 1000	3 TUBOS g o ml
0	0	0	3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	1	11
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39
3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75

3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	480
3	3	2	1100
3	3	3	2400

Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas en consumo humano.

El agua puede ser completamente transparente, incolora e inodora, pero estar aún contaminada, por lo que, es importante determinar su calidad sanitaria.²⁵

La potabilidad del agua sólo se puede determinar mediante análisis químicos y bacteriológicos. Los procedimientos bacteriológicos de rutina son: Recuento de bacterias Mesófilas aerobias, Coliformes totales, Coliformes fecales, Estreptococos fecales y Clostridios sulfito reductor.²⁵

Los recuentos de Mesófilos Aeróbicos en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua, así como también la eficiencia de las operaciones para eliminar microorganismos, como la sedimentación, filtración y cloración.²⁵

Las cuentas se deben hacer antes y después del tratamiento específico. Los resultados indicarán la medida en que ha sido reducida la población microbiana. Lo usual es que el agua de buena calidad, para consumo humano, tenga cuentas bajas: < 100 UFC por mililitro.²⁵

La determinación del conteo de bacterias mesófilas aerobias en una muestra de agua se realiza, normalmente, por siembra en una placa, de un volumen determinado de agua, por incubación a una temperatura concreta y en un tiempo determinado, y por recuento posterior de las colonias desarrolladas y con la aceptación implícita de que cada colonia



es originada por una bacteria de la muestra inicial, por lo tanto, el número de colonias equivaldrá al número de bacterias en el volumen sembrado.²⁵

Materiales y sustancias

- ✓ Muestras de agua potable de diferente origen (Grifo, purificada y embotellada u otro), de un volumen mínimo de 100 mL obtenida en recipiente estéril y con Tiosulfato de Sodio al 10%.
- ✓ 3 tubos de ensayo conteniendo c/u 9 mL de agua de dilución estéril.
- ✓ 9 tubos de 20 x 160 mm, con tapón conteniendo c/u de 15-20 mL de agar cuenta estándar estéril, manteniéndolo a 45-47 °C en baño de temperatura constante.
- ✓ Gradilla.
- ✓ Pipetas estériles de 1 mL graduadas en décimas.
- ✓ 9 cajas Petri estériles.
- ✓ Mechero Bunsen.
- ✓ Cerillos ó encendedor.
- ✓ Incubadora.
- ✓ Contador de Colonias Quebec.²⁵

Técnicas

En condiciones asépticas:

1. Agitar vigorosamente la muestra de agua, para homogeneizar.
2. Pipetear 1 mL de muestra y verterlo en el primer tubo con 9 mL de agua de dilución estéril, quedando entonces una dilución de 10^{-1} .
3. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución (10^{-1}) y verterlo en el segundo tubo, quedando una dilución de 10^{-2} .
4. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución (10^{-2}) y verterlo en el tercer tubo, quedando una dilución de 10^{-3} .
5. Utilizando pipeta estéril, tomar 1 mL de la dilución 10^{-1} y verterlo en la caja Petri estéril marcada con 10^{-1} , distribuyéndolo bien en el fondo de la caja Petri vacía. Efectuar esta misma operación por triplicado. ²⁵



6. De la misma manera, tomar 1 mL de la dilución 10^{-2} y verterlo en la caja Petri marcada con 10^{-2} . Efectuar esta misma operación por triplicado.
7. Hacer lo mismo con el tubo de la dilución 10^{-3} y la caja marcada con 10^{-3} . Efectuar la misma operación por triplicado. (Es recomendable usar una pipeta estéril para cada dilución).
8. Antes de que pasen 10 minutos, agregar a cada caja Petri el medio de cultivo contenido en un tubo, a una temperatura máxima de 47 °C (todavía líquido).
Nota: Si la temperatura del agar es superior a 47°C al vaciarlo a las cajas, puede producirse la destrucción total ó parcial de las bacterias sembradas.
9. Antes de que el medio de cultivo solidifique homogeneizar cada caja mediante movimientos de translación y rotación en una superficie plana aproximadamente durante 1 minuto evitando que se mojen la tapa y los costados de la caja, de esta manera el agua y el agar son mezclados íntimamente.
10. Dejar reposar las cajas el tiempo necesario para que solidifique el agar.
11. Una vez solidificado el agar en las cajas, incubar en posición invertida con objeto de que el agua de condensación del agar no caiga sobre la superficie del cultivo. Las condiciones de incubación son: 37 °C (± 1 °C) durante 24 horas (± 3 h). Ahora bien, si se desea conocer la flora bacteriana total de la muestra las condiciones serán: 22 °C (± 2 °C), durante 72 horas (± 4 h).
12. Transcurrido el tiempo de incubación contar las colonias que se han desarrollado en cada una de las placas, usando un cuenta colonias para efecto de facilitar la lectura.²⁵

Nota: Si la investigación de mesófilas se practica a otro tipo de muestra de agua que no sea potable, se procede a realizar los grados de dilución necesarios, dependiendo del origen de la misma, pero solo se trabajará con las últimas tres diluciones, procediendo de la misma forma descrita anteriormente pero incubando durante 48 horas a 37 °C (± 1 °C).²⁵

Al hacer el recuento, tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- ⌚ Seleccionar las cajas que contengan entre 25 y 250 colonias y descartar las otras
- ⌚ Si son varias las que entran en este intervalo, contar todas y seleccionar las del grado de dilución por triplicado que represente menor margen de error en el recuento y como resultado, tomar el promedio de las tres cajas y referirlo al volumen real de muestra sembrado para efectos del cálculo correspondiente.
- ⌚ Si no hay ninguna caja con un recuento dentro del intervalo mencionado, se hará de aquella que tenga el valor más próximo a cualquiera de los dos extremos. En estos casos los resultados se tomarán como aproximados, excepto en los casos de siembra de muestra directa donde se efectuará, también el recuento en cajas con menos de 25 colonias.
- ⌚ Si el recuento no se hace en el mismo momento de sacarlas de la incubadora, se pueden conservar las cajas dentro del refrigerador entre 5 y 10 °C, durante un período máximo de 24 horas.²⁵

Cálculo y presentación de resultados:

Una vez efectuado el recuento de las cajas correspondientes, los resultados obtenidos se elaboran de la siguiente manera:

- ⊗ Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 1 mL la expresión del resultado es directa.
- ⊗ Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 0.1 mL, el número de colonias contadas habrá de dividirse por el volumen de muestra sembrada, es decir, por 0.1, para obtener el número de colonias por mililitro.²⁵

En general se tiene:

Bacterias Mesófilas aerobias/mL = Número de colonias en volumen real de muestra sembrada, en mL. Los resultados se expresarán así:

NÚMERO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS: ____ UFC/mL.



Nota: Si no se observan colonias en ninguna de las cajas sembradas, el resultado no será de 0 (cero) UFC/mL, sino que será referido al menor grado de dilución sembrado. En el presente experimento éste es de 10^{-1} , por lo tanto el resultado sería: <10 UFC/mL.²⁵

Indicador Biológico:

Todo organismo es indicador de las condiciones del medio en que se desarrolla, ya que de cualquier forma su existencia en un espacio y momentos determinados responden a su capacidad de adaptarse a los distintos factores ambientales. Sin embargo, en términos más estrictos, un indicador biológico se ha considerado cuya presencia y abundancia señalan algún proceso o estado del sistema en el cual habita. Los indicadores biológicos se han asociado directamente con la calidad del agua más que con procesos ecológicos o con su distribución geográfica.²⁵

Ensayo Biológico:

El Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo/International Development Research Centre (IDRC) emprendió en 1997, un trabajo orientado a la creación de la red internacional WaterTox. La red tenía como propósito evaluar una serie de ensayos de toxicidad que pudieran ser integrados en una batería mínima de pruebas para evaluar la contaminación química del agua.⁴

Aunque muchas pruebas de toxicidad existían desde hacía muchos años, este fue un primer intento a escala internacional para incorporar varias de las pruebas más prometedoras en una batería integrada y estandarizada. Se pretendía además, evaluar su capacidad para detectar la presencia de diferentes contaminantes tóxicos, así como validar su uso.⁴

En la actualidad, se reconoce que la caracterización y medición de los tóxicos o componentes de los residuos peligrosos por separado no es suficiente para asegurar la ausencia de efectos indeseables, puesto que tanto la mezcla de los residuos como



posibles transformaciones en el ambiente pueden modificar su efecto nocivo. De ahí que el uso de ensayos biológicos esté siendo considerado cada vez con mayor intensidad para la evaluación de la toxicidad global de estos contaminantes.⁴

Históricamente, la utilización de métodos biológicos para la detección de sustancias nocivas o peligrosas se registra por primera vez a principios del siglo XX. Hacia 1940 se introdujo el uso de bioensayos con peces y durante los años cincuenta se inician las pruebas con invertebrados y algas.⁴

El concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado y aplicado al diagnóstico ambiental, considerándose como un complemento a la caracterización físico-química convencional. Las pruebas de toxicidad constituyen una herramienta eficaz para la predicción de niveles de concentración de compuestos tóxicos, en los que mediante la analítica clásica no se logra obtener efectos observables, extendiéndose estas evaluaciones al ámbito de poblaciones, comunidades o ecosistemas para la identificación de elementos biológicos en riesgo.⁴

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos.⁴

Los ensayos de toxicidad son aplicados para aguas dulces; procedimientos de muestreo, hay una detallada descripción de procedimientos estandarizados para la evaluación de toxicidad de sustancias químicas puras, efluentes, aguas naturales, superficiales, subterráneas y sedimentos.⁴



Las metodologías descritas corresponden a ensayos para determinar efectos agudos letales y subletales con los organismos de prueba *Daphnia magna* e *Hydra attenuata*, efectos fitotóxicos subletales agudos con *Allium cepa L* y *Lactuca sativa*, y efectos crónicos con el alga *Selenastrum capricornutum (Pseudokirchneriella subcapitata)*.⁴

Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades. Por tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismos o la biocenosis, y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al tóxico, y su relación con el ciclo de vida del organismo; las pruebas podrán ser de tipo agudo o crónico.⁴

El potencial nocivo de una sustancia tóxica puede ser contrarrestado por el sistema biológico a través de diferentes estrategias, tales como reacciones metabólicas de detoxificación, excreción de tóxicos, etcétera. Por tanto, la toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico.⁴

De manera general, los ensayos, también llamados pruebas de toxicidad, pueden ser definidos de acuerdo con:

- La duración: corto, mediano o largo plazo.
- El método utilizado para incorporar la muestra al sistema de ensayo: estático, con renovación, de flujo continuo.
- El propósito para el cual son utilizados: control de calidad de vertidos, evaluación de compuestos específicos, toxicidad relativa, sensibilidad relativa.⁴

Bioensayo: Ensayo en el cual el poder o potencia de una sustancia es medido a través de la respuesta de organismos vivos o sistemas vivientes.⁴

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

Principio del ensayo:

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 meristemas 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.⁴

El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al tóxico con las de cebollas no expuestas, luego de un periodo 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.⁴

Reactivos y Materiales:

Para la elaboración de las pruebas se deben seleccionar bulbos de 1,5 cm de diámetro, secos y sin formación de hojas y/o raíz. Pueden ser obtenidos del mercado local o adquiridos a través de algún proveedor. 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 tejidos es conveniente colocar los bulbos en agua destilada por dos horas y secar.⁴

La solución madre preparada de acuerdo con lo indicado se diluye diez veces con agua destilada, y el pH se ajusta a siete antes de utilizar. También se puede utilizar agua dura

o agua de la llave como medio de crecimiento. En el caso de usar cualquiera de estas opciones el control negativo y el agua utilizada para preparará las diluciones de los compuestos químicos o las muestras deberá ser la misma.⁴

Materiales:

- ✓ 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.
- ✓ Reglilla para hacer mediciones en cm o mm.⁴

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 humedad son altas, el almacenamiento está limitado a unos pocos días.⁴

Procedimiento de la prueba.

Preparación de diluciones:

Generalmente se sugiere el empleo de una serie de cinco concentraciones, un control negativo y uno o dos controles positivos. Para su preparación se emplea el método de dilución en forma secuencial aplicando un factor de 0,2 o 0,3. Cuando se va a llevar a cabo una evaluación presuntiva puede emplearse una serie de diluciones logarítmicas, por ejemplo: 100; 10; 1; 0,1; 0,01, etcétera, lo cual permitirá establecer el intervalo de concentración conveniente para la determinación de la concentración inhibitoria media (CI₅₀).⁴

Se recomienda igualmente utilizar agua dura para el control negativo, así como para la preparación de las diluciones de la muestra y la preparación del control positivo con el tóxico de referencia Cu (II).⁴



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.⁴

En la prueba se utilizan cinco concentraciones de la muestra, un control negativo, y uno o dos controles positivos cada una con doce réplicas. El ensayo se inicia con el llenado de los tubos con cada una de las diluciones y controles; este llenado deber 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.⁴

Ensayo de toxicidad con *Allium cepa* L.

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) por un periodo de 72 horas. Debe evitarse la iluminación directa. Dos veces al día durante el periodo de prueba se debe restablecer el volumen perdido por evaporación o absorción. Para restablecer 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.⁴

Expresión de resultados.

Al término del periodo de exposición se registra la longitud promedio de las raíces, la cual 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 de las raíces y el punto medio se define como el promedio. 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:



$$\% I = (\text{Long. del control} - \text{Long. de la muestra}) \times \frac{100}{\text{Long. del Control}}$$

Con estos valores se construye una gráfica de concentración en función del porcentaje de inhibición y se calcula la CI50 mediante cualquiera de los siguientes métodos: Probit, promedios móviles o Sperman & Karber.⁴

❖ **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa L.*)**

Principio del ensayo:

El bioensayo de toxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca Sativa L.*) es una prueba estática de toxicidad aguda (120 horas de exposición) en la 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 periodo 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 relevante para garantizar la supervivencia de la especie. La evaluación del desarrollo de la radícula y del hipocótilo constituye indicadores representativos para determinar la capacidad de establecimiento y desarrollo de la planta.



Morfología de la semilla y la plántula de lechuga.

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, pero que 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 subletales 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.⁴

A diferencia de otras pruebas en las que se consideran algas o plantas acuáticas sumergidas como organismo diagnóstico, el bioensayo con semillas permite evaluar la fitotoxicidad de muestras coloreadas o con elevada turbidez de manera directa y sin necesidad de filtración previa, reduciéndose así las interferencias debidas al pre-tratamiento, además de simplificar el procedimiento de prueba.

Si bien *Lactuca 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 los 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. 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 fitotóxicos de pesticidas sobre especies no blanco necesario para el registro de pesticidas.

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 reúso de biosólidos.⁴

Reactivos y Materiales.

- ✓ Material biológico: semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L var. mantecosa).
- ✓ Agua dura reconstituida. Para su preparación se recomienda utilizar reactivos Grado ACS y agua destilada en vidrio o Millipore Supera Q.
- ✓ Cápsulas de Petri de 100 mm de diámetro.
- ✓ Papel de filtro Whatman núm. 3 (o equivalente), 90 mm de diámetro.

El papel de filtro que se seleccione como sustrato de germinación debe tener las siguientes características:

- Trama amplia y porosa que asegure una buena capacidad de retención de líquido.
- Resistencia de la fibra del papel para que las radículas crezcan por su superficie sin atravesarlo, situación que dificultaría la remoción de las plántulas sin dañarlas.
- Ausencia de residuos tóxicos (ej. blanqueadores).
- Que no promueva el desarrollo de hongos (no asociados a las semillas).
- ✓ Matraz aforado de 50 mL.
- ✓ Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL.
- ✓ Regla.
- ✓ Pinzas.
- ✓ Toallas de papel.

- ✓ Bolsas plásticas.
- ✓ Cámara oscura termostataza.4

Obtención, control y conservación de las semillas.

La obtención de semillas de lechuga (*L. sativa L var. mantecosa*) 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 raíz e hipocótilo.4

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 dos 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 raíz e hipocótilo en el control negativo. En este caso se recomienda realizar las pruebas de toxicidad utilizando un nuevo lote de semillas.4

Procedimiento para el desarrollo de la prueba.

Preparación de las diluciones.

Para realizar una curva dosis-respuesta se recomienda preparar un mínimo de cinco o seis diluciones de la muestra o compuesto a estudiar, de manera que se obtengan valores de toxicidad intermedios entre el 100 y 0%. Para las muestras ambientales se recomienda el uso de un factor de dilución de 0,3 o 0,5 para la preparación de la serie de diferentes concentraciones. El uso de un factor de 0,3 permite evaluar la toxicidad considerando el intervalo entre el 100 y 1% de la muestra realizando cinco diluciones (100, 30, 10, 3 y 1%). 4

Al aplicar un factor de dilución de 0,5, es necesario utilizar mayor número de diluciones para abarcar el mismo intervalo de concentraciones (100, 50, 25, 12, 6, 3 y 1,5%), pero se obtiene mayor precisión en los resultados. Para la preparación de cada dilución se



utiliza agua dura reconstituida (es posible el uso de agua mineral dura para consumo humano), realizando el control negativo con el agua de dilución empleada.⁴

Para el caso de las muestras cuya toxicidad es desconocida, previo a la realización de la prueba definitiva, se sugiere hacer una prueba presuntiva (ensayo preliminar) utilizando diluciones logarítmicas (100; 10; 1; 0,1; 0,01) que permitan establecer el intervalo de concentración conveniente para obtener valores de efecto entre 100 y 0% necesarios para calcular la CI_{50} .⁴

Con el fin de controlar la sensibilidad de las semillas, simultáneamente a la evaluación de la toxicidad de una muestra debe realizarse un control positivo, utilizando, por ejemplo, una sal de Zn (II) como tóxico de referencia. La concentración de prueba de este control es la correspondiente a la CI_{50} para el lote de semillas en uso.⁴

Protocolo de ensayo.

El procedimiento del ensayo de toxicidad aguda con semillas:

- Colocar en cada caja de Petri un disco de papel de filtro.
- Marcar correctamente cada caja con la dilución correspondiente, así como la fecha y hora de inicio y término del bioensayo.
- Saturar el papel de filtro con 4 o 5 mL de la dilución evitando que se formen bolsas de aire.
- Con la ayuda de una pinza, colocar cuidadosamente veinte semillas, dejando espacio suficiente entre ellas para permitir la elongación de las raíces.
- Tapar las cápsulas y colocarlas en bolsas plásticas para evitar la pérdida de humedad. Dado que algunas variedades de semillas de lechuga requieren oscuridad para que se produzca la germinación (semillas fotoblásticas negativas), las cajas de Petri deben cubrirse de la luz inmediatamente después de colocarlas en las cápsulas y durante el periodo de ensayo. Incubar durante 120 horas (cinco días) a una temperatura de 22 ± 2 °C. Realizar repeticiones para cada dilución ensayada.⁴

Medida de los puntos finales de evaluación de la fitotoxicidad.

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 periodo de exposición (120 h), se procede a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y del hipocótilo.⁴

Efecto en la germinación: Registrar el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula.

Efecto en la elongación de la radícula e hipocótilo.

Utilizando una regla o papel milimetrado, medir cuidadosamente la longitud de la radícula y del hipocótilo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de tóxico o dilución de muestra y a los controles. La medida de elongación de la radícula se considera desde el nudo (región más engrosada de transición entre la radícula y el hipocótilo) hasta el ápice radicular. La medida de elongación del hipocótilo se considera desde el nudo hasta el sitio de inserción de los dos cotiledones. Estadios por los que atraviesa la semilla durante el ensayo de germinación y elongación.⁴

Antes de retirar las plántulas de las cápsulas de Petri para evaluar el efecto en los puntos finales anteriormente mencionados, es importante realizar una observación detallada del estado general de las mismas y del crecimiento de la radícula sobre el papel de filtro. Informar cualquier indicador de fitotoxicidad o de crecimiento anormal en las plántulas tratadas y en los controles (ápices radiculares con necrosis, pelos absorbentes poco desarrollados, radículas con crecimiento ensortijado, necrosis en los cotiledones, etcétera). La necrosis (presencia de tejido muerto) se evidencia como manchas localizadas de coloración parda, blanca o marrón. Al evaluar el efecto en la germinación,



consignar además aquellas semillas con germinación anormal (emergencia de cotiledones o cotiledones e hipocótilo solamente, pero sin emergencia de la radícula) o con desarrollo de hongos.⁴

Un procedimiento factible de realizar para facilitar la medición de la radícula e hipocótilo, es proceder a congelar las cápsulas de Petri correspondientes a todos los tratamientos y descongelarlas a medida que se van midiendo (no conservar el material luego de ser descongelado).⁴

De esta manera, las plántulas descongeladas adquieren una consistencia blanda, favoreciendo la medición. Si se procede a evaluar el efecto sobre las plantas descongeladas es importante proceder de igual manera con todas las réplicas de la prueba. Este procedimiento reduce la variabilidad en las medidas, principalmente cuando el crecimiento de las radículas es ensortijado o no es parejo.⁴

Por otro lado, antes de congelar el material se debe realizar previamente la observación general de efectos fitotóxicos en las plantas vivas al finalizar el periodo de exposición.⁴

Control de calidad de la prueba.

El ensayo deberá repetirse en caso de que los controles presenten:

En el control negativo:

- ☞ Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- ☞ Alta variabilidad en la elongación de la radícula ($CV > 30\%$).⁴

En el control positivo:

- ☞ Porcentaje de germinación inferior al 90%.
- ☞ Variación de la sensibilidad de las semillas fuera de lo permitido por las cartas control.⁴



Posibles interferencias en el proceso normal de germinación o desarrollo de las plántulas en los controles:

- Toxicidad del sustrato: cuando se reemplaza el papel utilizado por otras marcas más económicas o se utiliza papel de filtro cualitativo en planchas, hay que tener en cuenta los posibles efectos tóxicos del papel. Si se han tenido buenos resultados con una marca o calidad determinada de papel, es conveniente no variar el sustrato de ensayo.⁴
- Suciedad de las cápsulas: si no es posible utilizar material descartable, es importante asegurar un enjuague minucioso del material para evitar la presencia de residuos de detergente u otra solución de limpieza.⁴
- Exceso de agua o de muestra utilizada para embeber el papel; esto determina una baja disponibilidad de oxígeno necesario para el normal desarrollo del proceso de germinación. El papel de filtro utilizado como sustrato de germinación de las semillas debe estar bien mojado, con sobrante de líquido para evitar la desecación, pero en ningún caso las semillas deben quedar sumergidas.⁴
- Déficit hídrico durante el periodo de exposición: se recomienda envolver las cápsulas con una bolsa plástica para evitar que el papel de filtro de las mismas pierda agua durante el ensayo. Si se está experimentando con compuestos volátiles, no deben colocarse en una misma bolsa cápsulas que correspondan a diferentes concentraciones de ensayo. También se puede colocar dentro de la cámara de cultivo un recipiente con agua para generar un ambiente húmedo, reduciendo así la evaporación. Hay que tener en cuenta que la pérdida de humedad de las cápsulas genera una concentración del tóxico cuya toxicidad estamos evaluando y, por lo tanto, las conclusiones a las que arribaremos serán erróneas.⁴
- Exposición a la luz durante el proceso de imbibición: inmediatamente después de colocar las semillas sobre el papel de filtro, se recomienda tapar y envolver las cápsulas de Petri cubriéndolas de la luz (para el caso de semillas fotoblásticas negativas).⁴



- Temperatura de ensayo: las semillas de *Lactuca Sativa* expuestas a una temperatura superior (apenas unos grados) a la óptima para la germinación, no germinarán aunque se les coloque posteriormente a temperaturas inferiores (termodormancia o dormancia inducida por la temperatura).⁴

Expresión de los resultados.

Se realizan los siguientes cálculos:

- ❖ Promedio y desviación estándar de la elongación de la radícula y del hipocótilo de las plántulas de cada repetición.⁴
- ❖ Porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula y del hipocótilo, con el promedio de elongación para cada dilución respecto del promedio de elongación del control negativo.
- ❖ Porcentaje de inhibición en la germinación. ⁴

Elaborar la gráfica dosis-respuesta colocando en la ordenada el porcentaje de inhibición y en la abscisa, la concentración. Mediante un método gráfico o el uso de programas estadísticos, calcular la concentración que produce el 50% de inhibición (CI50/CE50) para cada punto final evaluado. Para el caso de muestras en donde la inhibición es inferior al 50%, o para determinar el valor correspondiente al NOEC o LOEC, se realiza el análisis de comparación de medias (t Student, Dunnett) para verificar la significancia estadística en el porcentaje de efecto.⁴

Interpretación de los resultados

Los efectos cuantificados sobre la elongación de la radícula o del hipocótilo son efectos subletales. 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.⁴



Al evaluar la fitotoxicidad de muestras ambientales complejas o con compuestos volátiles, en algunos casos se ha observado que al finalizar el periodo de exposición, la inhibición en la germinación es elevada, pero si se extiende el periodo 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.⁴

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 no debe ser interpretada como un efecto favorable o estimulante. Si bien es posible que muchos compuestos (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 batería, se ha detectado en diferentes ocasiones que la exaltación en la respuesta en el hipocótilo y/o radícula se corresponde con toxicidad frente a otros ensayos de la batería.⁴

❖ **Marcha Analítica de cationes.**

Es el procedimiento por el cual identificamos los aniones o cationes que se encuentran en una muestra.²³

Una marcha analítica involucra una serie de pasos basados en reacciones químicas, en donde los iones se separan en grupos que poseen características comunes. Luego estos grupos de iones pueden ser tratados químicamente para separar e identificar reacciones específicas selectivas de cada uno de los iones que la componen. La separación y



análisis de cationes en solución siguen patrones determinados por las diferencia de solubilidad de varios tipos de compuestos de los iones metálicos.²³

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.²³

Grupo I: Este grupo está constituido por iones plata (Ag^+), mercurio (Hg_2^{2+}) y plomo (Pb_2^+), los cuales se caracterizan por formar precipitados en presencia de ácido clorhídrico diluido.²³

Procedimiento:

1. Coger un tubo de ensayo con la disolución por analizar. Esta disolución puede contener todos o algunos de los cationes de metales pesados: Ag^+ , Hg_2^{2+} , Pb_2^+ , además de otros iones de distinta naturaleza.²⁴
2. Echar unas gotas de HCl 2N en el tubo de ensayo. Todos los metales pesados precipitarán en forma de cloruros (no solubles en frío) de color blanco.²⁴
3. Colocar un embudo con filtro (en el aro sujeto al soporte) 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.²⁴
4. Calentar agua destilada en un vaso de precipitado con el mechero hasta que empiece a ebulir. 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.²⁴



5. Para comprobar que el plomo ha pasado a la disolución, echamos unas gotas de yoduro potásico KI en el vaso. Si existe plomo, se formará yoduro de plomo PbI_2 que da un precipitado amarillo.²⁴
6. Ahora vamos a separar la plata y el mercurio que quedan en el filtro. Preparamos una disolución de amoníaco diluyendo 10 ml de NH_3 concentrado al 25% con agua destilada hasta 50 ml. Decantamos la disolución de amoníaco sobre el filtro y un vaso de precipitado limpio. La plata se disuelve formando el complejo amónico $Ag(NH_3)_2^+$, mientras que el mercurio sufre una dismutación en el medio básico del amoníaco:



El mercurio metálico y el óxido permanecen en el filtro en forma de precipitados de color metálico y negro, respectivamente.²⁴

Materiales y equipos:

1. Pipeta de 5 ml.
2. Pipeta de 10 ml.
3. Vaso precipitado.
4. Varillas de vidrio.
5. Tubos de ensayo.
6. Vidrio reloj.
7. Soporte universal.
8. Embudo para filtrar.
9. Centrífuga.
10. Papel filtro.
11. Matraz volumétrico.²³

Reactivos:

1. Muestra para analizar con contenido de iones de Ag^+ , Fe^{+3} y Cu^{+2}
2. Ácido Clorhídrico (HCl).
3. Amoníaco (NH_3).
4. Hidróxido de Sodio (NaOH).²³



DISEÑO METODOLÓGICO

Tipo de Estudio: Experimental.

Área de Estudio: Laboratorio de Microbiología y Farmacognosia de la Facultad de Ciencias Químicas.

Universo de Estudio: Bolsas de Aguas comercializada en tres puntos de la Ciudad de León (Mercadito de Sutiaba, Mercado la Estación y Parque Central).

Tamaño de la Muestra: Corresponde a tres diferentes marcas que se comercializan en cada uno de los puesto de ventas en (Mercadito de Sutiaba, Estación de León, Parque central).

Criterios de Inclusión:

- ✓ Aguas en Bolsas que se comercializan en los 3 puntos seleccionados en la ciudad de León, (Mercadito de Sutiaba, Mercado la Estación y Parque Central).
- ✓ Agua que tenga la presentación de bolsas y que sea etiquetada por su fabricante.
- ✓ Bolsas de aguas que no se encuentren vencidas según etiqueta de fabricación.

Criterios de Exclusión:

- ❖ Agua en Bolsas que no sean comercializada en los puntos de la ciudad de León seleccionados.
- ❖ Agua que no tengan la presentación de bolsas.
- ❖ Bolsas de agua que estén vencidas según etiqueta del fabricante.

Unidad de Análisis: Agua de bolsa que se comercializan en la Ciudad de León.

Variables:

1. Método del Número más Probable.
2. Cuantificación de Bacterias Aerobias Mesófilas.
3. Bioensayo de Toxicidad Aguda con *Allium cepa L.*

4. Ensayo Cualitativo Marcha analítica.

Fuente de información:

Primaria y secundaria, la primera debido a que es un estudio de experimentación y la información se obtendrá a través de estos experimentos y la secundaria porque se utilizaran medios bibliográficos que sustenten los resultados.

Procesamiento y Análisis de la Información:

La información obtenida se analizó por medio de métodos computarizados, utilizando los programas Microsoft Office: Word 2010, Excel 2010.

Los datos se presentaron en tablas de salidas con sus respectivos gráficos.



Operacionalización de variables:

Variable	Concepto	Indicadores	Escala
Método del Número más Probable	Método para la detección y enumeración en agua de organismo Coliformes Totales, organismo Coliformes Fecales (termo tolerantes) y <i>Escherichia coli</i> presuntivas, mediante el cultivo de un medio líquido en tubos múltiples y el cálculo de su NMP en la muestra.	Presencia o Ausencia de Turbidez y producción de gas.	NMP/ ml
Cuantificación de Bacterias Aerobias Mesófilas.	Número de UFC de bacterias capaces de crecer en un medio agar nutritivo y verifica la limpieza del agua.	Conteo de colonias en la placa de agar.	UFC/mL.
Bioensayo de Toxicidad Aguda con <i>Allium cepa L</i>	Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden favorecer en un corto tiempo después de una dosis única de una sustancia o de varias dosis administradas en 24 horas.	Crecimiento de raíces. Inhibición de crecimiento de raíces	% Inhibición
Marcha Analítica.	Conjunto de técnicas prácticas basadas en el conocimiento de las propiedades de los iones y de las leyes por las que se rigen las reacciones, las circunstancias en que estas se verifican y que tienen por objeto separar de una manera sistemática los iones presentes en una muestra problema, para proceder luego a su reconocimiento individual definitivo	Cualitativa se obtienen un cambio de coloración	Intensidad de la Coloración

**Materiales, reactivos y equipos.**

Material	Equipo	Reactivos
Beacker 100 y 500ml.	Balanza Analítica: Modelo	HCl Concentrado.
Balones 100, 250 y 1000ml.	Surtorios serie TE2145.	H ₂ O Destilada.
Probeta 100ml.	Incubadora doble a 36 ⁰ C	Cu (SO ₄) ₂
Erlenmeyer de 250 ml.	precion Scientific: Modelo 6M.	H ₂ O de Bolsa.
Gradilla.	Autoclave para esterilizar los	Caldo Lactosado.
Tubos de Ensayos.	medios de cultivos pelton Cod:	Agar Digerido
Espátula.	61139.	Caseína y Soya
Pipeta de 1, 5 y 10ml.	Cocina Cornig Hot plate pc-100.	KH ₂ PO ₄
Bisturí.	Balanza triple brazo, capacidad	NH ₄ OH
Regla milimetrada.	2610g, OHAUS.	K ₂ CrO ₄
Placa petri.	Baño Maria CMS 392-159.	CH ₃ CH ₂ OH
Asa.	Agitador Vortex Scientific	
Mechero Bunsen.	Industries Modelo: K550G UL	
Fosforo.	Listed.	
Papel Aluminio.		

Procedimientos para:

1. Recolección de la Muestra:

- a. Se compraron 20 bolsas de agua en los diferentes puntos seleccionados: Mercadito Sutiaba, Parque Central y la Estación de León. Se etiquetaron para identificarlas.
- b. Las muestras se trasladaron en un termo con hielo para mantenerlas frescas y así poder realizar el mismo día el ensayo microbiológico.

2. Preparación de la Muestra:

Una vez trasladada del lugar de compra al laboratorio, se procedió a sacar de las bolsas donde estaban almacenadas y se cortaron con una tijera esterilizada, para depositarla en los Erlenmeyer previamente esterilizados para la preparación del pool. Una vez realizado el ensayo microbiológico las aguas restantes se almacenaron dentro de un refrigerador a una temperatura de 5° C, para su posterior uso.

Ensayo microbiológico para Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

Test presuntivo:

1. Se realizó el Pool para tener una mayor representatividad de la muestra, para esto se utilizaron 10 bolsas de agua. Para realizar la toma de muestra se esterilizaron cada una de las bolsas con alcohol al 70%, se adicionó 25 ml de cada bolsa hasta obtener un volumen total de 250mL.
2. Se decantó 150mL de este en un pichel, para obtener un volumen total de 100mL de la muestra en un Erlenmeyer.
3. Preparamos nuestras diluciones utilizando 1 erlenmeyer que contenía 90mL de buffer y 2 tubos de ensayo contenía 9mL del buffer (fosfato monobásico de potasio), luego procedimos:
 - La primera 10^{-1} (1:10): se agregó 10mL de la muestra.
 - La segunda 10^{-2} (1:100): se agregó 1mL de la primera dilución.

- La tercera 10^{-3} (1:1000): se agregó 1mL de la segunda dilución.
- 4. Por cada dilución se tomó 1mL adicionándole respectivamente a 2 placas petri que contenían de 15 - 18 mL de A.D.C.S (Agar digerido de caseína soya).
- 5. Se realizó control del medio, en una placa petri conteniendo A.D.C.S (Agar digerido de caseína soya). Incubando a 36-37°C por 48 horas.
- 6. Se realizó control del medio ambiente, en una placa petri conteniendo A.D.C.S (Agar digerido de caseína soya), dejándolo por 10 segundos destapada.
- 7. Incubando a 36-37°C por 48 horas.

Nota: este procedimiento se realizó para cada una de las muestras.

Interpretación:

- a. Si el total de tubos son negativos: El examen se da por terminado, reportando la ausencia de Coliformes totales y fecales en la muestra analizada.
- b. Todos aquellos tubos que den positivos para prueba presuntiva se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la prueba confirmatoria para Coliformes totales y fecales.

Ensayo microbiológico para detectar presencia de coliformes fecales y totales.

Número más Probable (NMP):

1. Se realizó en el área de sembrado de los laboratorios de Microbiología.
2. Se utilizó el pool que se realizó en la prueba de Bacterias Aerobias Mesófilas, utilizando una batería de 12 tubos de ensayo para cada muestra siendo lo siguiente:
 - A los 3 primeros tubos: teniendo concentración doble (2.6g/100mL) de caldo lactosado (medio de cultivo), se agregaron 10mL del pool.
 - Los 6 tubos siguientes: teniendo concentración simple (1.3g/100mL) de caldo lactosado, se agregaron 1mL a los 3 primeros tubos y 0.5mL de pool a los 3 siguientes.



- Los 3 últimos tubos: 2 se utilizaron para prueba positivo a este se le agregó *E.coli* y caldo lactosado. Y el último tubo se utilizó para prueba negativo de este.
 - Se introdujo la campana Durham.
3. Incubando a 36-37°C por 48 horas.

Interpretación:

- a. Si se observa turbidez y producción de gas: La prueba se considera POSITIVA, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- b. Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez: Se consideran NEGATIVOS, estableciéndose el Código 0, 0,0 para efecto del cálculo del Número más probable (NMP).

Procedimiento bioensayo de toxicidad aguda para la determinación de minerales con *Allium cepa* L.

- a) Los cebollines fueron comprados en los mercados de la ciudad de León.
- b) En el laboratorio, se procedió a lavarlos con agua destilada, secarlos y pelarlos con ayuda de un bisturí se cortaron varias capas hasta obtener bulbos de aproximadamente 1.5 cm de diámetro cortándose las raíces que estas presentaban dejándose el primordio central limpio.
- c) Se preparó la solución de Sulfato de Cobre II 0.02M pesando 0.798g y se diluyó en un balón de 250 ml, de esta solución madre se prepararon diluciones a las siguiente concentraciones: 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml y 1 mg/ml en balones de 50 ml. (control positivo), realizaron 8 réplicas por concentración.
- d) Luego se prepararon soluciones de las muestras a concentraciones de 0.5 ml/ml, 0.75 ml/ml y 1 ml/ml en balones de 100 ml.
- e) Se llenaron cada uno de los tubos de las muestras hasta el borde realizando ocho réplicas por cada concentración.



- f) Se colocaron los bulbos en el borde de los tubos con el fin de que el primordio quedara en contacto con las soluciones correspondientes.
- g) Se tomó en cuenta las condiciones del ensayo, durante el tiempo de prueba se rellenaron los tubos de ensayo dos veces al día durante tres días (72 horas) con las soluciones correspondientes ya que los bulbos absorbían dichas soluciones.
- h) Cumplidas las 72 horas se midió con una regla la longitud de las raíces una por una, luego se calcularon los promedios de las 8 réplicas por cada una de las concentraciones de cada muestra.
- i) Luego se obtuvo el resultado del porcentaje de inhibición utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Longitud de raíz control} - \text{Longitud de raíz tratada}}{\text{Longitud de raíz control}} \times 100$$

Procedimiento de Marcha Analítica.

Método de la marcha analítica de cationes del grupo I

1. A 4mL de la solución preparada (nuestra muestra), se añadieron dos gotas de HCl 6N y se agitó; se calentó suavemente y se dejó enfriar por completo y se filtró. El filtrado contiene los cationes del grupo.
2. El precipitado cristalino de PbCl₂ se lavó con 1mL de agua fría a la que se le añadió dos gotas de HCl 2N.
3. Se calentó a ebullición agua destilada y se añadieron al precipitado, sobre el mismo se filtró dejando pasar sin succión.
4. A una parte del líquido se añadió dos gotas de ácido acético y otras dos gotas de Cromato de Potasio. Si el precipitado indica amarillo hay presencia de plomo.
5. Si no hay coloración amarilla no hay presencia de plomo.



RESULTADOS

Ensayo microbiológico para determinar Coliformes Totales y Fecales por el método de NMP.

Tabla # 1.

Pruebas presuntivas para Coliformes fecales y totales.

Bolsitas de aguas distribuidas en la ciudad de León.			
No. Mx.	10 ¹	10 ²	10 ³
1.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
2.	Negativo.	Negativo.	Negativo.
3.	Negativo.	Negativo.	Negativo.

Tabla # 2

Recuento de BAM (Bacterias Aerobias Mesófilas).

Bolsitas de aguas distribuidas en la ciudad de León.		
No. Mx.	Resultados	Especificación
1.	Negativo	< 100 UFC/mL
2.	Negativo.	< 100 UFC/mL
3.	Negativo.	< 100 UFC/mL



Tabla # 3.

Bioensayo de toxicidad aguda con *Allium cepa* L. mediante la evaluación del crecimiento promedio de las raíces de cebollas.

No.	Mx 1.			Mx 2.			Mx 3.			CP			CN
	Concentraciones mg/mL.												
	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	0.5	0.75	1	
1.	0.5	0.4	1.7	1	0	1.3	0.7	0.4	0	0	0	0	0.5
2.	1	0.9	1	0.8	0.3	0.8	0.4	1.1	3.2	0	0	0	0
3.	1.1	1	1.2	0.4	0.2	0.7	1.9	0	1.7	0	0	0	1.5
4.	0	0.2	0	0.6	0.5	2.2	2.2	1	0.8	0	0	0	3
5.	2.4	3	2.2	1.3	3	1.2	1.3	2.6	0.1	0	0	0	1.5
6.	1.5	1.3	0	0.7	0.1	0	1.4	1.4	0.2	0	0	0	0.6
7.	0.4	0.1	0.6	2.2	0.6	0.6	0.1	0	0.4	0	0	0	1
8.	1.3	1.1	1.2	1.3	2.8	0.4	0.4	1.2	1.2	0	0	0	1.5
X	1.02	1	0.98	1.03	0.93	0.9	1.05	0.96	0.95	0	0	0	1.2
% I	14.58	16.66	17.71	13.54	21.87	24.99	12.5	19.79	20.83	100	100	100	0

Lectura: No: Número de réplicas. CP: Control Positivo. CN: Control Negativo

Nota: El promedio obtenido es en unidad de medida en cm

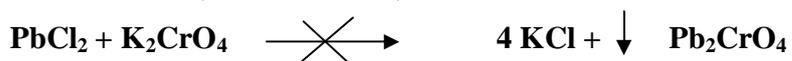
Método de marcha analítica.**Reacción # 1.****Reacción # 2. (No se observó.)**

Tabla # 4. Después de esto se obtuvieron los siguientes resultados.

Muestras.	Coloración	Concentración.
1	Negativa.	0
2	Negativa.	0
3	Negativa.	0



ANÁLISIS DE RESULTADOS

Análisis # 1: Ensayo microbiológico del método NMP.

La calidad del agua está dada por las características físicas, químicas y biológicas que ésta presenta. El análisis de los minerales disueltos, número de bacterias, pH y temperatura entre otros, determinan si una fuente de agua es recomendable para un uso particular.

Con esta investigación se evaluó la calidad del agua de bolsitas que se venden en tres puntos de ventas específicos de la ciudad de León, como: mercadito de Sutiaba, parque central de León y mercado La estación.

Los resultados de dicha investigación revelaron lo siguiente:

Al realizar el análisis presuntivo del ensayo NMP a las muestras recolectadas se encontró que las muestra no presentaron Coliformes Fecales y Totales (ver tabla # 1), por lo tanto al dar negativa dicha prueba no fue necesario la realización de la pruebas confirmativas y complementarias, de acuerdo con los parámetros establecidos en las bibliografías la cual refiere que al dar negativas la prueba presuntiva el examen se da por terminado reportando la ausencia de Coliformes Totales y Fecales en la muestra analizadas. Por lo cual se considera que estas aguas son aptas para el consumo, de acuerdo al reglamento de la calidad del agua para el consumo humano (DS N⁰ 031-2010-SA).

El agua puede arrastrar elementos minerales como hierro, ácidos, azufre, bicarbonato, etc., que en determinadas cantidades resultan peligrosas para la salud humana, así como microorganismos que se encuentran en la superficie de la tierra capaces de provocar enfermedades. La dimensión de este problema es tal que la mala calidad del agua constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial

Análisis # 2: Recuento de bacterias aerobias Mesófilas (BAM).

Los recuentos de Mesófilos Aeróbicos en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua, así como también la eficiencia de las operaciones para eliminar microorganismos, como la sedimentación, filtración y cloración.

La determinación del conteo de bacterias aerobias Mesófilas en una muestra de agua se realiza, normalmente, por siembra en una placa, de un volumen determinado de agua, por incubación a una temperatura concreta y en un tiempo determinado, y por recuento posterior de las colonias desarrolladas y con la aceptación implícita de que cada colonia es originada por una bacteria de la muestra inicial, por lo tanto, el número de colonias equivaldrá al número de bacterias en el volumen sembrado

Las pruebas de recuentos de bacterias aerobias Mesófilas en las tres muestras de agua dieron resultados negativos como se muestran en la tabla #2, es decir, que no hubo crecimiento de Bacterias.

De acuerdo a datos bibliográfico, el agua de buena calidad, para consumo humano, debe tener cuentas bajas de esta bacterias: < 100 UFC por mililitro, tal y como lo mostraron los resultados.

Por lo tanto desde el punto de vista microbiológico las aguas analizadas en el laboratorio están libre de contaminantes biológicos.

Análisis # 3: Bioensayo de toxicidad de *Allium cepa* L.

En esta prueba se determinó la presencia de metales específicamente el Plomo en las muestras de bolsitas de agua, mediante la inhibición del crecimiento de las raíces de *Allium cepa* L.



Se utilizó como control positivo Sulfato de Cobre a una concentración de 0.02 M, en la cual el % de inhibición de las raíces es del 100%, se utilizó como control negativo agua del grifo la que se considera no presentaba presencias de metales, lo cual se confirmó en el laboratorio con un porcentaje de inhibición de un 0% (ver tabla # 3).

Dicho comportamiento se relaciona con lo que la bibliografía menciona al respecto.

Los resultados de esta prueba en las muestras de agua en estudio presentaron un leve % de inhibición en comparación con el control negativo, el cual presenta un nulo % de inhibición que es el ideal, por lo tanto se considera que la presencia de metales no es tan significativa como indicador de contaminación química, por lo que el agua puede ser usada para consumo humano. Ya que en la literatura refiere que el porcentaje de inhibición de las raíces del *Allium cepa L* no debe de ser mayor al 40%, y de esta manera considerar que estas aguas pueden ser consumidas por la población.

Otro aspecto que es importante señalar en los resultados de esta prueba, es que a medida que aumentaba la concentración, aumentaba levemente el % de inhibición de las raíces de los cebollines, lo cual indica un patrón de comportamiento que a mayor concentración, mayor inhibición, sin embargo, debido a que estos cambios fueron leves no se considera que exista contaminación por metales pesados.

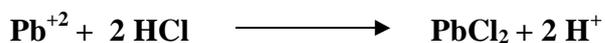
Análisis # 4: Marcha Analítica.

El procedimiento de la marcha analítica se realizó a las muestras de aguas, la cual involucra una serie de pasos basados en reacciones químicas cuya reacción provoca cambios de coloración que indicaba la presencia de metales pesados.

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 logra



al agregar el identificador a las muestras con una temperatura mayor a los 37°C, dicha reacción está dada en la siguiente ecuación:



Se da un precipitado de PbCl_2 el cual es mucho más soluble en caliente que en frío, el precipitado se trata con agua caliente para que ella quede solubilizado el PbCl_2



El PbCl_2 disuelto, se identifica en caliente mediante una solución de K_2CrO_4 , este provee iones CrO_4 para precipitar el PbCrO_4 de color amarillo.

Reacción la cual no se dio en nuestro procedimiento por ausencia de plomo.

El agua sujeta a este procedimiento mostró que estas no tenían presencia de plomo por lo que podían ser útil para consumo.



CONCLUSIÓN



Una vez analizados los resultados del estudio se llegaron a las siguientes conclusiones:

El ensayo microbiológico del Número Más Probable determinó: la ausencia total de Coliformes Fecales y Totales en las muestras analizadas de agua de bolsitas, independientemente de su procedencia, todas las muestras mostraron la ausencia total de estos microorganismos, por lo cual es apta para su consumo, según el reglamento de la calidad del agua para el consumo humano.

La detección de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM) en las muestras de aguas comercializadas en bolsitas en distintos puntos de León, es nula, lo cual la hace apta para su consumo.

En relación al bioensayo de toxicidad aguda *Allium cepa L.*, las muestras en estudios provocaron un mínimo porcentaje de inhibición del crecimiento normal de las raíces de *Allium cepa L.* Para confirmar la presencia de sustancias tóxicas en las muestras, como metales pesados tal es el plomo, se procedió a realizar el procedimiento de marcha analítica, en el cual se determinó que no había presencia del mismo, ya que no se observó el precipitado característico de este proceso, por lo que se concluye que las estas aguas analizadas pueden ser consumidas por la población.

Por lo anteriormente señalado se concluye que la calidad microbiológica y fisicoquímica del agua comercializada en bolsitas en los distintos puntos de la Ciudad de León, es de calidad para el consumo humano.



RECOMENDACIONES

De acuerdo a las conclusiones del presente estudio se recomienda lo siguiente:

1. Seguir realizando estudios experimentales, para monitorear la calidad del agua, a los distribuidores y fabricantes de estas bolsitas de agua que se venden en la ciudad de León.
2. Realizar otros métodos analíticos cuantitativos en la cual se lleve a cabo la identificación de metales.
3. Proponer a las autoridades encargadas de desarrollar el plan académico e incorporar en el área de microbiología y toxicología ensayos donde se pretenda determinar la calidad de agua, no solo de las bolsitas que se venden en los mercados, sino también del agua del consumo que distribuye ENACAL.
4. Dar charlas a la población en general, distribuidores y consumidores de agua de bolsitas, sobre la importancia de la calidad de la misma y sus repercusiones sobre la salud, cuando el agua no presenta las condiciones adecuada.



BIBLIOGRAFÍA



1. Castillo, JL. (2009) Análisis físico químico del agua. México. Fecha de Revisión: 24 Febrero 2014. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos15/analisis-bioquimico-agua/analisis-bioquimico-agua.shtml#ixzz2g15L4aWs>
2. Chirinos A, Guarenas MA, Sánchez Díaz M. (2011). Calidad de Agua. Laboratorio de Análisis de Agua. Departamento de Química. Instituto Universitario de Tecnología Alonso Gamero. Venezuela. Fecha de Revisión: 24 Febrero 2014. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos40/calidad-agua-miranda/calidad-agua-miranda.shtml#ixzz2g1ASWIAa>
3. Gramajo Cifuentes BM. (2004). Determinación de la calidad del agua para consumo humano y uso industrial, obtenida de pozos mecánicos en la zona 11, Mixco, Guatemala. Octubre 2004. Pag 13, 16. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0907_Q.pdf
4. Castillo Morales G. (2004) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Primera edición. México. Fecha de Revisión: 26 Febrero 2014. Disponible en: <http://www.ibcperu.org/doc/isis/6271.pdf>
5. Aguilar Zamora NC. (2012). Determinación de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos para agua apta para consumo humano de Concepción, Quezaltepeque, Chalatenango. San Salvador, El Salvador 2012. Fecha de Revisión: 26 Febrero 2014. Disponible en: http://ri.ues.edu.sv/2071/1/Determinacion_de_parametros_Fcoqcos_y_micros_de_agua_de_CQ_.pdf
6. Paramio JM. Propiedades Físicas y Químicas de agua. (2008). Fecha de Revisión: 27 Febrero 2014. Disponible en:

<http://www.monografias.com/trabajos14/propiedades-agua/propiedades-agua.shtml#ixzz2sVf6MsRQ>

7. Quintos Escalante M, Méndez ME, Herrera Benavides A. Determinación de microorganismos coliformes en agua para consumo humano. México. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN Unidad Durango. Fecha de Revisión: 27 Febrero 2014.
Disponible en:
<http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/8840/DETERMINACION%20DE%20MICROORGANISMOS%20COLIFORMES%20EN%20AGUA%20PARA%20CONSUMO%20HUMANO.pdf?sequence=1>
8. Práctica 7. Microbiología aplicada. Manual de laboratorio. Fecha de Revisión: 27 Febrero 2014. Disponible en:
<http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p17.pdf>
9. Caballero Y. (2007).Potencial Hidrológico Y Calidad De Las Aguas Superficiales En La Subcuenca Del Rio Ochomogo. Centro para la Investigación de Recursos Acuáticos de Nicaragua-(CIRA/UNAN)-Managua. Fecha de Revisión: 28 Febrero 2014. Disponible en:
<http://www.ciraunan.edu.ni/media/documentos/YCaballero.pdf>.
10. Cáceda Quiroz. JC. (2005) Aplicación de Bioensayos en la medición de Toxicidad por metales pesados en fuentes superficiales de agua para consumo humano. Rev. Ciencia y Desarrollo. Perú. Fecha de Revisión: 28 Febrero 2014. Disponible en:
<http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/01011000706.pdf>.



11. Díaz A., García J.A., Ocampo J. y Valdez A. (1977). Método Colorimétrico Simple Para Determinar Plomo Soluble En Esmaltes Cerámicos. Centro de Investigación de Materiales. Universidad Nacional Autónoma de México. Fecha de Revisión: 01 Marzo 2014. Disponible en: http://rmf.smf.mx/pdf/rmf/26/3/26_3_525.pdf.
12. García Bermejo MJ, Colom Valiente MF, Jaramillo Sánchez JA. (2003). Manual del Auxiliar de laboratorio. España Julio 2003. Editorial MAD S.L, Segunda Edición. Cap.45, pág. 528. Fecha de Revisión: 01 Marzo 2014. Disponible en: <http://books.google.com.ni/books?id=ifnceRGlYc&pg=PA528&dq=control+de+bacterias+aerobias+mesofilas+en+agua&hl=es-419&sa=X&ei=1msGU9vsKJe0sASm-IHoDQ&ved=0CC8Q6AEwAQ#v=onepage&q=control%20de%20bacterias%20aerobias%20mesofilas%20en%20agua&f=false>.
13. Arauz L, Espinoza Zelaya MJ, Jirón Ruiz OA. (2008). Análisis Microbiológico de Agua purificada que se comercializa en bolsas y botella en la ciudad de León, 2008. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Monografía para optar al título de Licenciado Químico Farmacéutico.
14. Guevara Villavicencio O, Gómez Ortega JC, Silva Ríos DR. (2000). Diagnóstico de la calidad de agua de consumo en las comunidades rurales de Abangasca Sur y Troilo del municipio de León 2000. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
15. Herrera, GM. Carrasco López, JM, Centeno Altamirano, GD. Chávez, IA (2013), Determinación de la Calidad del Agua Mediante Indicadores Biológicos y Físicoquímicos en la Comunidad El Paragua. Malpaisillo,



Marzo-Julio 2013. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
Monografía para optar al título de Licenciado Químico Farmacéutico.

16. Gutiérrez M (1994). Normas CAPRE sobre calidad de agua de consumo humano, Panamá. PA, Septiembre, 1994.
17. Consuegra A, Vidal J. (2008). Evaluación sobre calidad microbiológica del agua envasada en bolsa, producidas en Sincelejo, Colombia, Diciembre 2008.
18. Sánchez Pérez, HJ. Vargas Morales, MG. Méndez Sánchez, JD. (2000) Calidad bacteriológica del agua para consumo humano en zonas de alta marginación de Chiapas. Sección de Patógenos, Laboratorio del Centro de Investigación de Paludismo, Instituto Nacional de Salud Pública, Tapachula, Chiapas, México. vol.42, no.5. Fecha de Revisión: 01 de Julio 2014. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/spm/v42n5/3990.pdf>
19. Gobierno de España. Ministerio de Sanidad y Consumo (2008). Calidad del Agua de Consumo Humano en España. Fecha de Revisión: 01 de Julio del 2014. Disponible en: https://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/docs/Calidad_agua_consumo_Informe_Trienio2005-07.pdf
20. República de Nicaragua. Empresa Nicaragüense de Acueductos y Alcantarillados. / OMS. (2006). ABC sobre el recurso agua y su situación en Nicaragua. Managua, Marzo 2006. Fecha de Revisión: 01 Julio 2014. Disponible en: <http://www.enacal.com.ni/media/imgs/informacion/ABCdelAgua2.pdf>



21. Vargas García, C; Rojas Vargas, R; Casas, J.J; (2009). Control y Vigilancia de la Calidad del Agua de Consumo Humano. Fecha de Revisión: 01 de Julio del 2014. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/cd-cagua/ref/text/09.pdf>

22. Arce, O. Herbas Antezana, RC. Rivero Ostoic, F. Gonzales Ramos A. (2006) Indicadores Biológicos de Calidad del Agua. Cochabamba, Colombia. Fecha de Revisión: 01 de Julio 2014. Disponible en: <http://af2.wikispaces.com/file/view/indicadoresBiologicosCalidadAgua.pdf>

23. Collao MI, Carvajal L, Mella R, Fredes L, Contreras M, Pinto A. (2011). Laboratorio N° 1 Análisis cualitativo de cationes. Universidad Tecnológica de Chile. Fecha de Revisión: 01 Julio 2014. Disponible en: <http://apmine.files.wordpress.com/2011/05/informe.pdf>

24. Práctica 8: disolución reguladora de pH. Analítica de metales pesados. Fundamentos de química. Fecha de Revisión: 01 Julio 2014. Disponible en: <http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/docencia/quimbiotec/FQpractica8.pdf>

25. Práctica 16: Recuento de bacterias Mesófilas aerobias en agua para consumo humano. Manual de Laboratorio Microbiología aplicada. Fecha de Revisión: 02 Julio 2014. Disponible en : <http://www.azc.uam.mx/cbi/quimica/microbiologia/p16.pdf>



Anexos



GLOSARIO

1. **Allium cepa L:** Comúnmente conocida como cebolla, es una planta herbácea bienal perteneciente a la familia de las amarilidáceas. Es la especie más ampliamente cultivada del género *Allium*, el cual contiene varias otras especies que se denominan como «cebollas» y que se cultivan como alimento.
2. **Biocenosis:** También llamada comunidad biótica, ecológica o simplemente comunidad; es el conjunto de organismos de todas las especies que coexisten en un espacio definido llamado biotopo, que ofrece las condiciones ambientales necesarias para su supervivencia.
3. **Coliformes:** Grupo de bacterias que comprende todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram negativos, no esporulados que producen ácido y gas al fermentar la lactosa.³
4. **CAPRE:** Comité Coordinador Regional de Instituciones de Agua Potable y Saneamiento de Centroamérica, Panamá y República Dominicana. Norma Regional de Calidad del Agua.
5. **Detoxificación:** Desechar o eliminar tóxicos del organismo.
6. **Dormancia:** período en el ciclo biológico de un organismo en el que el crecimiento, desarrollo y actividad física se suspenden temporalmente.
7. **Fitotóxicos:** sustancias orgánicas o minerales dañinas para el desarrollo y el crecimiento de las plantas.
8. **Hipocótilo:** Es el término botánico usado para referirse a una parte de la planta que germina de una semilla.



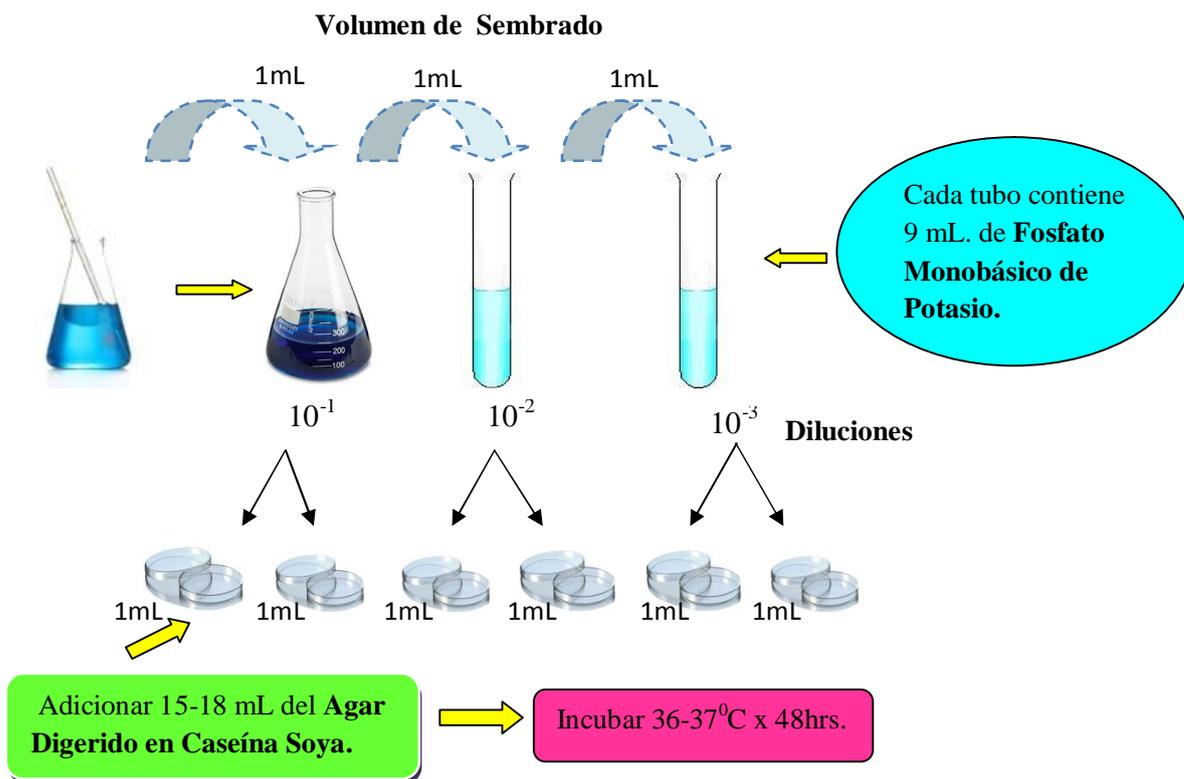
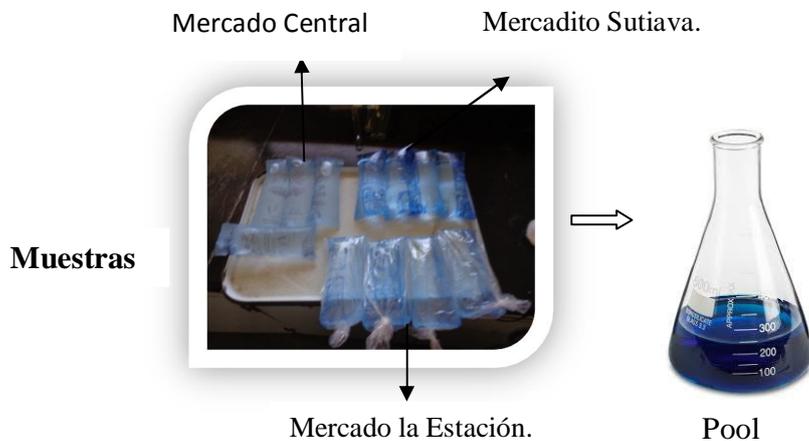
9. ***Lactuca sativa L***: Comúnmente conocida como Lechuga, es una hortaliza típica de climas frescos.

10. **Sulhidración**: Proceso de adicionar un reactivo que contenga sulfuro de hidrogeno.

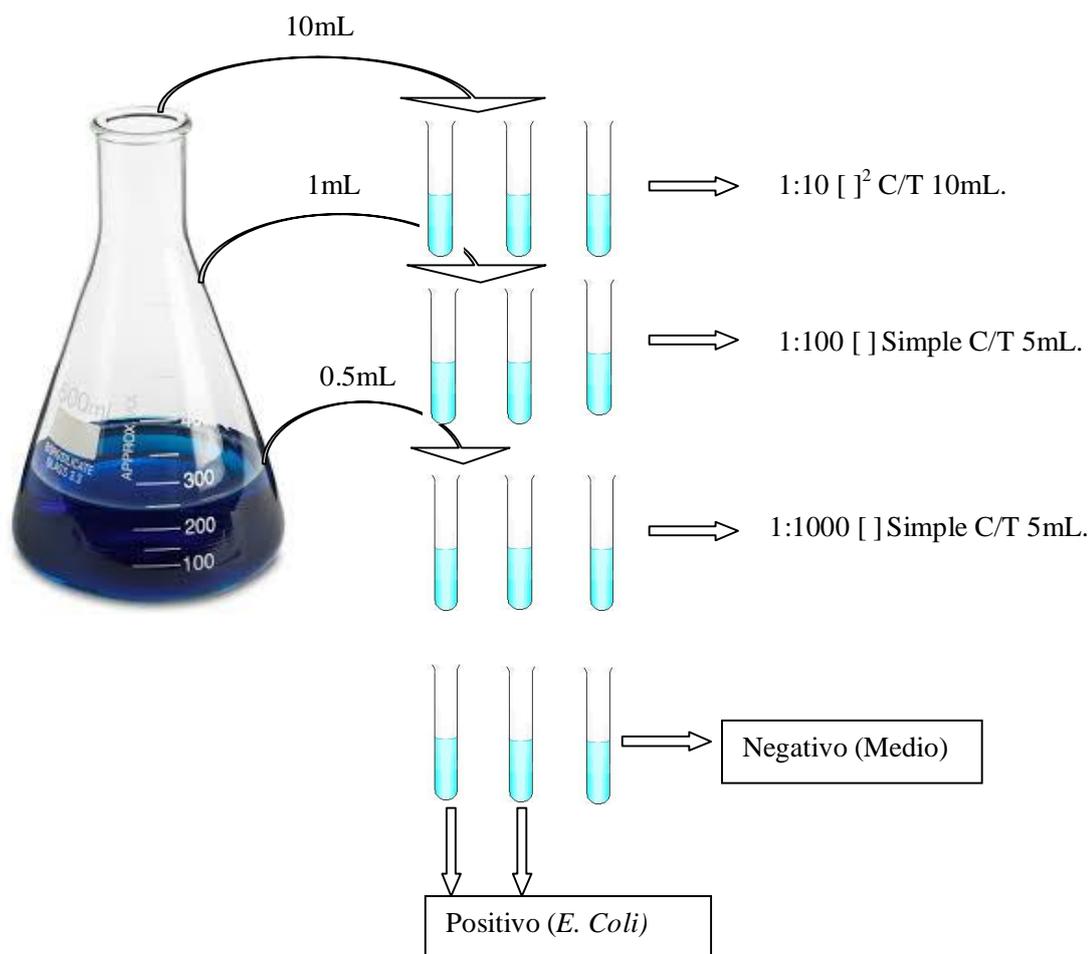
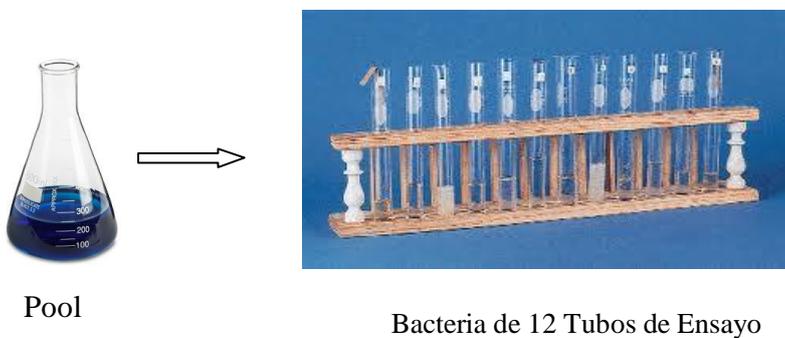
ABREVIATURAS

1. **ADCS:** Agar digerido de caseína de soya.
2. **Mcg/l ó g/L:** Microgramos por Litro.
3. **Mg/L:** Miligramos por Litro.
4. **NMP:** Número más probable
5. **OPS:** Organización Panamericana de Salud.
6. **P.P.M:** Partes por millón.
7. **UFC:** Unidades formadoras de colonias.

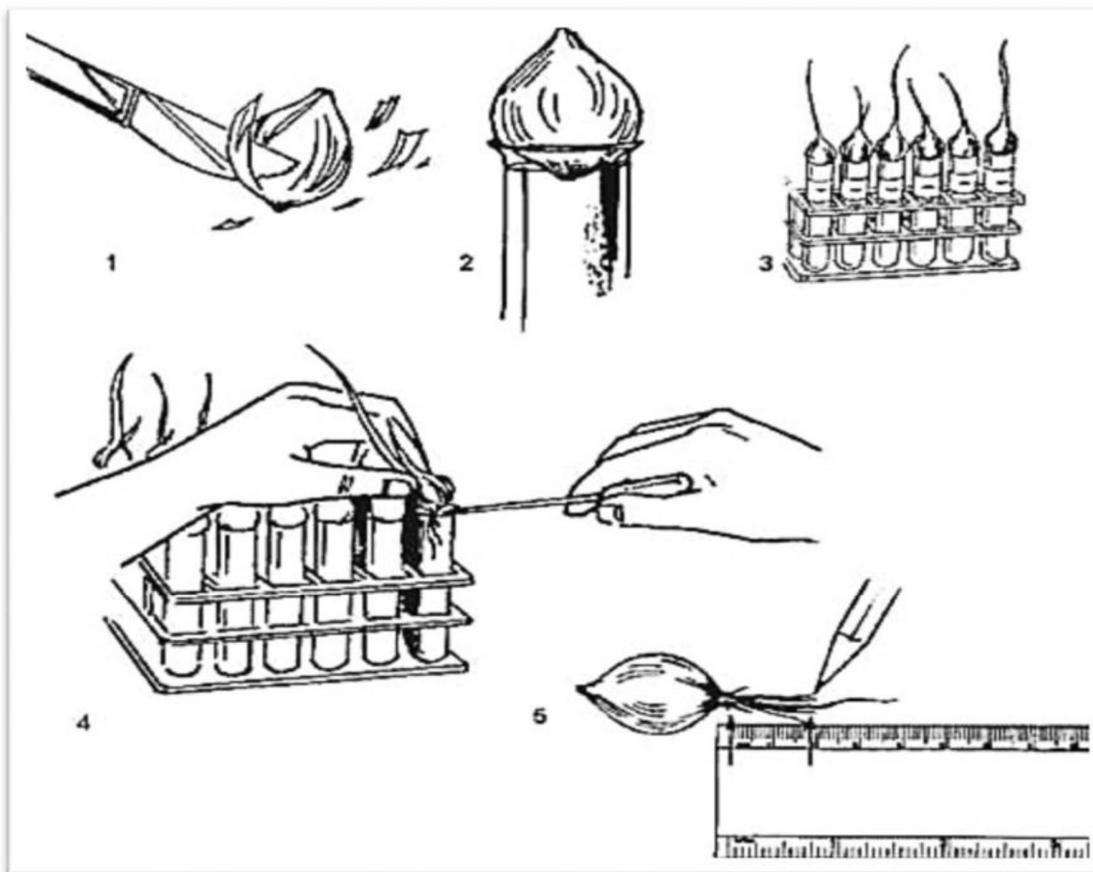
Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.



Número Más Probable.

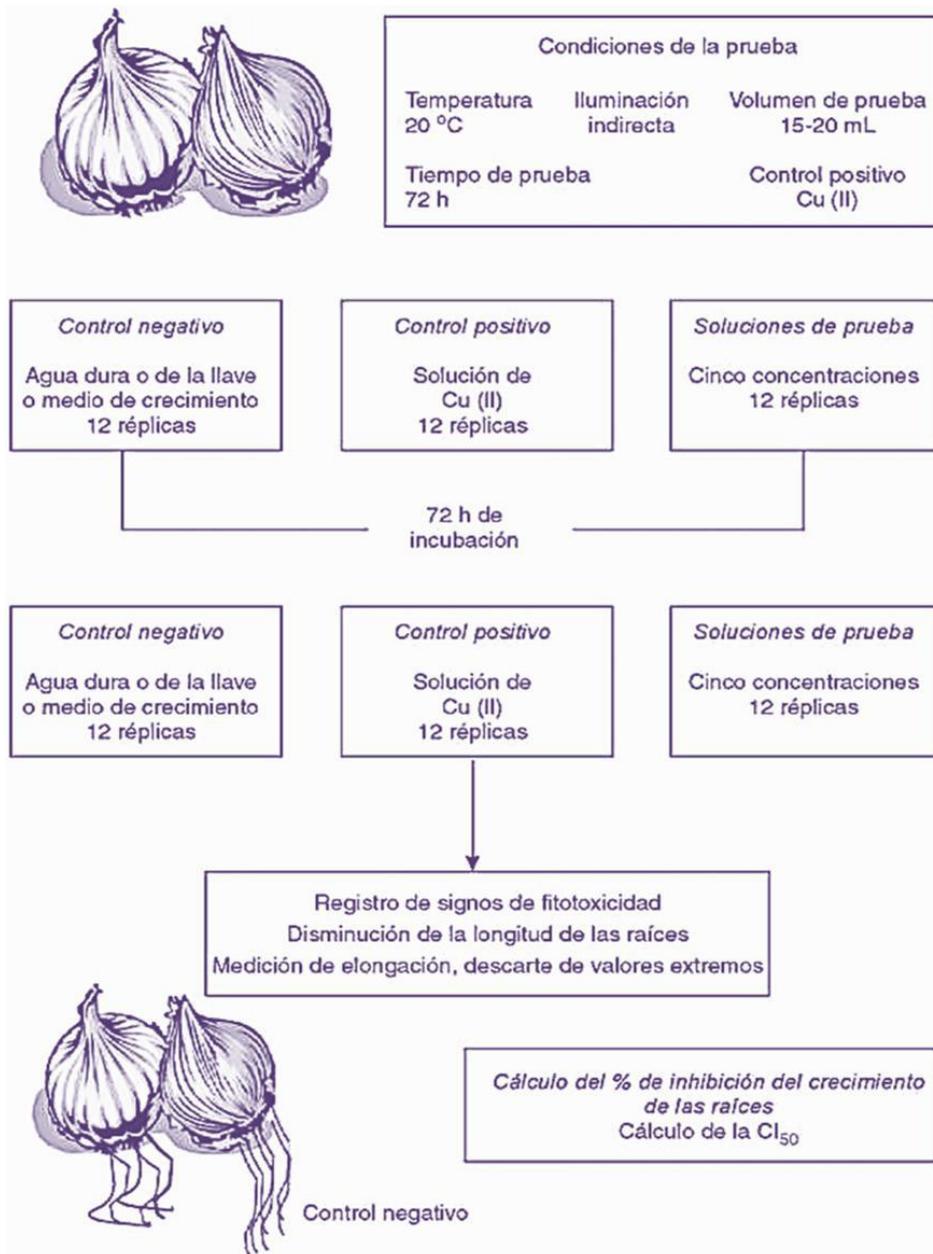


Esquema gráfico de los pasos a seguir en la prueba con *Allium cepa* l.

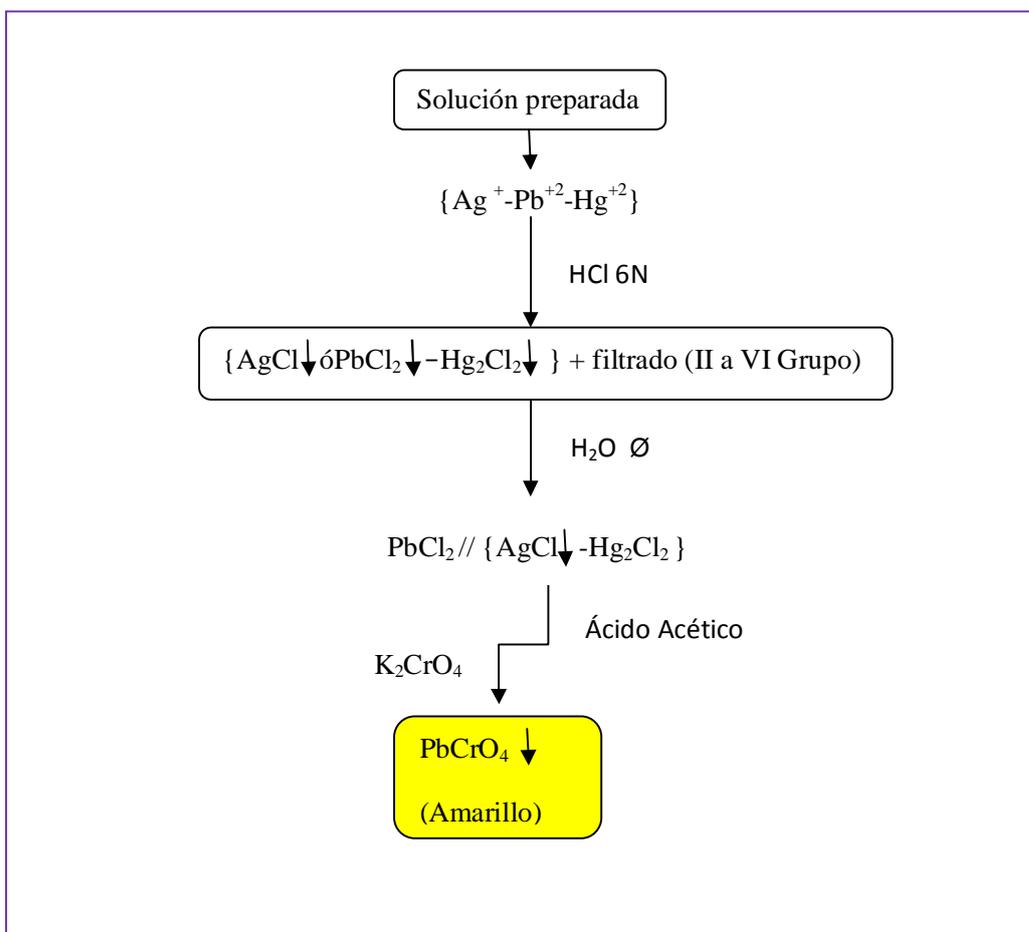


1. Limpieza y pelado de bulbos.
2. Ubicación de bulbos en tubos para exposición a las soluciones de ensayo.
3. Colocación de tubos en soporte.
4. Agregado de soluciones a tubos durante el ensayo.
5. Medición de longitud de raíces al finalizar el tiempo de exposición de los bulbos.

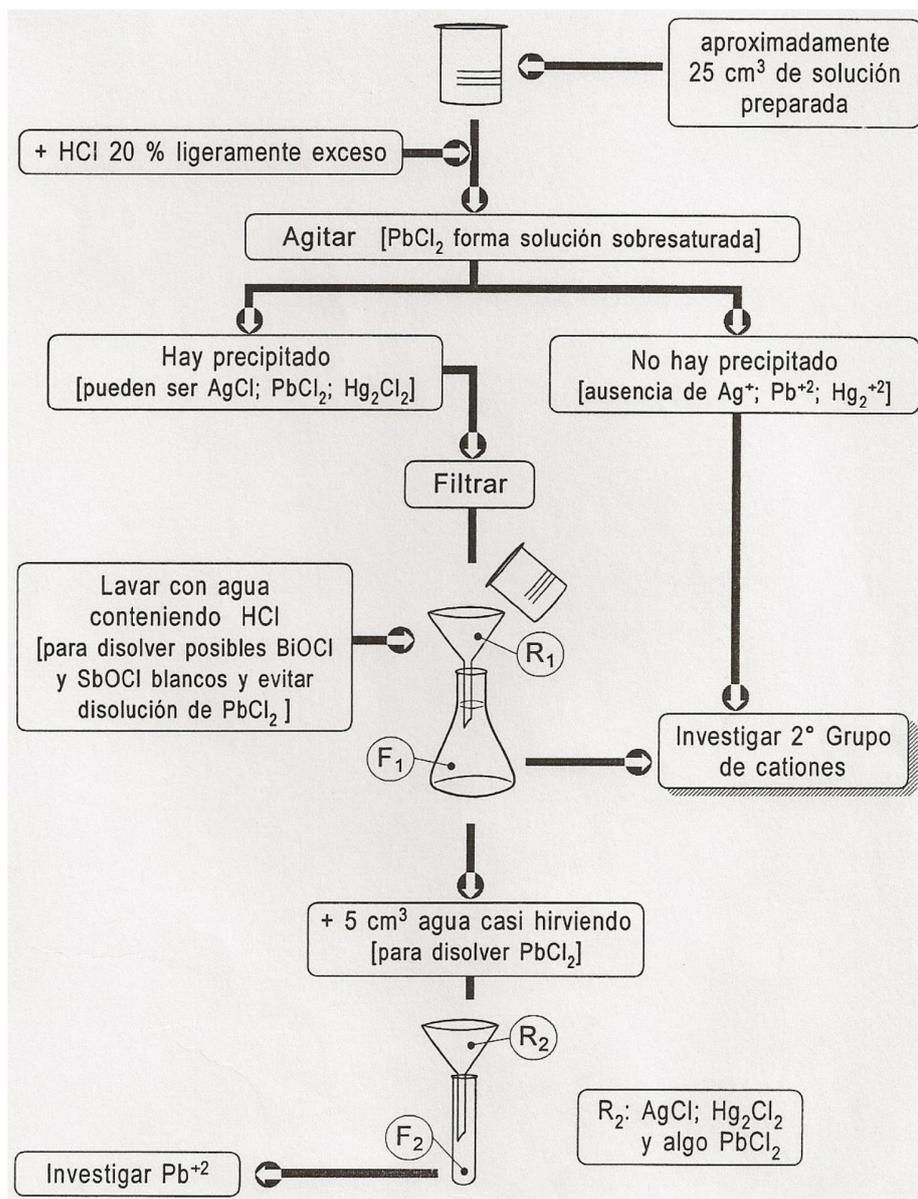
BIOENSAYO DE TOXICIDAD CON *ALLIUM CEPA L.*



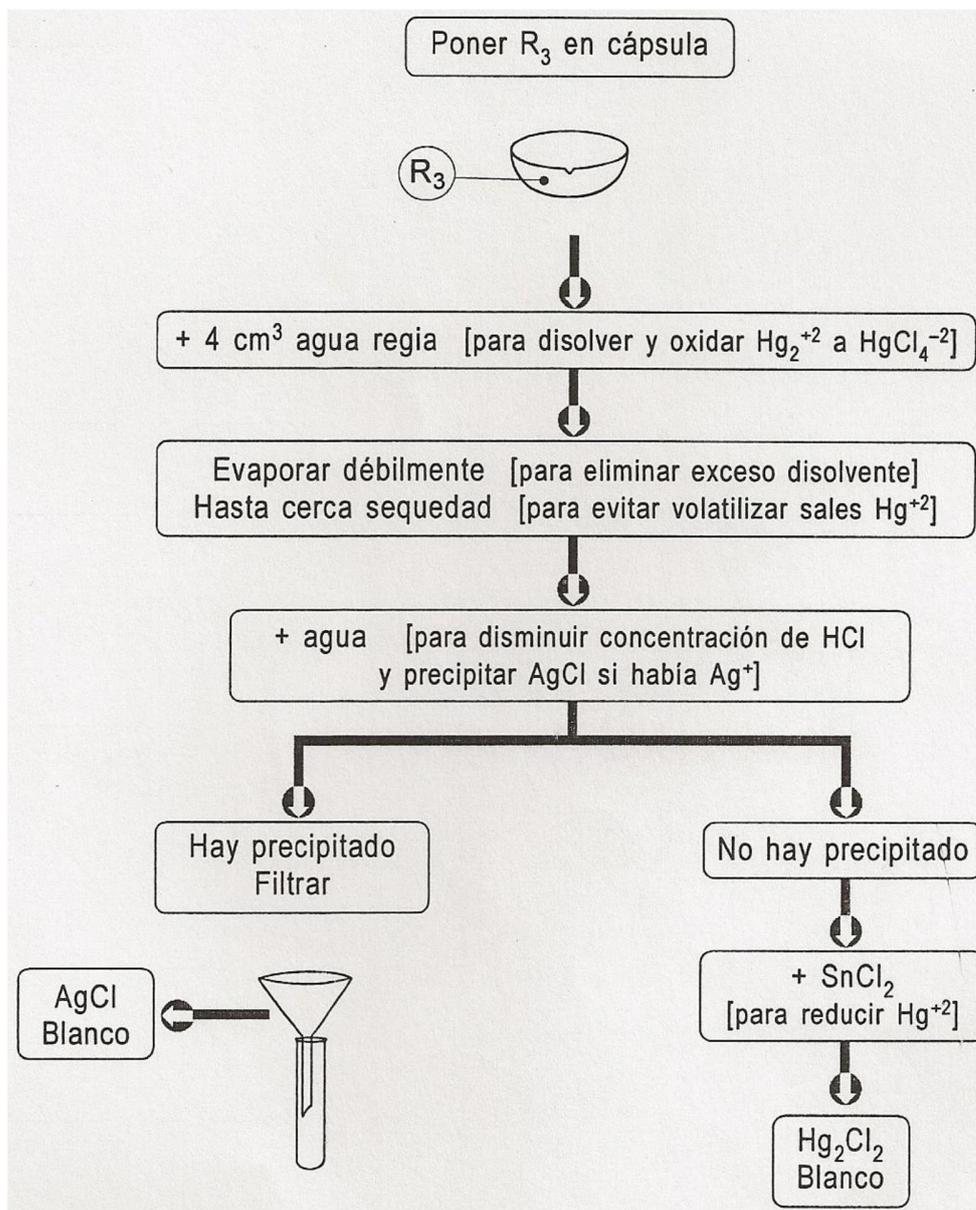
Precipitación, Separación y Caracterización de los cationes del Grupo I.



Marcha esquemática de la técnica operatoria del 1º Grupo de Cationes.



Marcha esquemática de la técnica operatoria del 1º Grupo de Cationes.



Preparación de los medios de cultivos

Prueba presuntiva para Coliformes: Caldo Lactosado

- a. **Concentración Simple:** Se pesó 1.3g de polvo Caldo Lactosado, se transfirió a un Erlenmeyer, dicho polvo se disolvió con 100 ml de agua. Una vez preparado el caldo, este se transfirió a 9 tubos de ensayo. Cada tubo contenía 5ml del caldo.
- b. **Concentración Doble:** Se pesó 2.6g de polvo Caldo Lactosado, se transfirió a un Erlenmeyer, dicho polvo se disolvió con 100 ml de agua. Una vez preparado el caldo, este se transfirió a 3 tubos de ensayo, cada tubo contenía 10ml del caldo.

Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas

- a. **Agar digerido en caseína de soya (ADCS):** Se preparó 450mL de agar digerido en caseína de soya para, se transfirió a 8 placas petri de cada muestra, cada placa contenía 18mL de ADCS.
- b. **Fosfato monobásico de potasio (Buffer):** Se preparó 0.25mL de fosfato monobásico de potasio disolviéndolo en 200mL de agua. Se transfirió a 2 tubos de ensayo, cada tubo de ensayo contenía 9mL del buffer.

Ensayo de *Allium cepa* l.

- a. **Sulfato de cobre:** Se pesó 0.798g de sulfato de cobre, se transfirió a un Erlenmeyer dicho polvo se disolvió con 250mL de agua.

Marcha Analítica

- a. **Ácido clorhídrico 2N (HCl):** Se preparó 17mL de HCl 2N en 100mL de agua. En un balón de 100mL
- b. **Ácido clorhídrico 6N (HCl):** se preparó 50mL de HCl 6N en 100mL de agua. En un balón de 100mL.

Gráfico #1

❖ Muestra 1

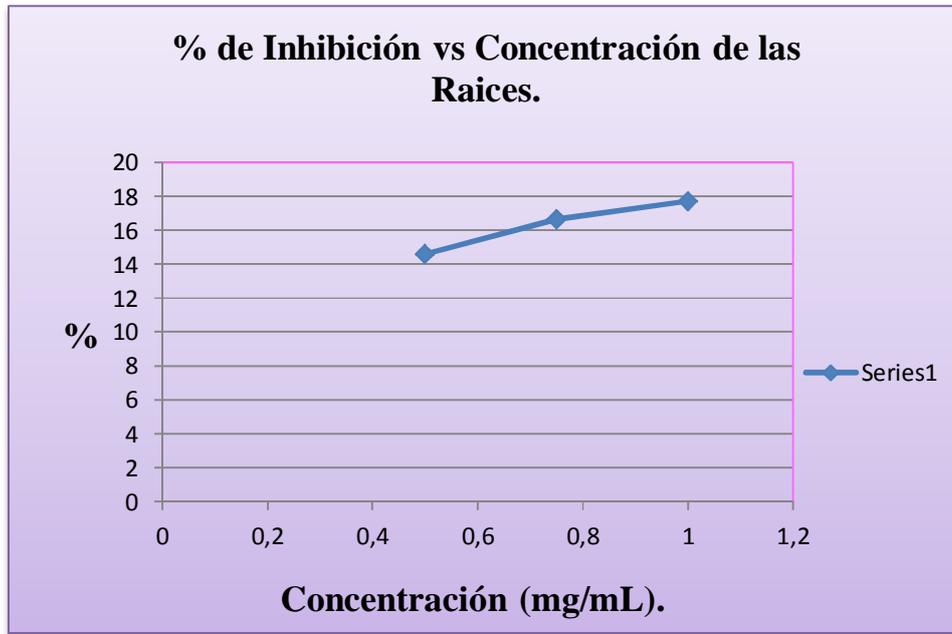


Gráfico # 2

→ Muestra 2.

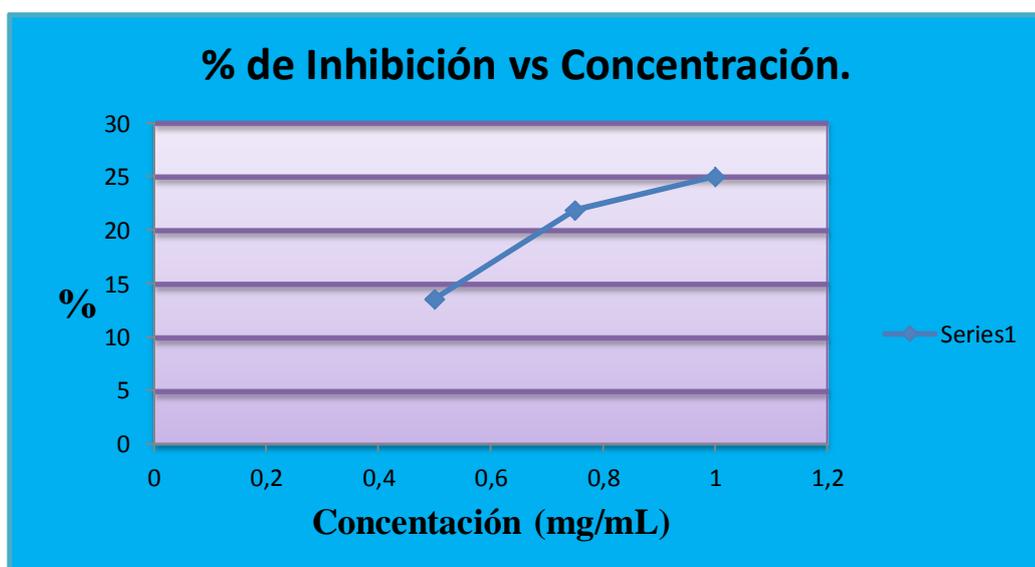
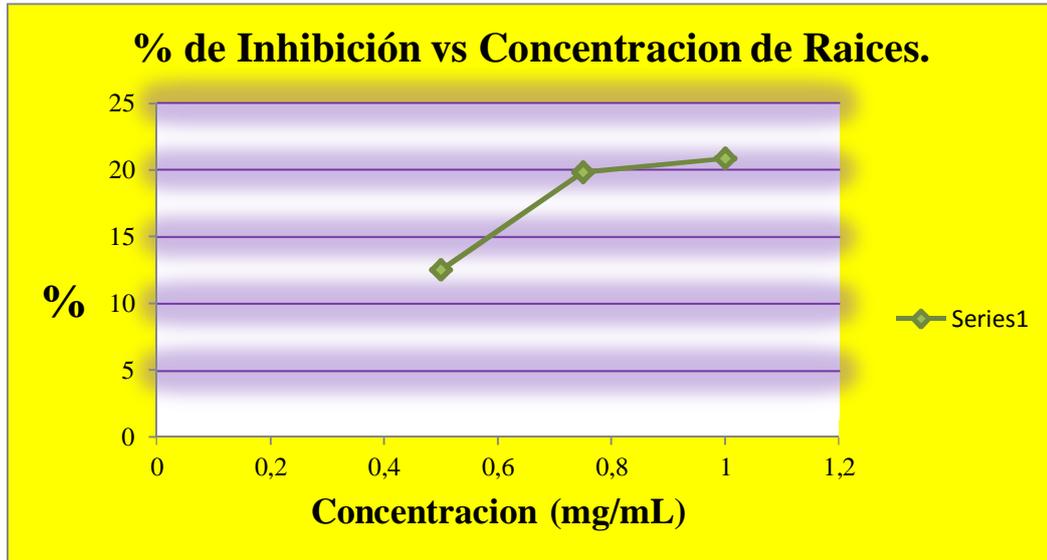


Gráfico # 3

→ Muestra 3



Recolección de las muestras de bolsas de Agua.



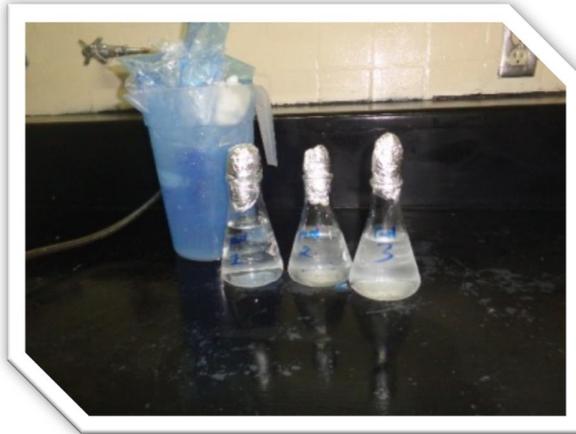
Muestras.

Preparación del Caldo Lactosado y Buffer



Imágenes de los Ensayos realizados

Ensayo microbiológico para detectar Coliformes Totales y Fecales por el método NMP.



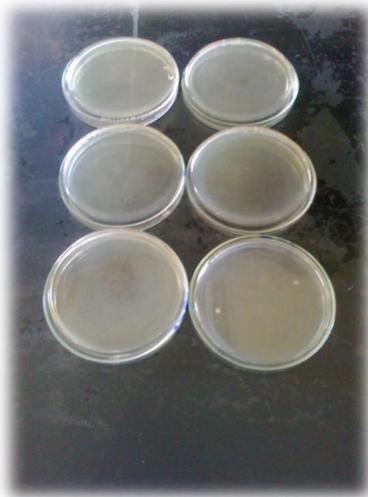
Nuestros Pool



Incubaciones a una temperatura 36-37 °C por 48 Horas



Prueba Microbiológica de recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas.



Lectura del BAM

Recolección de cebollines



Ensayo de *Allium cepa L.*



Imágenes del ensayo de *Allium cepa* L.



Riego de los cebollines



Crecimiento de algunas raíces.

Ensayo de Marcha Analítica.

