

MODELACIÓN DEL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS DE AGUA

Roger Iván MÉNDEZ NOVELO, Liliana SAN PEDRO CEDILLO,
Elba René CASTILLO BORGES y Elizabeth VÁZQUEZ BORGES

Facultad de Ingeniería, Ingeniería Ambiental, Universidad Autónoma de Yucatán, Av. Industrias no Contaminantes por Anillo Periférico Norte s/n. Tel. (999) 9300577 ext. 1069; Fax. (999) 9300559; e-mail mnovelo@uady.mx

(Recibido octubre 2009, aceptado junio 2010)

Palabras clave: preservación de muestras, coliformes fecales, coliformes totales, enterococos, microorganismos patógenos, bacterias

RESUMEN

Según los métodos analíticos convencionales, se debe mantener la temperatura por debajo de 10 °C para la preservación de muestras de agua para análisis microbiológicos por un periodo máximo de 6 horas para aguas no potables y 30 horas para aguas de consumo. Aunque explícitamente no se hace referencia de la carga orgánica, la diferencia del tiempo de preservación puede estar relacionada. Es decir, muestras con cargas orgánicas menores pueden preservarse por más tiempo que aquellas con cargas orgánicas mayores. Se analizaron muestras de agua con diferentes cargas orgánicas; el análisis de los datos permitió desarrollar modelos para determinar las UFC/100 mL de organismos indicadores (coliformes totales, coliformes fecales y enterococos) en muestras de agua, en función de la DBO₅. Las determinaciones se hicieron entre 6 y 48 horas después de la toma de muestras. El tiempo de conservación de muestras de agua con alta concentración de DBO₅ no es un factor determinante para la estimación de UFC/100 mL de organismos indicadores (no existe diferencia significativa de coliformes totales, coliformes fecales ni de enterococos entre 0 y 48 horas). Para aguas con bajos valores de DBO₅, existe diferencia significativa entre las UFC/100 mL de coliformes totales determinadas a 0 y 6 horas, lo que contradice lo establecido en diversas normas analíticas. Con relación a coliformes fecales, estas muestras pueden preservarse hasta 6 horas, pero a las 18 horas se presenta una diferencia significativa de los valores de UFC/100 mL. Para los enterococos, no existe diferencia significativa de 0 a 48 horas de preservación.

Key words: sample preservation, faecal coliforms, total coliforms, enterococcus, pathogen microorganisms, bacteria

ABSTRACT

According to standard analytical methodologies, in order preserve water samples for microbial determination, they must be maintained under 10 °C for a maximum period of 6 hours for non-drinking water and 30 hours for drinking water. Although there is not an explicit reference to the water organic content, the difference between recommended preservation times could be related with it. Therefore, water samples with low organic content can be preserved for longer periods than those with a higher content.

Several samples of water with different organic content (domestic wastewaters, from slaughterhouses and poultry farms, and from shallow wells) were analyzed. Models were developed in order to determine indicator organisms in CFU/100 mL (total and faecal coliforms, and enterococcus) as a function of BOD₅. The assessment was carried out 6 to 48 hours after sampling. It was found that high BOD₅ concentration in water is not a decisive factor when indicator organisms in CFU/100 mL are to be estimated (there is not a significant difference between total or faecal coliforms, neither between enterococcus between 0 and 48 hours). Nevertheless, there is a significant difference between total coliforms in CFU/100 mL when determined at 0 and 6 hours. This contradicts the established in several analytical methods. Samples for faecal coliforms determination can be preserved up to 6 hours, but at 18 hours there is a significant difference for results obtained in CFU/100 mL. For enterococcus, there is no significant difference in preservation between 0 and 48 hours.

INTRODUCCIÓN

La calidad microbiológica y fisicoquímica del agua es de vital importancia para la salud humana, ya que puede provocar enfermedades y epidemias. La cuidadosa toma de muestras y su conservación son cruciales para obtener resultados fidedignos, lo cual se complica cuando la zona a muestrear está alejada del laboratorio, pues será indispensable llevar el equipo necesario y realizar las siembras en directo. Aún cuando no hay un método que permita preservar la integridad de las muestras, existen procedimientos para su conservación (APHA 2005). Con estas técnicas se pretende retardar los cambios producidos por agentes químicos, físicos o biológicos, que inevitablemente ocurren una vez que se ha tomado la muestra.

En el estudio microbiológico de aguas no potables (fuentes de agua, corrientes contaminadas, agua para uso recreacional o residuales), las muestras deben mantenerse por debajo de 10 °C durante el transporte, sin exceder 6 horas entre la toma de la muestra y el análisis. En agua de consumo, la muestra se mantendrá por debajo de 10 °C durante el transporte y hasta la realización del análisis, sin exceder 30 horas (APHA 2005).

La DBO₅ puede estar relacionada con la manera de preservar una muestra para análisis biológico: si la materia orgánica disponible es alta, la curva de crecimiento de células microbianas se encontrará en etapa exponencial al tomar la muestra y mantenerla a una temperatura adecuada; esto se debe a que la velocidad de crecimiento estará influenciada por las condiciones ambientales, así como por las características genéticas de los microorganismos. Por lo tanto, dependiendo del tiempo transcurrido entre la toma de muestras con elevadas concentraciones de DBO₅ y su análisis, es probable que el número de organismos indicadores obtenidos sea más alto al momento de

la determinación. Inversamente, cuando la DBO₅ es baja y se mantiene la temperatura adecuada, la determinación del número de microorganismos puede ser inferior: al consumir el poco sustrato disponible, las células continúan vivas y metabólicamente activas, pero pueden morir, por lo que el análisis de la muestra con microorganismos en decaimiento no arrojaría el resultado real.

Cuando se conserva una muestra bacteriológica, se espera que el método usado conserve el número de células microbianas sin dañar su metabolismo. Por ello se mantiene una temperatura en la cual se retrasan sus funciones metabólicas o incluso se detienen, sin causarles la muerte.

El crecimiento se define como un aumento en el número de células microbianas de una población; también puede medirse como un incremento de la masa celular. La velocidad de crecimiento es el cambio en el número de células experimentado por unidad de tiempo. El intervalo para la formación de dos células a partir de una supone una generación, y el tiempo transcurrido para que esto ocurra se denomina de generación. En un cultivo cerrado o en condiciones de lote se pueden distinguir en una curva de crecimiento las siguientes etapas: latencia, exponencial, estacionaria y endógena o muerte (Madigan *et al.* 2004). El tiempo de generación varía en función de las condiciones del medio: se observa que al aumentar la temperatura o el pH, se produce un aumento significativo de este indicador (Beldarraín *et al.* 2009). La persistencia de microorganismos patógenos es afectada por muchos factores, siendo la temperatura el más importante. El decaimiento es usualmente más rápido a altas temperaturas y puede ser incrementado por los efectos de la radiación solar UV que actúa sobre la superficie del agua (WHO 2008).

Las bacterias necesitan alimento para su crecimiento y desarrollo; reducir los nutrientes, por con-

siguiente, lo limita. El problema, sin embargo, radica en que basta una cantidad mínima para alimentar grandes comunidades microbianas. Teóricamente, 1 ppb de sustrato es suficiente para producir 9500 bacterias/L (Muñoz 2005).

La cantidad de microorganismos es frecuentemente usada como un indicador de contaminación en el agua (Otabbong *et al.* 2007), por lo que bacterias y virus juegan un papel significativo en la determinación de la calidad del agua (Nevecherya *et al.* 2005). Actualmente, los procedimientos para el monitoreo de la calidad del agua requieren una evaluación microbiológica mediante el uso de organismos indicadores, como son coliformes totales o fecales (Cook y Bolster 2007). Los métodos microbiológicos estándar usados para detectar bacterias en ambientes acuáticos están basados en las cuentas de unidades formadoras de colonias (UFC), por lo que sólo se permite la detección de bacterias capaces de dividirse (Lleo *et al.* 2005).

Las bacterias indicadoras de contaminación fecal—que incluyen a los coliformes totales y fecales y a los enterococos—han sido usadas como herramientas para el monitoreo de la calidad microbiológica del agua y para la predicción de la presencia de bacterias, virus y protozoos patógenos. Estos microorganismos son de origen animal y su presencia en el agua puede indicar contaminación fecal y una posible asociación con patógenos entéricos.

En la literatura se señala que los coliformes son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, bastones Gram negativos, no formadores de esporas, que fermentan la lactosa a 37 °C (coliformes totales) y producen gas. El grupo total de coliformes incluye los siguientes géneros de la familia de las Enterobacteriaceae: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Yersinia*. El género *Escherichia* es el más representativo de la contaminación fecal. Los coliformes fecales incluyen todos los coliformes de dicho origen y que pueden fermentar la lactosa o producir colonias a 45 °C. Los enterococos son cocos Gram positivos, catalasa negativa, inmóviles, anaerobios facultativos y no forman endosporas ni cápsulas. Entre las características fisiológicas que distinguen al género *Enterococcus* se encuentra la habilidad para crecer en presencia de 6.5 % de NaCl, a 10 y 45 °C y pH 9.6. Son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de 40 % de bilis y poseen la enzima pyrrolidonyl arylamidasa. Entre las especies de mayor importancia clínica destacan *E. faecalis* y *E. faecium* de 5 a 10 % de las cepas detectadas (Suárez 2002).

De acuerdo con Savichtcheva y Okabe (2006),

existen numerosas limitaciones asociadas con la aplicación de bacterias coliformes totales, fecales y enterococos como indicadores de contaminación fecal, como es su escasa supervivencia en cuerpos de agua y fuentes no fecales, su habilidad para multiplicarse después de su liberación en una columna de agua, la debilidad a los procesos de desinfección, la falta de asociación para identificar las fuentes de contaminación fecal, bajos niveles de correlación con la presencia de patógenos y baja sensibilidad de los métodos de detección. Por esta razón se han utilizado como indicadores alternativos los anaerobios fecales (*Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*), virus (colifagos, fago *B. fragilis*) y componentes orgánicos fecales (coprostanol).

Relación entre la DBO₅ y el crecimiento bacteriano. Las características físicas y químicas del ambiente influyen en el crecimiento microbiano (Gaudy y Gaudy 1981). El aumento de materia orgánica promueve el desarrollo de bacterias que consumen cantidades importantes de oxígeno (Prosperi 2004). Las muestras biológicas con densidad de coliformes relativamente baja, almacenadas por 24 horas a temperatura razonable, tendrán resultados estadísticamente correlacionados con el grado de contaminación existente en el punto de muestreo en el momento de la recolección (McCarthy 1957). Sin embargo, parece haber evidencia de que el número de coliformes decrece rápidamente durante el almacenamiento de muestras, aún cuando se conserven a temperaturas bajas. En estos reportes se indica que el decremento del número de coliformes se debe al tiempo y la temperatura; sin embargo, la presencia de ciertas sustancias químicas en el agua puede ser también un factor determinante. Las aguas que reciben desechos industriales pueden contener concentraciones de metales suficientes para reducir el número de bacterias (Shipe y Fields 1956).

Método de conservación. De acuerdo con *Standard methods* (APHA 2005), el estudio microbiológico de muestras de agua no puras (fuentes, corrientes contaminadas, agua para uso recreacional o residuales) debe iniciarse después de realizada la toma de muestra para evitar cambios imprevisibles; en caso de ser necesaria su transportación, deberán mantenerse por debajo de 10 °C, durante no más de seis horas. Una vez en el laboratorio se procederá a su refrigeración y procesamiento en las dos horas siguientes. En aguas puras, la muestra se mantiene por debajo de 10 °C durante el transporte y hasta la realización del análisis, no excediendo 30 horas.

La mayoría de los factores físicos, químicos y ambientales afectan la supervivencia de los organismos coliformes en muestras de agua conservadas y hacen improbable que se establezcan los efectos que el almacenamiento tiene sobre ellas (McCarthy 1957).

De acuerdo con MacLeod *et al.* (1967), el congelamiento puede ser una alternativa para preservar una muestra biológica de agua, aun cuando se corre el riesgo de ocasionar un daño en la estructura celular de algunos microorganismos. Así también, temperaturas de 5 (Unda y Salinas 2000) o 4 °C (Dahling y Wright 1984) pueden ser usadas en la preservación de muestras hasta por 24 horas. En ocasiones, la adición del agente quelante ácido tetra-acético etilendiamida, EDTA (Shipe y Fields 1956), o peptona (Straka y Stokes 1957) tiene la misma finalidad de conservación.

Considerando todo lo anterior, el objetivo del estudio fue desarrollar un modelo que permitiera determinar el tiempo de conservación de muestras biológicas de diferentes tipos de agua, a fin de estimar las unidades formadoras de colonias (UFC) de coliformes totales (CT), coliformes fecales (CF) y enterococos (EN) existentes. Asimismo, establecer si existe relación entre la concentración de DBO₅ presente en el agua y el tiempo de conservación de la muestra, lo que podría explicar las diferencias en el conteo de células bacterianas a través del tiempo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de tipos de agua. Se seleccionaron muestras de distintos tipos de agua con diferentes concentraciones de DBO₅ y de UFC/100 mL de CT, CF y EN. La toma de muestras, el método de conservación y los análisis para la determinación de DBO₅ y UFC/100 mL de los organismos indicadores mediante el filtro de membrana, se realizaron de acuerdo a *Standard methods for the examination of water and wastewater* (APHA 2005). Los tipos de agua analizados fueron de pozo, residual de rastro, residual doméstica y residual porcina. El agua de pozo corresponde a una oquedad de aproximadamente 10 m de profundidad, ubicada en la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Yucatán. El agua de rastro y la cerdaza se obtuvieron en la Facultad de Veterinaria perteneciente a la misma universidad. El agua residual doméstica procede de la planta de tratamiento de aguas Pensiones II, ubicada en la colonia Residencial del Norte (Jardín Pensiones), en la ciudad de Mérida, Yucatán.

Relación entre DBO₅ y el tiempo de conservación.

Se determinó por triplicado DBO₅ de las aguas residuales porcinas y se realizaron las siguientes diluciones: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Para cada dilución se determinaron los valores de UFC/100 mL de CT, CF y EN a diferentes tiempos de conservación: 0, 6, 18, 24 y 48 horas.

Los resultados se analizaron mediante un modelo multifactorial, donde las variables de respuesta fueron UFC/100 mL de CT, CF y EN al tiempo t (CT_t, CF_t, EN_t); las fuentes de variación fueron la concentración inicial de DBO₅ y el tiempo de conservación de la muestra.

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (1)$$

$$Y_{ij} = CT_t, CF_t \text{ o } EN_t$$

μ = Media global

λ_i = Efecto que tiene el tiempo de conservación (h) sobre la variable de respuesta

β_j = Efecto que DBO₅ inicial tiene sobre CT_t, CF_t o EN_t.

ε_{ijk} = Error aleatorio

Relación entre el tiempo de conservación y el tipo de agua.

Se determinaron por triplicado la DBO₅ y las UFC/100ml de CT, CF y EN de cada muestra de agua (de pozo, residual doméstica, de rastro y cerdaza) en los tiempos de conservación: 0, 6, 18, 24 y 48 horas.

Los resultados se analizaron mediante un modelo de 2 vías de efectos fijos, donde las variables respuesta fueron CT_t, CF_t ó EN_t y las fuentes de variación fueron el tipo de agua y el tiempo de conservación de la muestra.

$$Y_{ij} = \mu + \lambda_i + \beta_j + \varepsilon_{ij} \quad (2)$$

$$Y_{ij} = CT_t, CF_t \text{ o } EN_t$$

μ = Media global

λ_i = Efecto que tiene el tiempo de conservación (h) sobre la variable de respuesta

β_j = Efecto que tiene el tipo de agua sobre CT_t, CF_t o EN_t

ε_{ijk} = Error aleatorio

Modelación del tiempo de conservación de muestras biológicas.

Dado que la concentración de DBO₅ resultó significativa, se ensayaron modelos de regresión múltiple para estimar la concentración de CT, CF y EN de la muestra original (al tiempo 0) en función de DBO₅ de la concentración de CT, CF y EN al tiempo t.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la determinación de DBO₅ de cada tipo de agua se muestran en el **cuadro I**. En el **cuadro II** se muestran los valores promedio obtenidos de los análisis microbiológicos en cada tipo de agua, de acuerdo con el tiempo de conservación de las muestras.

CUADRO I. CONCENTRACIONES DE DBO₅ PROMEDIO DE LAS MUESTRAS DE AGUA ANALIZADAS

Tipo de agua	DBO ₅ promedio (mg/L)	Desv. estándar
Pozo	1	0.25
Residual de rastro	647	513.19
Residual doméstica	231	83.36
Cerdaza	7819	3255.18

n = 10

De los análisis de varianza según la ecuación 1, se concluyó que a DBO₅ sí es un factor que influye en la determinación de microorganismos indicadores. Asimismo, se realizaron ensayos de regresión múltiple para determinar los modelos que mejor se ajusten a los resultados experimentales, los cuales se muestran en el **cuadro III**.

En el **cuadro IV** se muestra el resultado del análisis de varianza según la ecuación 2, donde se observa que el tipo de agua es un factor significativo para estimar los CT_t, CF_t o EN_t.

El comportamiento de los intervalos de la prueba de diferencia significativa mínima (DSM) de la variable respuesta CT_t a través del tiempo se aprecia en la **figura 1**; el gráfico del agua de pozo presenta un tiempo significativamente diferente a los demás, el cual corresponde a la hora 0 de análisis microbiológico. A partir de la siguiente observación del mismo gráfico (6 horas de conservación) ya no se reportan UFC de CT. Esto indica que para que la determinación en este tipo de agua sea válida, es necesario realizarla al momento de tomar la muestra, lo cual no concuerda con lo establecido en los procedimientos analíticos estándar (APHA 2005). Estas aguas se caracterizan por bajos niveles de materia orgánica (DBO₅ promedio de 1 mg/L), por lo que no se esperaba que hubiera un crecimiento microbiano en ellas.

En el agua de rastro, los intervalos de confianza de la variable CT_t correspondientes a las horas 18, 24 y 48 son diferentes al de la hora 0 debido a que existe un ligero incremento en el número de CT. No obstante, se pueden obtener estimaciones

CUADRO II. UFC/100 mL, PROMEDIO DE CT, CF Y EN, ENCONTRADAS EN AGUA DE POZO, RASTRO, RESIDUAL DOMÉSTICA Y CERDAZA, SEGÚN EL TIEMPO DE CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Tipo de agua	Tiempo de conservación (h)	UFC/100 mL		
		CT	CF	EN
Pozo	0	4.6 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁴
	6	1 x 10 ³	1.0 x 10 ⁴	2.3 x 10 ⁴
	18	1 x 10 ³	1.0 x 10 ³	1.3 x 10 ³
	24	1 x 10 ³	1.0 x 10 ³	1.6 x 10 ⁴
	48	1 x 10 ³	1.0 x 10 ³	1.3 x 10 ⁴
Rastro	0	2.6 x 10 ²	7.7 x 10 ⁴	3.0 x 10 ⁶
	6	5.7 x 10 ⁴	2.5 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁴
	18	1.6 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁴
	24	3.8 x 10 ⁷	2.7 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁴
	48	4.3 x 10 ⁷	3.8 x 10 ⁷	1.4 x 10 ⁴
Residual doméstica	0	9.2 x 10 ⁷	1.1 x 10 ⁵	1.9 x 10 ⁶
	6	8.5 x 10 ⁷	8.0 x 10 ⁴	1.8 x 10 ⁶
	18	1.8 x 10 ²	2.1 x 10 ²	2.1 x 10 ⁶
	24	6.7 x 10 ⁴	7.2 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁶
	48	7.8 x 10 ⁷	3.4 x 10 ²	1.0 x 10 ⁶
Cerdaza	0	1.0 x 10 ⁵	2.2 x 10 ²	1.1 x 10 ⁷
	6	1.0 x 10 ⁶	7.5 x 10 ²	2.6 x 10 ⁷
	18	7.5 x 10 ²	3.4 x 10 ⁵	4.3 x 10 ⁷
	24	4.6 x 10 ⁵	4.1 x 10 ⁵	1.5 x 10 ⁷
	48	2.9 x 10 ⁵	7.0 x 10 ⁸	1.4 x 10 ⁷

CUADRO III. MODELOS OBTENIDOS DE LA REGRESIÓN MÚLTIPLE PARA CT_T , CF_T Y EN_T

Modelo	R ²	p-valor	Indicador
$CT_i = 216.24 + 28.56 \log(DBO) - 0.00093 CT_i$	82.82	0.0000	Coliformes totales
$CF_i = -5.43 + 1333.38 DBO - 0.00021 CF_i$	99.33	0.0000	Coliformes fecales
$EN_i = -107.95 + 1334.04 DBO - 0.00289 EN_i$	99.86	0.0000	Enterococos

CUADRO IV. ANÁLISIS DE LA VARIANZA PARA LA VARIABLE RESPUESTA $\log(CT_T, CF_T \text{ Y } EN_T)$, SEGÚN EL TIPO DE AGUA Y EL TIEMPO DE CONSERVACIÓN

Modelo	Fuente de variación	p-valor	Significado
$\log CT_i = \mu + \text{Tiempo} + \text{Tipo de agua} + \varepsilon$	Tiempo	0.4524	La variable respuesta $\log(CT_i)$ no se puede predecir en función del tiempo
	Tipo de agua	0.0008	La variable respuesta $\log(CT_i)$ se puede predecir en función del tipo de agua
$\log CF_i = \mu + \text{Tiempo} + \text{Tipo de agua} + \varepsilon$	Tiempo	0.8414	La variable respuesta $\log(CF_i)$ no se puede predecir en función del tiempo
	Tipo de agua	0.0000	La variable respuesta $\log(CF_i)$ se puede predecir en función del tiempo y del tipo de agua
$\log EN_i = \mu + \text{Tiempo} + \text{Tipo de agua} + \varepsilon$	Tiempo	0.5163	La variable respuesta $\log(EN_i)$ no se puede predecir en función del tiempo
	Tipo de agua	0.0001	La variable respuesta $\log(EN_i)$ se puede predecir en función del tiempo y del tipo de agua

del número de CT utilizando el modelo estimado correspondiente.

Para el agua residual doméstica, a las 18 horas se presenta un decremento en las UFC de CT, me-

dia diferente respecto a las de las horas 0 y 6; sin embargo, a las 24 y 48 horas las cuentas son estadísticamente iguales que las reportadas en los dos primeros tiempos. En el agua residual porcina las

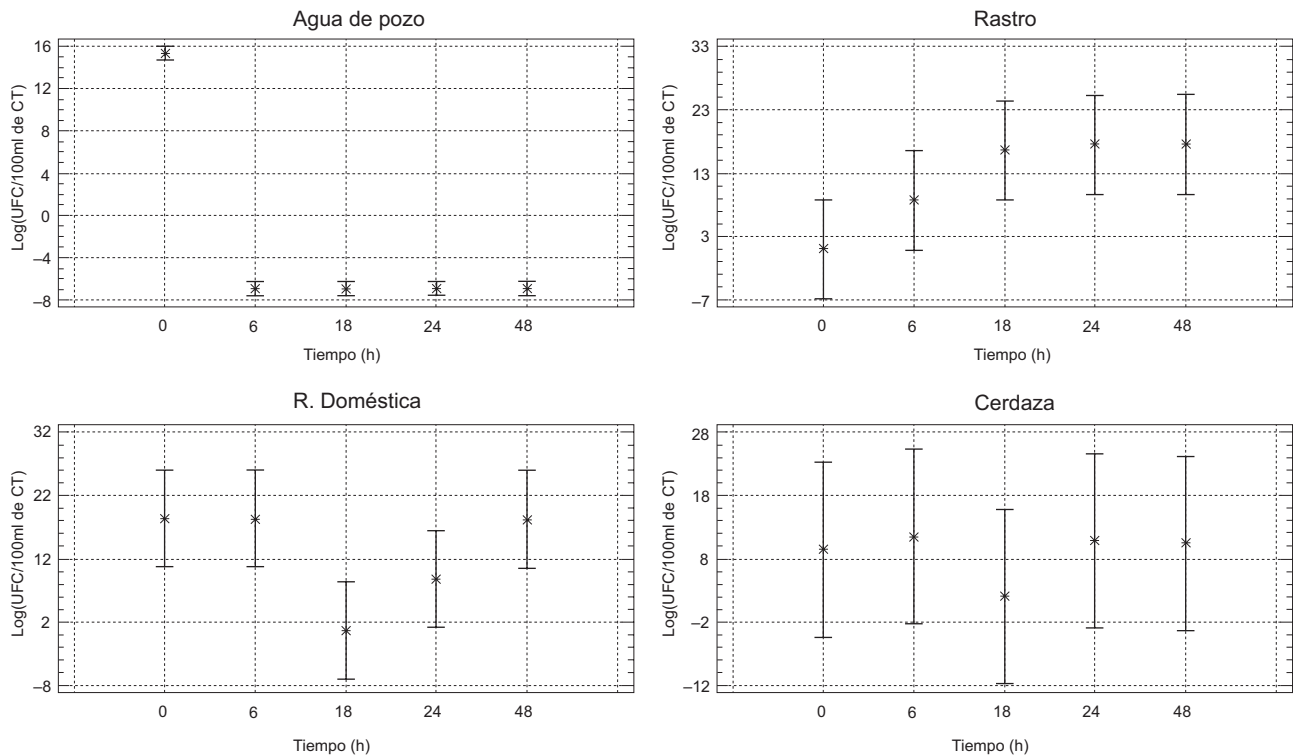


Fig. 1. Gráfico de intervalos de confianza de DSM para $\log(CT_i)$ en cada tipo de agua, según el tiempo de conservación

medias de $\text{Log}(CT_t)$ son estadísticamente iguales en todos los tiempos.

En la **figura 2** se aprecia el comportamiento de CF_t de cada tipo de agua a través del tiempo, donde el gráfico para el agua de pozo presenta cuentas iguales en las horas 0 y 6; para las 18 horas los CF decaen totalmente, lo que significa que llegan a su etapa endógena. Para las aguas de rastro, residual doméstica y cerdaza, las medias son semejantes a través del tiempo respecto a las UFC de CF a la hora 0.

En la **figura 3** se presentan los cuatro gráficos de DSM correspondientes a cada tipo de agua, donde se analizan los intervalos de confianza de EN_t en cada tiempo de conservación. En los gráficos del agua de pozo, rastro y residual doméstica, los intervalos correspondientes a los tiempos 6, 18, 24 y 48 horas son iguales a los de la hora 0. En el agua residual porcina se observa un incremento en las UFC/100 mL de EN a las 18 horas de conservación, lo que diferencia este intervalo respecto a los obtenidos a las horas 0, 6, 24 y 48.

Finalmente en el **cuadro V** se observa que la conservación de la muestra para el análisis de CT de agua de pozo no es viable: de no ser analizadas las muestras al momento de la toma, no se detectará dicha comunidad microbiana. Para las determina-

ciones de CF pueden conservarse hasta por 6 horas. Los enterococos, por su naturaleza, sobreviven por más tiempo en el agua, así que aun con muestras conservadas durante 48 horas, las cuentas de EN permanecerán constantes. En el caso del agua residual doméstica, las muestras pueden conservarse hasta por 48 horas para el análisis microbiológico; sin embargo, para la determinación de CT se debe usar el modelo propuesto en el **cuadro III**, pues para este tipo de microorganismos las cuentas pueden variar respecto a UFC iniciales. En el agua residual de rastro, las cuentas de CT incrementan a partir de las 6 horas de conservación, por lo que para muestras preservadas hasta por 48 horas se puede hacer uso del modelo propuesto en el **cuadro III**; las UFC de CF y EN permanecen iguales aún cuando la muestra se conserve hasta por 48 horas. En el caso del agua residual porcina, las muestras se pueden conservar hasta por 48 horas, pero es recomendable utilizar los modelos propuestos en el **cuadro III** para la determinación de EN, ya que dicha cuenta varía respecto a las UFC iniciales.

CONCLUSIONES

Los modelos para estimar UFC en función del

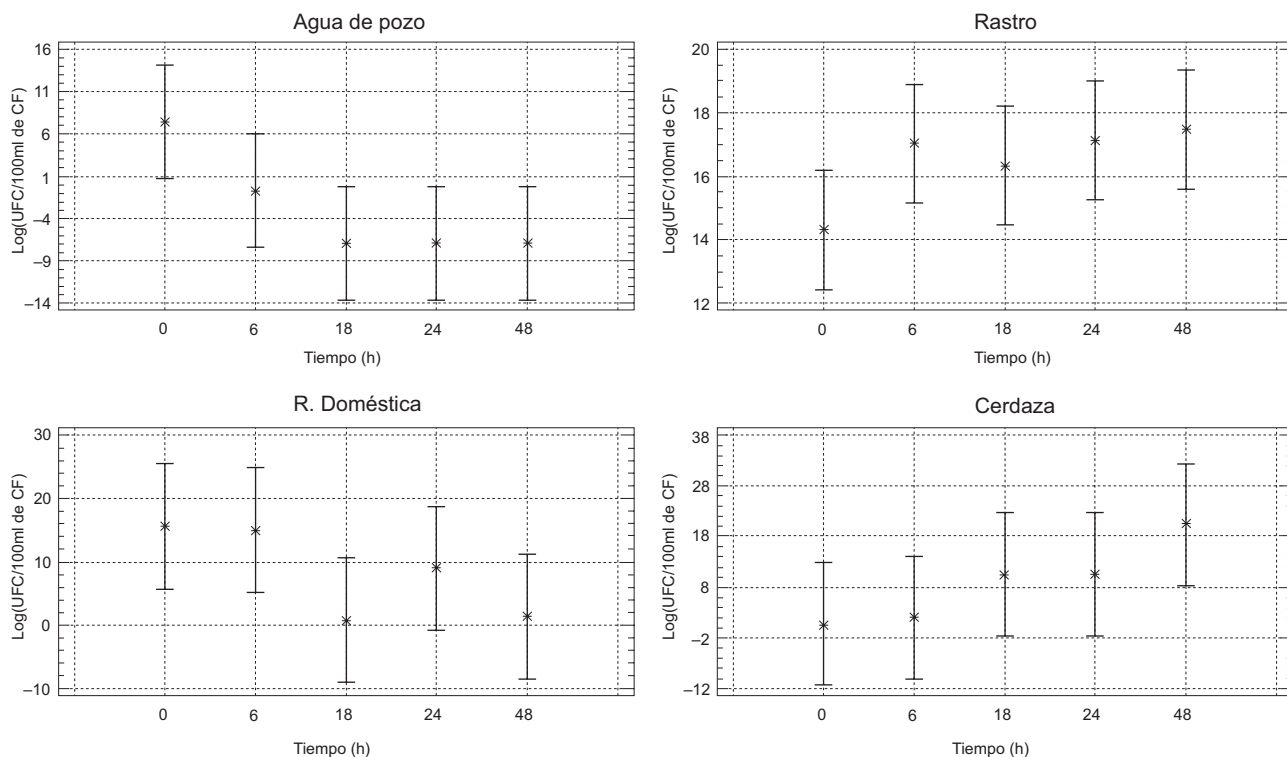


Fig. 2. Gráfico de intervalos de confianza de DSM para $\text{log}(CF_t)$ en cada tipo de agua, según el tiempo de conservación

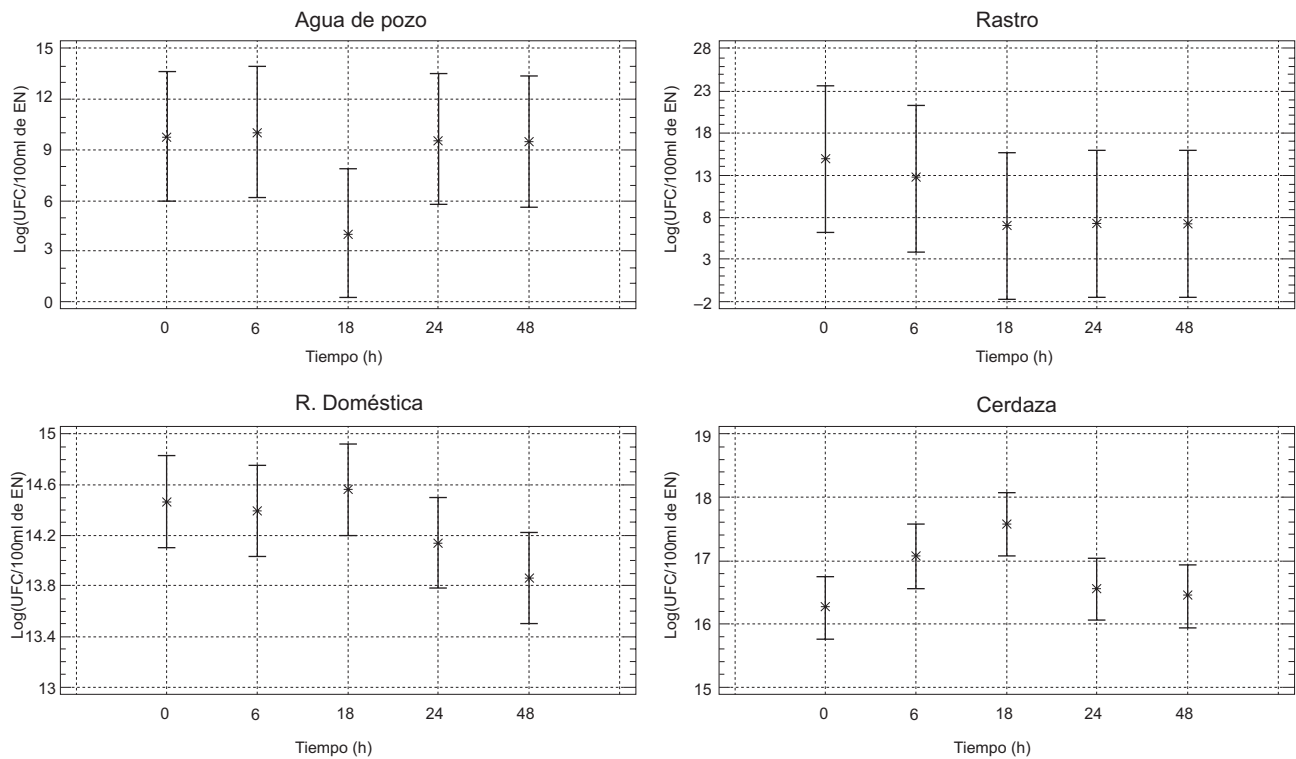


Fig. 3. Gráfico de intervalos de confianza de DSM para log(EN_i) en cada tipo de agua, según el tiempo de conservación

CUADRO V. TIEMPO DE CONSERVACIÓN (h) DE MUESTRAS BIOLÓGICAS SEGÚN EL TIPO DE MICROORGANISMO INDICADOR DE LAS AGUAS ANALIZADAS

Organismo indicador	Tipo de agua			
	Pozo (DBO ₅ = 1 mg/L)	R. Doméstica (DBO ₅ = 231 mg/L)	Rastro (DBO ₅ = 647 mg/L)	Cerdaza (DBO ₅ = 7819 mg/L)
CT	0	48*	48*	48
CF	6	48	48	48
EN	48	48	48	48*

*El análisis se puede realizar con muestras conservadas hasta por 48 horas usando el modelo correspondiente propuesto en el cuadro III

tiempo de conservación de muestras de aguas para pruebas biológicas son:

Coliformes totales (R² = 82.82 %):

$$CT_i = 216.24 + 28.56 \log(\text{DBO}) - 0.00093 CT_t$$

Coliformes fecales (R² = 99.33 %):

$$CF_i = -5.43 + 1333.38 \text{ DBO} - 0.00021 CF_t$$

Enterococos (R² = 99.86 %):

$$EN_i = -107.95 + 1334.04 \text{ DBO} - 0.00289 EN_t$$

Las muestras de agua cuya carga orgánica sea > 200 mg DBO₅/L pueden ser preservadas hasta por 48 horas.

Para muestras con valores bajos de DBO₅ (< 200 mg DBO₅/L), la preservación depende del tipo de microorganismos: para CT, el análisis debe realizarse en el momento de la toma de la muestra; para CF, las muestras pueden conservarse hasta por 6 horas y para EN, las muestras pueden preservarse hasta por 48 horas.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Mixto CONACyT-Gobierno del Estado de Yucatán, por financiar el proyecto de investigación (YUC-2005-CO4-21317) donde se generaron los resultados presentados.

REFERENCIAS

- APHA (2005). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 18ª ed. pp. 19-19, 19-20.
- Beldarraín T., Núñez M. V., Ramos M., Bruselas A., Santos R. y Vergara N. (2009). Modelo predictivo del efecto del pH y la temperatura sobre el crecimiento de *E. coli* y *Alcaligenes sp.* Ciencia y tecnología de alimentos 17, 31-37.
- Cook K.L. y Bolster C.H. (2007). Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperatures. J. Appl. Microbiol. 103, 573-583.
- Dahling D.R. y Wright B.A. (1984). Processing and transport of environmental virus samples. Appl. Environ. Microbiol. 47, 1272-1276.
- Gaudy A.F. y Gaudy E.T. (1981). Microbiology for environmental scientists and engineers. McGraw-Hill, Auckland. 736 pp.
- Leo M.M., Bonato B., Tafi C.M., Signoretto C., Pruzzo C. y Canepari P. (2005). Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. Lett. Appl. Microbiol. 40, 289-294.
- MacLeod R.A., Kuo S.C. y Gelinas R. (1967). Metabolic injury to bacteria. II. Metabolic injury induced by distilled water or Cu^{++} in the plating diluent. J. Bacteriol. 93, 961-969.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (2004). *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson Prentice Hall. pp. 142-145, 927, 928.
- McCarthy J.A. (1957). Storage of water samples for bacteriologic examinations. Am. J. Public Health 47, 971-974.
- Muñoz L.F. (2005). Velocidad de desprendimiento de las biopelículas en tuberías de distribución de agua potable. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones en Acueductos y Alcantarillados, Universidad de los Andes, Bogotá.
- Nevecherya K.I., Shestakov M.V., Mazaev T.V. y Shelepina G.T. (2005). Survival rate of pathogenic bacteria and viruses in groundwater. Water Resour. 32, 209-214.
- Ottobong E., Arkhipchenko I., Orlova O., Barbolina I. y Shubaeva M. (2007). Impact of piggery slurry lagoon on the environment: a study of groundwater and river Igolinka at the Vostochnii pig farm, St. Petersburg, Russia. Acta Agr. Scand. B57, 74-81.
- Prosperi C.H. (2004). Los microorganismos y la calidad de agua del Río Suquía. Revista Científica de la Universidad Blas Pascal 9, 18. 35-41.
- Savichtcheva O. y Okabe S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. Water Res. 40, 2463-2476.
- Shipe E.L. y Fields A. (1956). Chelation as a method for maintaining the coliform index in water samples. Public Health Rep. 71, 974-978.
- Straka R.P. y Stokes J L. (1957). Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. Appl. Microbiol. 5, 21-25.
- Suárez M. (2002). Tendencia actual de estreptococo como indicador de contaminación fecal. Rev. Cubana Hig. Epidemiol. 40, 38-43.
- Unda F. y Salinas S. (2000). *Ingeniería sanitaria aplicada, saneamiento y salud pública*. Limusa, México, 968 pp.
- WHO (2008). *Guidelines for drinking-water quality*. 3ª ed. World Health Organization, Ginebra. 668 pp.