

## ANALISIS BACTERIOLOGICO DE LAS AGUAS POTABLES DE MEXICO \*

Por el Dr. JESUS ARROYO,  
académico titular.

En un trabajo presentado a esta H. Academia hace varios años, he abordado el estudio bacteriológico de las aguas potables en México, con el objeto de poner al día las técnicas de análisis que antes se llevaban a la práctica. Hoy vuelvo a ocuparme del mismo tema, porque los progresos constantes de la bacteriología y los estudios no interrumpidos de los hombres de ciencia que velan por la salud de los seres humanos, han permitido obtener datos valiosos para la investigación e identificación de los gérmenes que pueden contaminar las aguas, especialmente los que forman el llamado "grupo coliforme", que ahora como antes sigue siendo un índice, el más importante quizá, de la posible contaminación del agua de bebida por gérmenes patógenos de origen intestinal, a la cabeza de los cuales hay que colocar entre nosotros, los gérmenes de la tifoidea y de las paratifoideas.

Se incluyen en dicho grupo coliforme, todos los bacilos Gram-negativos no esporulados, aerobios y anaerobios facultativos, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas, de este último sobre todo, y por lo tanto se aconseja para su investigación, la siembra de las aguas por analizar, en tubos de fermentación conteniendo caldo lactosado en proporción tal, que después de la siembra la cantidad de lactosa sea de 0.5%.

Estos tubos, que no deben ser en número menor de cinco para cada muestra, se siembran con cantidades adecuadas de agua, según sea la calidad de ésta (si se trata de agua destinada a la bebida se aconseja sembrar

---

\* Estudio de las modificaciones introducidas por los métodos americanos en la práctica de dichos análisis. Leído en la sesión del 23 de marzo de 1949.

10 c. c. de agua en cada tubo), y se incuban en termóstato a 37° C. durante 24 horas y al cabo de este tiempo se examinan para investigar en ellos la presencia de gas, que cuando existe es siempre muy aparente; si no se comprueba, el examen vuelve a repetirse a las 48 horas.

Si transcurridas las 48 horas citadas, no se observa gas en los tubos, la prueba debe darse como *negativa* en lo que se refiere a la existencia de los gérmenes del grupo coliforme que se investiga.

En cambio, si se observa gas en ellos, ya sea a las 24 o a las 48 horas, la prueba, que se llama de presunción, debe estimarse positiva. En tal caso se iniciará la segunda prueba, que consiste en pasar un poco del cultivo en caldo lactosado, de los tubos que contienen gas, a un medio selectivo que puede ser una placa de gelosa de Endo o un tubo de caldo lactosado, con verde brillante y sales biliares, medios ambos, que inhiben la reproducción de muchas bacterias permitiendo sólo la de unas cuantas especies, entre las cuales están los gérmenes coliformes que estamos estudiando. Es preferible emplear ambos medios en esta segunda prueba.

Para hacerla se aconseja tomar un poco del cultivo en caldo lactosado. Se utiliza un alambre de platino que tenga su extremidad doblada en ángulo obtuso, introduciéndolo sólo un milímetro en el interior del tubo, procurando no tomar ninguna parte sólida que haya en el cultivo. Se pasa a gelosa de Endo, haciendo en esta una estría a fin de tener colonias aisladas al final de ella. Y en cuanto a la siembra en caldo lactosado con verde brillante y sales biliares, debe hacerse con una asa de platino de tres milímetros de diámetro, a partir del tubo original en que se haya formado gas.

Se incuban ambos, el tubo que acabamos de sembrar y la placa de Endo, a 37° C. durante 24 ó 48 horas, para permitir la aparición de gas en el primero, y la de colonias características (rojas por transparencia y doradas por reflexión) en la segunda. Si ambas cosas ocurren, esta segunda prueba, que se llama *parcialmente confirmada*, debe estimarse positiva.

Si no se desarrolla gas en el tubo con verde brillante, la prueba es negativa y nos permitirá afirmar que no son gérmenes del grupo coliforme, los que desarrollaron gas en la prueba de presunción.

Y en el caso de las colonias formadas en la placa Endo (sean o no, características del grupo que estudiamos) se requiere llevar a cabo una tercera prueba de investigación que es la siguiente:

Con un alambre de platino se toma una pequeña porción de una de dichas colonias, a fin de evitar tomar gérmenes de contaminación, y se pasa a un nuevo tubo con caldo lactosado igual al que sirvió para la prueba inicial, incubándolo de 24 a 48 horas a 37° C. en busca de gas, que si se forma, nos da una confirmación más de que los gérmenes desarrollados corresponden al grupo coliforme. En caso contrario (si no hay formación de gas), podemos desechar la presencia de gérmenes de dicho grupo.

A su vez, del tubo con verde brillante en que apareció gas, se hace una nueva estría en otra placa de Endo; que seguirá el mismo proceso que la anterior a que acabamos de referirnos, incluyendo la confirmación de gas en un nuevo tubo con caldo lactosado original. Un hecho interesante suele ocurrir a veces, y es que el caldo con verde brillante se decolore, lo que puede ser debido a la presencia del *Clostridium Welchii*; un examen microscópico y el aislamiento del germen puede confirmar el hecho, y por lo que hace a su significado, tratándose de una bacteria habitual del intestino, tiene el mismo valor, en lo que a contaminación del agua se refiere, que los gérmenes coliformes que estamos estudiando.

Todavía es indispensable hacer una siembra en gelosa inclinada, partiendo de cada uno de los nuevos tubos de caldo mencionados, e incubarla 24 horas a 37°, para hacer después una preparación microscópica de cada una de ellas, que coloreada por el método de Gram, nos permitirá investigar la presencia de bacilos Gram-negativos, no esporulados, que si se encuentran, nos darán ya una confirmación absoluta de la existencia de los gérmenes del grupo coliforme, que han sido motivo de esta investigación.

Estas pruebas reunidas, la resiembra del cultivo en Endo a caldo lactosado, la siembra en estría en gelosa inclinada, y el examen microscópico de las preparaciones correspondientes, constituyen lo que se llama prueba totalmente confirmada en lo que atañe al reconocimiento de los gérmenes del grupo coliforme.

En el caso de que en la estría hecha en gelosa inclinada se desarrollen gérmenes esporulados, se hará una nueva resiembra, ahora en caldo lactosado con formiato y ricinoleato de sodio, en que tales gérmenes esporulados no habrán de desarrollar gas si se encuentran solos en el cultivo; en caso contrario estarán asociados a los gérmenes coliformes, y entonces de este nuevo cultivo habrá que pasar otra vez a caldo lactosado en busca de gas, y a otra estría en gelosa inclinada para nuevo estudio microscópico de los gérmenes, en busca de bacilos Gram-negativos no esporulados.

Sólo después de haber terminado todas estas pruebas, estaremos en aptitud de dar un resultado satisfactorio desde el punto de vista bacteriológico, del análisis de las aguas que hemos practicado, ya que procediendo en esta forma habremos agotado por decirlo así, las investigaciones más demostrativas de la presencia de gérmenes coliformes y de los caracteres biológicos que les son peculiares.

Difiere esta manera de proceder, de la que se llevaba a cabo anteriormente, en la mayor precisión bacteriológica que se obtiene en la actualidad mediante la ayuda que el examen microscópico de los cultivos nos da de los caracteres bacterioscópicos de los gérmenes presentes en ellos, y en el reconocimiento de gérmenes no coliformes (cuando existen) por medios de cultivo altamente selectivos, que nos permiten afinar los resultados y eliminar la causa de error que antaño significaba la presencia de estos gérmenes.

Ahora bien, hasta este momento sólo hemos llegado a la conclusión de que en el agua analizada hay gérmenes coliformes, sin averiguar si su origen es fecal o no lo es; si tratamos de precisar esto último, es indispensable hacer pruebas suplementarias que nos permitan diferenciar la *Escherichia coli* de origen fecal, de la *Escherichia Freundii* y del *Aerobacter Aerógenes*, que frecuentemente viven en el suelo o en productos vegetales, pero que a veces viven también en el intestino humano, y quizá por esta razón no revista gran importancia diferenciarlos de la primera, en los análisis rutinarios del agua potable.

Si se desea precisar el origen de los gérmenes que estudiamos puede recurrirse, partiendo de la estría en gelosa en la que hay bacilos Gram-negativos no esporulados, a hacer nuevas siembras en agua peptonada para investigar la producción de indol, en caldo glucosado para buscar la reacción del rojo de metilo, ambas pruebas positivas para la *Escherichia coli* y negativas para los otros dos gérmenes; o bien en medio de Eijkman empleando la fórmula original de este autor incubando este último cultivo en Baño de María a 45 grados centígrados durante 48 horas, temperatura a la cual sólo puede desarrollarse la *Escherichia coli* con producción de gas, por la cual esta prueba es de una gran sensibilidad, y cuando se practica aisladamente es digna de toda confianza en sus resultados.

Pero, como ya se expuso, esta diferenciación no es de llevarse a cabo habitualmente, bastando por lo mismo las operaciones técnicas que nos permiten identificar el grupo de gérmenes coliformes, sin especificar sus variedades.

Y en cuanto a la manera de calcular el número probable de bacilos coliformes presentes, en los diversos casos que pueden observarse en la práctica, se realiza empleando la fórmula propuesta por Greenwood & Yule después de llevar a cabo numerosos análisis bacteriológicos de aguas diversamente contaminadas, y variando las cantidades sembradas a fin de obtener resultados distintos en cada caso, que fueron objeto de estudio muy detenido. Dicha fórmula es la siguiente:

$$\lambda = 2.302585 \log. \frac{N}{N - m}$$

en la cual  $\lambda$  representa el número más probable de bacilos coliformes que tratamos de conocer, 2.302585 es una constante,  $N$  el número de tubos sembrados cada uno con 10 cc. de agua (cinco en nuestro caso), y  $m$  el número de tubos positivos, es decir en los que hubo fermentación de la lactosa después de 24 ó 48 horas de incubación.

Las posibilidades de tubos positivos que pueden ocurrir son, como es fácil comprender, 1, 2, 3, 4 y 5, por lo tanto si  $N$  vale 5 los valores de  $N - m$  serán los siguientes:

$$\begin{aligned} N - m &= 5 - 1 = 4 \\ N - m &= 5 - 2 = 3 \\ N - m &= 5 - 3 = 2 \\ N - m &= 5 - 4 = 1 \\ N - m &= 5 - 5 = 0 \end{aligned}$$

Y supliendo estos valores en el quebrado  $\frac{N}{N - m}$  y haciendo las di-

visiones correspondientes tendríamos los resultados que siguen:

$$\frac{5}{4} = 1.25, \frac{5}{3} = 1.67, \frac{5}{2} = 2.50, \frac{5}{1} = 5 \text{ y } \frac{5}{0} = \infty$$

Si ahora anotamos estos resultados en la fórmula citada arriba, tendríamos las siguientes ecuaciones:

$$\begin{aligned} \lambda &= 2.302585 \log. 1.25 \\ \lambda &= 2.302585 \log. 1.67 \\ \lambda &= 2.302585 \log. 2.50 \\ \lambda &= 2.302585 \log. 5 \\ \lambda &= 2.302585 \log. \infty \end{aligned}$$

Y buscando los logaritmos que necesitamos, en las tablas de Callet encontramos las cifras siguientes:

De 1.25	—0.09691
De 1.67	—0.22272
De 2.50	—0.39794
De 5	—0.69897

Y el logaritmo del infinito es el infinito.

Basta entonces multiplicar estos números por la constante 2.302585 para tener los siguientes resultados:

En el primer caso	0.22314351235
En el segundo	0.51283173120
En el tercero	0.91629067490
En el cuarto	1.60941783745

En el quinto el resultado sería el infinito, porque todo número multiplicado por el infinito, es igual al infinito.

Los primeros cuatro números son los valores de  $\lambda$  en cada uno de los casos mencionados, es decir los números más probables de bacilos coliformes que habría en 10 cc. del agua en estudio, cuando hubiese 1 tubo positivo de 5 sembrados (0.22), ó cuando hubiese dos tubos positivos (0.51), ó 3 (0.91), ó 4 (1.60), respectivamente; estos números son los mismos que los autores americanos señalan en las obras respectivas.

En el caso en que los cinco tubos sembrados fuesen positivos, la estimación se haría expresando tan sólo que habría más de 1.60 bacilos coliformes por 10 cc. de agua; luego volveremos sobre esto.

Si elevamos las cifras anteriores diez veces para hacerlas corresponder a 100 cc. del agua analizada, tendríamos 2.2, 5.1, 9.1 y 16.0 bacilos coliformes en cada caso para los 100 cc. mencionados. Y si los elevamos 10 veces más para hacerlos corresponder a 1000 cc. del agua en estudio, tendríamos las cifras de 22, 51, 91 y 160, que nos indicarán la cantidad de gérmenes coliformes por litro de agua, cuando hubiese 1, 2, 3 y 4 tubos positivos respectivamente.

Ahora bien, yo propondría que en nuestro medio para facilitar la memoria, expresemos estas cifras en números redondos, de la siguiente manera:

- 1 tubo positivo correspondería a 20 gérmenes colif. por litro.
- 2 tubos positivos correspondería a 50 gérmenes colif. por litro.
- 3 tubos positivos correspondería a 90 gérmenes colif. por litro.
- 4 tubos positivos correspondería a 160 gérmenes colif. por litro.
- 5 tubos positivos correspondería a + de 160 gérmenes colif. por litro.

Si no hay ningún tubo positivo se diría que hay menos de 20 gérmenes coliformes por litro.

Y en el caso de los cinco tubos positivos, si se quiere precisar el grado de contaminación que alcanza el agua que se estudia, lo correcto es sembrar cantidades decrecientes de ella, 1 c. c., o 0.1 c. c., 0.01 c. c., etc., y hacer la estimación de los resultados obtenidos según sea el tubo positivo que contenga la menor cantidad de agua sembrada, anotando el número inverso de dicha menor cantidad de agua; por ejemplo: si el último tubo positivo contiene 0.1 c. c., se estimarán 10 gérmenes coliformes por c. c.; si fué el que tiene 0.01 c. c. se anotarán 100 gérmenes coliformes por c. c., y así sucesivamente, haciendo luego la proporción correspondiente a 1000 c. c. del agua analizada.

Puede ocurrir el caso de que sea positivo un tubo que tenga menor cantidad de agua que el inmediato que contiene más (el inmediato anterior) y que da resultado negativo; por ejemplo: el que tenga 0.01 c. c. puede ser positivo y el que tenga 0.1 c. c. puede ser negativo, entonces el resultado positivo se transfiere al tubo con 0.1 c. c. para apreciar la contaminación y se dice que habrá 10 gérmenes coliformes por c. c. y no 100; esto se explica por el reparto desigual de las bacterias en los medios que las contienen, sobre todo cuando se trabaja con cantidades muy pequeñas de estos, o con grandes diluciones de ellos.

Y para terminar lo que a estimación de gérmenes se refiere, debo dejar asentado que en nuestro medio, de acuerdo con las prescripciones de las autoridades sanitarias, y a semejanza de lo que ocurre en Estados Unidos, el agua para ser potable, no debe contener más de 20 gérmenes coliformes por litro (o 22 de acuerdo con los cálculos matemáticos), lo que equivale a decir que no debe haber más de un tubo positivo, de cinco sembrados cada uno con 10 c. c. de ella.

Veamos ahora lo que se refiere a las siembras, que también deben hacerse, en placas de gelosa y gelatina.

Al mismo tiempo que se hace la siembra original en tubos se sembrará 1 c. c. del agua en estudio, en cada una de dos cajas de Petri, en las

cuales se pondrán después 10 c. c. de gelosa en una y de gelatina en la otra, ambas fundidas y tibias, procurando hacer girar las cajas para que se tenga una mezcla uniforme en las placas que se constituyen al enfriarse.

Se incuba la placa de gelosa a 37 grados, 24 horas, poniéndola invertida para que el agua de condensación no contamine toda la placa, y la de gelatina a 20 grados, 48 horas, en posición natural. Al cabo de estos plazos se examinan las placas para enumerar las colonias formadas y obtener el promedio de ambas, que se hará constar refiriéndolo a 1 c. c. del agua sembrada.

Estas siembras nos indican, la que se hace en gelosa y se incuba a 37 grados, las bacterias principal o potencialmente parasitarias que provienen, del suelo, o de los albañales, o de los *excreta* humanos o de animales, que haya en la superficie de la tierra, y deben ser consideradas como peligrosas para la salud de las personas.

No sucede lo mismo con las placas de gelatina, ya que si estas dan cuentas altas, los gérmenes correspondientes no indican polución de las aguas como en el caso anterior, sino la presencia de gérmenes saprofitos que comúnmente no son patógenos para el hombre. Sin embargo, una cuenta alta en estos casos, puede darnos indicaciones sobre la cantidad de sustancias nutritivas para las bacterias, en la fuente de donde proviene el agua, la cantidad de polvo, de sustancias orgánicas u otras materias extrañas que tengan fácil acceso al agua; y en estos casos, mientras mayor sea el número de microbios que se desarrollen a 20 grados, mayor será la cantidad de materia orgánica presente y más peligrosa para ser bebida será un agua en tales condiciones. Es por esto que entre nosotros se ha señalado en las prescripciones oficiales, desde hace tiempo, un límite al número de colonias que pueden permitirse al agua para que sea potable, que hasta la fecha es de 200 colonias por c. c., tomando el promedio de las que se hayan desarrollado en ambas placas de gelosa y de gelatina, de que ya se hizo mención.

Sintetizando lo antes expuesto, podemos esquematizar así la técnica de análisis bacteriológico de las aguas destinadas a la bebida, en nuestro medio:

I Siembra de 5 tubos de caldo lactosado, cada uno con 10 c. c. del agua en estudio, e incubación de 24 a 48 horas.

II. Paso de una asa de cultivo de los tubos anteriores en que se haya formado gas, a un tubo con caldo biliado y verde brillante, y una placa de

gelosa de Endo, e incubación de ambos, de 24 a 48 horas. Si no se desarrolla gas en el tubo de caldo biliado ni hay colonias típicas de gérmenes del grupo coli en el medio de Endo, se suspende la investigación y se desecha la presencia de gérmenes coliformes en el agua que estudiamos.

III. En caso contrario, partiendo del caldo biliado se hace una nueva estria en Endo, que si da resultado positivo, se resembrará como la placa de Endo anterior, cada una en un nuevo tubo con caldo lactosado primitivo, en busca de nueva formación de gas a expensas de la lactosa. Si en esta nueva prueba no aparece gas en los tubos, podemos desechar también la existencia de gérmenes coliformes.

IV. Si aparece gas, se hace de ambos tubos una estria en gelosa inclinada, en dos tubos distintos que se incuban a 37 grados, 24 horas, haciendo luego una preparación microscópica de cada uno de ellos, teñida por el Gram, que se examina en busca de bacilos Gram-negativos no esporulados.

V. Si hay gérmenes esporulados se hace una nueva siembra de la estria en gelosa, a caldo lactosado con formiato y ricinoleato de sodio, de este a otro tubo con caldo lactosado original en busca de gas, y a otra estria en gelosa inclinada para nueva investigación microscópica en los gérmenes Gram-negativos no esporulados.

En la secuela anterior, el tiempo primero constituye lo que se llama *prueba de presunción*, el segundo *prueba parcialmente confirmada*, y el tercero y cuarto *prueba plenamente confirmada*, en lo que a gérmenes coliformes se refiere. El quinto tiempo es suplementario y destinado a realizarse en contadas ocasiones nada más.

Aparte se harán dos siembras de 1 c. c. cada una en sendas cajas de Petri, poniendo en una 10 c. c. de gelosa fundida y tibia, y en la otra, igual cantidad de gelatina en condiciones semejantes; se incubarán, la primera 24 horas a 37 grados y la segunda 48 horas a 20 grados y al cabo de estos tiempos, se enumerarán las colonias de una y otra y se tomará el promedio de ellas, que se anotará como el que corresponde a 1 c. c. del agua en estudio.

Salvo estas últimas siembras, las demás investigaciones mencionadas tendientes a la identificación de los gérmenes coliformes, constituyen las modificaciones introducidas por los autores americanos a la técnica de

análisis bacteriológicos de las aguas, las cuales aparecen en la última edición de "*Standard Methods for the examination of Water and Sewage*", Ninth Edition, 1946", y que yo he estimado indispensable poner en práctica entre nosotros a fin de que nuestra labor dé mayor rendimiento y nos permita conocer mejor en todos los casos, la cantidad y calidad de las contaminaciones que puede experimentar el agua en nuestro país, requisito indispensable para que la purificación de ella sea efectiva desde el punto de vista de la Salubridad Pública.