

Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes totales en agua

Maribel del Carmen Polanco Endara

Honduras
Diciembre, 2006

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA

Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes totales en agua

Proyecto especial presentado como requisito parcial
para optar al título de Ingeniera en Agroindustria
en el Grado Académico de Licenciatura.

Presentado por:

Maribel del Carmen Polanco Endara

Honduras
Diciembre, 2006

La autora concede a Zamorano permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos.
Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.

Maribel del Carmen Polanco Endara

Honduras
Diciembre, 2006

**Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la
enumeración de coliformes totales en agua**

Presentado por:

Maribel del Carmen Polanco Endara

Aprobado:

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor Principal

Raúl Espinal, Ph.D.
Director
Carrera de Agroindustria

Luis Fernando Osorio, Ph.D.
Asesor

George Pilz, Ph.D.
Decano Académico

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

DEDICATORIA

Al Señor de la Justicia.

A mis abuelos, María Edelina, Telmo Hernán y Bertha Virginia.

A mis amados padres, César Hernán y María del Carmen.

A mi hermana y mejor amiga María Gabriela.

A mis tíos, Angela de las Mercedes, Martha y Wilson.

Al amor de mi vida Remigio Esteban.

A mi hermano, César Hernán.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Señor de la Justicia y a mi Ángel de la Guarda por haberme cuidado todos estos años.

A mis abuelos por ser un modelo de tenacidad, fortaleza y honestidad.

A mis padres por todo ser un ejemplo de amor, por su incondicional apoyo, confianza y amistad. Gracias por creer en mí.

A mi hermana, María Gabriela por ser el motor de mi vida y ejemplo de carácter.

A Remigio Esteban por abrirme su corazón, entregarme su amor, llenar mi vida de alegría, comprensión y ser una parte esencial en este proyecto.

Al Ingeniero Wilfredo Domínguez por su paciencia, apoyo, confianza y amistad durante la elaboración de este proyecto.

Al los Doctores Raúl Espinal y Luis Fernando Osorio por ponerle alma a su trabajo y darle un verdadero significado a la palabra “maestro”.

Al Ingeniero Carlos Quiroz por su amistad y paciencia.

A Ricardo y Hermes por su incondicional ayuda y sincera amistad.

A mi familia Zamorana, que hicieron de mis días los mejores: Jorge, Katia, Alina, José Eduardo, Andrés, Daniel Francisco, Indira Pamela, Olvín, David, Sofía, Francisco, Ana Lucía, Diana, Rafael, Irina.

A mis amigos por estar siempre conmigo sin importar la distancia: Andrea Berenice, Carlos Andrés, Xavier, Soraya, David.

RESUMEN

Polanco, M. 2006. Desarrollo y evaluación de un medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes totales en agua. Proyecto de Graduación del Programa de Ingeniería en Agroindustria, Escuela Agrícola Panamericana “El Zamorano”, Honduras. 26 p.

La detección y enumeración de coliformes totales es un indicador usado a nivel mundial para determinar la calidad microbiológica del agua destinada para el consumo humano. El Agar Biliado-Rojo Neutro-Cristal Violeta (VRBA, por sus siglas en inglés) es uno de los medios de cultivo comerciales utilizados para el diagnóstico de coliformes en agua y alimentos en general. El objetivo del presente estudio fue evaluar y desarrollar un medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes en agua. Se determinó la sustitución de tres componentes y se comparó su eficiencia contra el VRBA comercial. Para la realización del medio de cultivo alternativo se utilizó la misma formulación del VRBA comercial, a excepción de los componentes que se sustituyeron: sales biliares por clara de huevo, cloruro de sodio comercial por sal común y lactosa por suero lácteo. La formulación y el protocolo de preparación se establecieron por prueba y error, monitoreando pH y temperatura. Se tomó como inóculo una solución de jugos cárnicos en agua potable (1:100). Se sembraron muestras para su posterior incubación a 37 °C por 24 horas. Se usó un diseño de muestras apareadas con una prueba T para comparar los conteos de coliformes presentes en el VRBA comercial y el medio de cultivo alternativo. Finalmente, se determinaron los costos variables de producción para ambos medios sin tomar en cuenta los costos de mano de obra y logística. No se obtuvieron diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$) entre los conteos de los dos medios de cultivo. El costo del medio de cultivo alternativo es 25% menor que el costo del VRBA.

Palabras clave: calidad de agua, comunidades rurales, lisozima, VRBA.

Wilfredo Domínguez, M.Sc.
Asesor Principal

CONTENIDO

	Portadilla	i
	Autoría.....	ii
	Página de firmas	iii
	Dedicatoria	iv
	Agradecimientos.....	v
	Resumen	vi
	Contenido	vii
	Índice de Cuadros.....	ix
	Índice de Anexos.....	x
1.	REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1.	COLIFORMES.....	1
1.2.	MEDIOS DE CULTIVO	1
1.2.1.	Definición.....	1
1.3.	AGAR BILIADO-ROJO NEUTRO CRISTAL VIOLETA.....	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	4
3.1.	UBICACIÓN.....	4
3.2.	MATERIALES Y EQUIPO	4
3.2.1.	Materiales	4
3.2.2.	Equipo	4
3.3.	METODOLOGÍA	5
3.3.1.	Reemplazo de ingredientes.....	5
3.3.2.	Formulación y protocolo de preparación.....	5
3.3.3.	Medición de pH.....	5
3.3.4.	Medición de temperatura.....	5
3.3.5.	Elección del inóculo	5
3.3.6.	Inoculación	6
3.3.7.	Análisis estadístico	6
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1.	FORMULACIÓN.....	7
4.2.	PROTOCOLO DE PREPARACIÓN.....	7
4.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	8
4.4.	ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES.....	9
5.	CONCLUSIONES	10

6.	RECOMENDACIONES	11
7.	BIBLIOGRAFÍA	12
8.	ANEXOS	14

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1.	Formulación del medio de cultivo VRBA.....	2
2.	Formulación del medio de cultivo alternativo.....	7
3.	Conteo de colonias de coliformes después de inocular con agua contaminada e incubar a 37 °C durante 24 horas	8
4.	Costos de componentes para la elaboración del medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes totales	9

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo

1. Efecto de la lisozima en las bacterias Gram positivas..... 15
2. Diseño para muestras apareadas con prueba t..... 15

1. REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. COLIFORMES

La determinación de microorganismos intestinales normales como indicadores de contaminación fecal, en lugar de patógenos, es un principio de aceptación universal en la vigilancia y evaluación de la seguridad microbiana en los sistemas de abastecimiento de agua (Goez 1999). Los coliformes representan un indicador biológico de las descargas de materia orgánica. Estas bacterias son transmitidas por el agua constituyendo un problema mundial que demanda un urgente control mediante la implementación de medidas de protección ambiental a fin de evitar el incremento de las enfermedades relacionadas con la calidad del agua (Vargas 1996).

El estudio de estas bacterias es de gran utilidad porque su densidad generalmente es proporcional a la cantidad de contaminación fecal presente. El grupo coliforme es uno de los miembros de la familia Enterobacteriaceae. Son aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativos, no forman esporas, fermentan lactosa a 35 °C – 37 °C en 24 horas (Montealegre 2002).

1.2. MEDIOS DE CULTIVO

1.2.1. Definición

Según Bryan (1981), todo material en el cual los microorganismos encuentran alimento y en el que pueden reproducirse es un medio de cultivo. El desarrollo o cosecha de microorganismos obtenido en tal medio se designa como un cultivo. Un medio de cultivo debe:

- Presentar la cantidad y proporción necesaria de todos los elementos (principales y trazas) necesarios para el crecimiento de los microorganismos.
- pH y a_w adecuados.
- Ser estéril.
- Ser incubado a temperatura adecuada (Toddar 2005).

1.3. AGAR BILIADO - ROJO NEUTRO - CRISTAL VIOLETA (VRBA)

El VRBA es un medio selectivo y diferencial que contiene lactosa, para la detección y enumeración de organismos coliformes en agua, productos lácteos y productos alimenticios en general (Zimbro 2003).

El VRBA es una mezcla de ocho componentes (Cuadro 1):

- Agar: El agar, es un polisacárido que se obtiene de algas del género *Gelidium*. Las grandes moléculas que lo constituyen determinan sus cualidades sobresalientes, como coloides y espesantes, que lo han hecho hasta ahora insustituible. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él.
- Peptona: Digerido enzimático de proteína animal usado en medios de cultivo por su contenido de nitrógeno orgánico y carbono completamente disponible para el crecimiento de bacterias.
- Extracto de Levaduras: Provee al medio de cultivo los requerimientos de vitaminas del complejo B que las bacterias necesitan para su crecimiento en general.
- Sales Biliares No. 3: Agentes tensoactivos que desorganizan las membranas externas de microorganismos Gram positivos, inhibiendo así su crecimiento.
- Lactosa: Es el carbohidrato fermentable y fuente de energía.
- Cloruro de Sodio: Sirve como regulador del balance osmótico.
- Rojo Neutral: Cambia a rojo-púrpura al cambiar a un medio ácido durante la fermentación de la lactosa (producción de ácido).
- Cristal Violeta: Inhibidores de microorganismos Gram positivos. Adicionalmente, otras bacterias Gram positivas son inhibidas gracias a la temperatura de incubación y al medio anaeróbico de la misma.

Cuadro 1. Formulación del medio de cultivo VRBA

Componentes*	Cantidad (g/L)
Agar	15.000
Lactosa	10.000
Peptona	7.000
Cloruro de Sodio	5.000
Extracto de Levadura	3.000
Sales Biliares	1.500
Rojo Neutral	0.030
Cristal Violeta	0.002

Fuente: Zimbro 2003

* Todos los componentes son disueltos en 1000 ml de agua destilada

A 25°C el pH final es de 7.4 ± 2 .

2. INTRODUCCIÓN

Los niveles de contaminación han aumentado debido al crecimiento de la población mundial y el uso excesivo del agua para diferentes actividades. Esta contaminación está relacionada con los vertidos de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. Estos microorganismos son causantes de enfermedades que generan altos porcentajes de mortalidad en la población. El control de calidad microbiológica del agua de consumo y de vertido, requiere una serie de análisis para determinar la presencia de microorganismos patógenos (RIPDA-CYTED 2003).

Según Allen (1996), el grupo coliforme abarca los géneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*. Cuatro de estos géneros (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Serratia*) se encuentran en grandes cantidades en el ambiente (agua, vegetación y suelos) no están asociados necesariamente con la contaminación fecal y no plantean ni presentan un riesgo evidente a la salud. Cáceres (1990), indica que las bacterias coliformes, no deben estar presentes en sistemas de abastecimiento, almacenamiento y distribución de agua. Si así ocurriese, esto es indicio de que el tratamiento fue inadecuado o que se produjo contaminación posterior en este sentido, la determinación de coliformes se usa como indicador de la eficacia del tratamiento.

Los coliformes fecales, *Escherichia coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras. Aproximadamente el 95% del grupo de los coliformes presentes en heces fecales, están formados por *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los coliformes fecales se encuentran casi exclusivamente en las heces de animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal (Madigan 1997).

El diagnóstico de estos microorganismos, requiere laboratorios especializados y costos elevados, por lo que el objetivo principal de este estudio fue desarrollar y evaluar un medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes en agua. Los objetivos específicos fueron: sustituir componentes del medio para coliformes comercial por componentes fácilmente disponibles y de bajo costo y comparar la eficiencia del medio alternativo contra el medio comercial. De esta manera, poblaciones con escasos recursos económicos pueden monitorear la calidad del agua que consumen y tomar medidas preventivas y correctivas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN

El proyecto se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología en Zamorano, Valle del Yeguaré FM

3.2. MATERIALES Y EQUIPO

3.2.1. Materiales

1. Agar Baked Analyzed
2. Bacto Peptona Becton, Dickinson & Company
3. Extracto de levaduras granulado EM Science
4. Rojo Neutral BIOPLUS
5. Cristal Violeta BIOPLUS
6. Suero Lácteo: Es el líquido resultante de la precipitación enzimática de las proteínas de la leche durante la elaboración de queso. Se obtiene tras la separación de la caseína y grasas. Constituye aproximadamente el 90 % de la leche y contiene los compuestos hidrosolubles: lactosa (5%), proteína cruda (0.9%), cenizas (0.6%), grasa (0.3%); agua (93%). La fracción proteica está compuesta por β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, inmunoglobulinas y seroalbuminas (Caballero 2000). Se utilizó suero lácteo por su contenido de lactosa que es la fuente de carbohidratos para este tipo de bacterias (lactosa-positivas).
7. Sal común “La Tortuga”: Actúa como regulador del equilibrio osmótico. Se utilizó para reemplazar al cloruro de sodio comercial.
8. Clara de Huevo: Compuesto por un líquido incoloro, el cual se encuentra contenida en una fina red de fibrina que se rompe al batirlo. Posee un pH de 7.6 – 9.6 (Instituto del Huevo 2003). La clara de huevo posee aproximadamente de 0.3 a 0.4 % de lisozima en su composición y es el sustituto de las sales biliares. El nombre de lisozima o muramidasa incluye a un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos $\beta(1 \rightarrow 4)$ de los polisacáridos de la pared celular bacteriana (Universidad de Sevilla 2005) (Anexo 1).

3.2.2 Equipo

- Balanza electrónica de precisión Acculab Sartorius Group Serie VIC 98648-013-61.

- Calentador y agitador Fisher Scientific Isotemp.
- Incubadora Fisher Scientific Isotemp Incubator.
- Sistema de conteo de colonias Bel-Art Products Manostat Mini-light box.
- Campana extractora de flujo laminar Purifier Class II Biosafety Cabinet LABCONCO.
- Micropipeta Finnpipett® II 100-1000 µL Fisherbrand.
- Puntas estériles para micropipeta Fisherbrand Sure Fit™ Ergo, Fisher Scientific.
- Erlenmeyer 250, 300, 500, y 1000 mL.
- Vasos de precipitación 50, 100, y 500 mL.
- Pipetas serológicas 2, 5, y 10 mL.
- Pipetas volumétricas 10 mL.
- Potenciómetro pHTestr 10 Waterproof Eutech Instruments.
- Termómetro digital

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Reemplazo de ingredientes

Se tomó como base la formulación del Agar Biliado-Rojo Neutro-Cristal Violeta VRBA (por sus siglas en inglés) para la sustitución de los componentes. De acuerdo a las funciones de cada uno de los componentes y la viabilidad de reemplazarlo con otros ingredientes fáciles de encontrar en el mercado se determinó cambiar las sales biliares por lisozima (presente en la clara de huevo), lactosa por suero lácteo obtenido de leche pasteurizada y homogenizada Zamorano (2% de grasa) y cuajo a 32 °C por cuarenta minutos, cloruro de sodio comercial por sal común.

3.3.2. Formulación y protocolo de preparación

Mediante prueba y error y algunos parámetros necesarios a considerar de acuerdo a la naturaleza física y química de algunos de los componentes se realizó varias pruebas a pequeña escala (100 mL) hasta determinar la cantidad exacta de cada componente, el orden de adición y la temperatura adecuada de preparación.

3.3.3. Medición de pH

El valor de pH del medio de cultivo se midió con un potenciómetro portátil antes y después de añadir el colorante e indicador de pH (rojo neutral).

3.3.4. Medición de Temperatura

La temperatura se midió con un termómetro digital en grados centígrados antes de: añadir el suero, clara de huevo, rojo neutral y de realizar la inoculación en el medio.

3.3.5. Elección de inóculo

Se determinó utilizar jugos cárnicos como inóculo ya que de esta manera se asegura la presencia de coliformes. Para cuantificar colonias en los platos se decidió realizar una dilución de 10^{-2} en agua potable.

3.3.6. Inoculación

Se realizó siembras por duplicado mediante la técnica de pour plate (control, 10^{-2} y 10^{-3}) para cada medio de cultivo. La inoculación se realizó en la campana extractora de flujo laminar con el medio de cultivo a una temperatura de 35-40 °C. Una vez gelificado el medio en los platos petri se incubaron por 24 horas a 37 °C.

3.3.7. Análisis Estadístico

Se hizo uso del Sistema de Análisis Estadístico® (SAS, por sus siglas en inglés) versión 9.1 para comparar muestras apareadas a través de una prueba t ($P < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1. FORMULACIÓN

Una vez terminado el proceso de investigación, basado en la elaboración de medios de cultivo alternativo a pequeña escala (100 mL) se logró determinar los tres compuestos sustitutos (lactosa, clara de huevo y sal común), el orden de adición de todos los componentes y los parámetros físicos que se deben controlar (pH y temperatura) para obtener el medio de cultivo alternativo con las características deseadas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Formulación de medio de cultivo alternativo

Componente	Cantidad (g/L)
Agar	12.000
Suero lácteo	200.000
Peptona	7.000
Sal común	5.000
Extracto de Levadura	3.000
Clara de huevo	10.000
Rojo Neutral	1.400
Cristal Violeta	0.001

A 25 °C el pH final es de 7.4 ± 2

4.2. PROTOCOLO DE PREPARACIÓN

- a) Tomar un erlenmeyer y añadir 1000 ml de agua destilada. Colocarlo en el calentador-agitador con un magneto de tamaño adecuado.
- b) Añadir el agar y la peptona, esperar a que el líquido hierva y bajar la temperatura del mismo hasta 50 – 55 °C.
- c) Añadir el extracto de levaduras y el suero lácteo.
- d) Aparte, mezclar la clara de huevo con la sal para obtener una solución de clara menos viscosa y de fácil homogenización.
- e) Añadir la mezcla de clara y sal, dejarlas por un período de 2 minutos a 50 – 55 °C.
- f) Añadir el indicador, rojo neutral y cristal violeta. Esperar hasta que se homogenice correctamente y no incrementar la temperatura (50 – 55 °C).

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Una vez determinada la formulación y el protocolo de preparación, se procedió a realizar la siembra de 80 platos petri de cada medio de cultivo con dos diluciones (10^{-2} y 10^{-3}). Adicionalmente, se sembraron controles con medios de cultivo sin inoculación.

En ambos medios de cultivo los platos control tuvieron presencia nula de colonias, los platos con 1 mL de inóculo fueron incontables. Solamente en los platos con 0.1 mL de inóculo se pudo contar las colonias presentes (Cuadro 3).

Se realizó un diseño de muestras apareadas con una prueba t donde se determinó que no existen diferencias estadísticas significativas entre los conteos de los dos medios de cultivo ($P > 0.05$) (Anexo 2).

Cuadro 3. Conteo de colonias de coliformes después de inocular con agua contaminada e incubar a 37 °C durante 24 horas.

VRBA COMERCIAL			MEDIO DE CULTIVO ALTERNATIVO		
# PLATO	UFC*	Log UFC	# PLATO	UFC	Log UFC
1	8.30E+04	4.9191	1	7.2E+04	4.8573
2	7.8E+04	4.8921	2	8.1E+04	4.9085
3	1.4E+05	5.1492	3	8.2E+04	4.9138
4	1.0E+05	5.0128	4	9.0E+04	4.9542
5	1.2E+05	5.0864	5	6.6E+04	4.8195
6	1.2E+05	5.0899	6	8.6E+04	4.9345
7	7.9E+04	4.8976	7	1.2E+05	5.0864
8	6.2E+04	4.7924	8	7.7E+04	4.8865
9	6.9E+04	4.8388	9	1.3E+05	5.1072
10	6.4E+04	4.8062	10	1.1E+05	5.0531
11	8.2E+04	4.9138	11	7.3E+04	4.8633
12	9.5E+04	4.9777	12	1.1E+05	5.0294
13	1.2E+05	5.0645	13	1.3E+05	5.1038
14	1.1E+05	5.0334	14	1.2E+05	5.0934
15	1.2E+05	5.0755	15	6.7E+04	4.8261
16	1.5E+05	5.1644	16	1.0E+05	5.0086
17	1.2E+05	5.0934	17	4.7E+04	4.6721
18	1.5E+05	5.1818	18	8.6E+04	4.9345
19	1.1E+05	5.0212	19	1.1E+05	5.0294
20	1.2E+05	5.0792	20	1.0E+05	5.0043

* Unidades formadoras de colonias.

4.4. ANÁLISIS DE COSTOS VARIABLES

En este análisis se tomó como base para analizar los costos la formulación del medio de cultivo alternativo y la preparación del VRBA comercial para 1 Litro aproximadamente. En el caso del VRBA comercial se necesitan 41.5 gramos con un valor de USD 7.39; mientras que el costo de la formulación para elaborar el medio de cultivo alternativo, de características similares es USD 5.54 (Cuadro 4).

Al elaborar el medio de cultivo alternativo se obtuvo un ahorro de USD 1.85 comparado al VRBA comercial, este valor representa una disminución del 25% del valor del costo comercial. Este análisis no consideró los costos de mano de obra ni logística.

Cuadro 4. Costos de componentes para la elaboración del medio de cultivo alternativo para la enumeración de coliformes totales.

Componente	Gramos	Precio \$	\$/gramo	Formulación (gramos)	TOTAL
Agar	500	71.6000	0.14320	12.0000	1.71840
Extracto de Levaduras	500	95.1400	0.19028	3.0000	0.57084
Peptona	500	77.6800	0.15536	7.0000	1.08752
Sal común	200	0.2700	0.00135	5.0000	0.00675
Cristal Violeta	100	109.5200	1.09520	0.0010	0.00110
Rojo Neutral	25	37.1000	1.48400	1.4000	2.07760
Huevos	10	0.0800	0.00800	10.0000	0.08000
				TOTAL	5.54221

Fuente: Difco™ & BBL™ Manual of Microbiological Culture Media

5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un medio de cultivo selectivo alternativo para la enumeración de coliformes totales en agua basado en un medio de cultivo comercial.

Los componentes que se sustituyeron para la realización del medio de cultivo alternativo fueron: clara de huevo (lisozima) por sales biliares, sal común por cloruro de sodio comercial y suero lácteo como fuente de lactosa.

En el conteo de coliformes no se encontraron diferencias significativas entre los medios de cultivo alternativo y comercial, por lo tanto el medio de cultivo alternativo se considera un reemplazo del VRBA comercial.

De acuerdo al análisis de costos de los componentes se determinó que el medio de cultivo alternativo es 25% menos costoso que el que VRBA comercial.

6. RECOMENDACIONES

Se recomienda analizar el medio de cultivo alternativo a una temperatura de 44.5 °C para la detección y enumeración de *E. coli* (coliformes fecales) ya que el análisis de coliformes totales está considerado un método primario para determinar la calidad microbiológica del agua de consumo humano.

Determinar la cantidad mínima del indicador rojo neutral para obtener los resultados deseados, ya que es el componente de mayor costo en la formulación.

Evaluar el comportamiento del medio de cultivo alternativo en fuentes y sistemas de distribución de agua en comunidades rurales.

Introducir la tecnología a las comunidades rurales.

Evaluar la estabilidad del medio de cultivo alternativo en condiciones de almacenamiento en el tiempo.

7. BIBLIOGRAFÍA

Allen, M. 1996. La Importancia para la Salud pública de los indicadores bacterianos que se encuentran en el agua potable. Reunión sobre la calidad del Agua Potable. CEPIS. OPS. OMS. Lima, Perú.

Bryan H y Bryan A. 1981. Bacteriología Principios y Prácticas. Editorial Continental. Mexico D. F. Cap. 25 p. 339-345.

Caballero, N. 2000. Uso de mezcla de pienso con suero de leche fresco y fermentado en la alimentación de la última etapa de cría y primera de preceba. (en línea). Disponible en: <http://www.sian.info.ve/porcinos/publicaciones/viencuent/caballero.htm>. Consultado el 25 de octubre de 2006.

Cabrera, R. 1997. Albúmina del huevo (en línea). Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos16/derivados/derivados.shtml>. Consultado el 25 de octubre de 2006.

Cáceres, O. 1990. Desinfección del Agua. Ministerio de Salud-OPS. Lima-Perú.

Goez, M. 1999. Determinación y diferenciación de E. Coli y Coliformes Totales usando un mismo sustrato cromogénico. Textos Completos. CEPIS.

Instituto del Huevo. 2003. Estructura del huevo (en línea). Disponible en: <http://www.institutodelhuevo.org.mx/compos.html>. Consultado el 25 de octubre de 2006.

Madigan, M. 1997. Biología de los microorganismos. Prentice Hall. Madrid, octava edición. p. 986.

Montealegre, J. 2002. Características bioquímicas de las bacterias (en línea). Disponible en: <http://agronomia.uchile.cl/webcursos/microbiologiagr/pagina%20microbiologia1/word.html>. Consultado el 10 de octubre de 2006.

Raisman, J. 2000. Nutrición microbiana (en línea). Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/bacterias/nutric~2.htm>. Consultado el 24 de octubre de 2006.

RIPDA-CYTED. 2003. Agua potable para comunidades rurales, reuso y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas (en línea). Disponible en: <http://tierra.rediris.es/hidrored/ebooks/ripda/>. Consultado el 10 de octubre de 2006.

Toddar, K. 2005. Nutrition and Growth of Bacteria (en línea). Disponible en: <http://www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/nutgro.html>. Consultado el 30 de octubre de 2006.

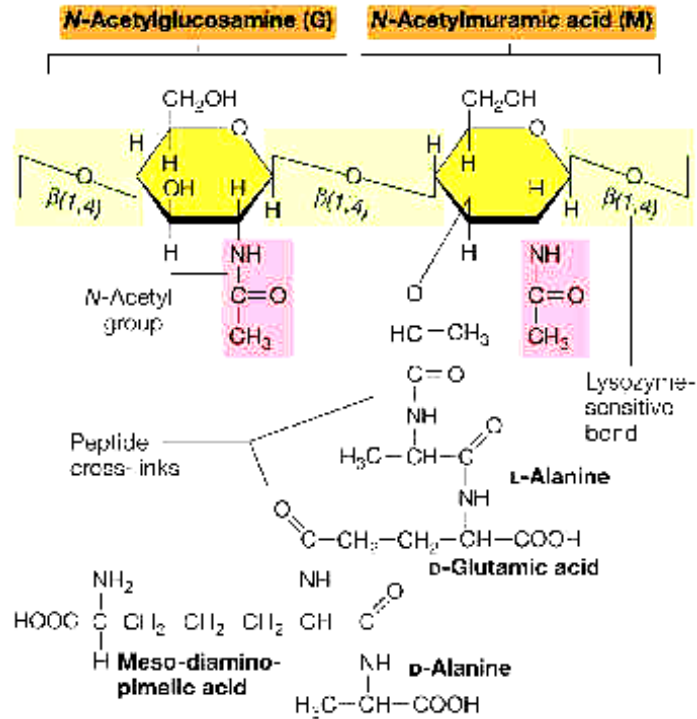
Universidad de Sevilla. 2005. Prácticas de bioquímica General. Licenciatura de Farmacia. p. 1.

Vargas, L. 1996. Control de Calidad del Agua en la Red de Distribución. CEPIS. 6p

Zimbro, MJ. 2003. Difco™ & BBL™ Manual of Microbiological Culture Media. Meryland, USA. Pp. 613-615.

8. ANEXOS

Anexo 1. Efecto de la lisozima en las bacterias Gram positivas



Fuente: Raisman 2000

Anexo 2. Diseño para muestras apareadas con prueba t.

Promedio	Desv. Est.	Valor t	$P > t $
0.05	0.182	1.24	0.2317