

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA.  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
DR. LUIS FELIPE MONCADA  
UNAN-MANAGUA**



**Monografía para optar al título de Licenciatura en Bioanálisis Clínico**

Detección de *pseudomona aeruginosa* y bacterias heterótrofas de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano, comercializadas en la ciudad de Managua en el período Diciembre 2014 a Enero 2015

**AUTORES:**

Br. Salomón José Delgado Calderón.

Br. Francisco Alexander Morales Torres

**TUTOR.**

Ing. Benita Magali Jiménez

Microbiología de Aguas y Alimentos CNDR

**ASESOR METODOLOGICO:**

Msc. Carmen Lanuza

Microbiología de Aguas y Alimentos

**Managua, 7 de abril del 2015**

## VALORACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de tutor del trabajo monográfico que tiene como tema “Detección de *pseudomona aeruginosa* y *bacterias heterótrofas* de aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano, comercializadas en la ciudad de Managua en el período Diciembre 2014 a Enero 2015”.

Por los estudiantes Francisco Morales y Salomón Delgado con el fin de obtener el Título de Licenciados en Bioanálisis clínico y aportar al departamento de Microbiología de Aguas y Alimentos del CNDR-MINSA un método más para evaluar la calidad microbiológica del agua envasada para consumo humano.

Considero que dicho trabajo reúne los requisitos suficientes para ser sometido a la evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

Dado en la ciudad de Managua Nicaragua 07 de abril del 2015

---

**Ing. Benita Magaly Jiménez**

**Analista del Departamento de Microbiología de Aguas y Alimentos  
CNDR-MINSA**

## DEDICATORIA

A mi madre *Maricel Calderón* por ser la mujer que más me ha apoyado en esta parte de mi vida universitaria, que a pesar de las limitaciones siempre estuvo conmigo.

A mi padre *José Ramón Delgado* porque gracias a sus consejos he llegado hasta donde estoy, mi hermano, mi abuela y mi hija que han sido un motivo de superación.

A mi compañero, mi amigo y mi hermano *Francisco Morales* que desde pequeño nos hemos apoyado y estamos culminando juntos este trabajo.

A aquellas personas que me han brindado su apoyo durante este largo período.

*Salomón José Delgado Calderón*

## DEDICATORIA

A mis abuelos, padres, tíos y hermanos que sin su apoyo no habría podido llegar hasta donde estoy.

A *Santiago Marcelo Izaguirre* por ser mi motivación para superarme y culminar mi carrera.

A todas las personas que me apoyaron en el transcurso de la carrera y la elaboración de este trabajo.

A mis colegas *Keving Lacayo, Carlos Cruz, Evert Ponce, Carlos Barilla, Jazell Reyes, Janeyris Jiménez* por sus consejos y ser buenos compañeros.

Por ultimo pero no menos importante a mi compañero, amigo y hermano *Salomón Delgado* que a pesar de las adversidades siempre nos ayudamos a salir adelante y así culminamos juntos otra etapa de nuestras vidas.

***Francisco Alexander Morales Torres***

## AGRADECIMIENTO

Antes de mencionar a todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo, le agradecemos a **Dios Padre** por habernos dado la fuerza, paciencia, sabiduría y entendimiento iluminando nuestro camino para poder realizar con éxito este trabajo.

Nuestras familias que nunca dudaron en apoyarnos al alcance de ellos, le decimos en coro “GRACIAS”.

Agradecemos a nuestra estimada asesora **Msc. Carmen Lanuza** y a nuestra tutora **Ing. B. Magaly Jiménez** por habernos brindado la oportunidad de trabajar a su lado teniendo en nosotros la fe y confianza en que podíamos llegar a alcanzar con éxito la meta establecida superando cada adversidad que se nos presentara. Por su voluntad, dedicación, paciencia (y mucha diríamos nosotros) y esmero, al guiarnos y motivarnos en el transcurso de nuestra investigación, de igual manera le damos gracias por transmitirnos sus conocimientos, virtudes y habilidades siendo una fuente de inspiración y respeto en este y cada una de los retos que se nos presenten de hoy en adelante en nuestro ámbito profesional.

También agradecemos al Director general del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia **Dr. Ángel Balmaceda** por aprobar la realización de este trabajo, a la señora **Yolanda Solórzano** por su apoyo en la preparación de los medios de cultivos.

Yo **Salomón Delgado** les agradezco grandemente a **Martha Romero** y a su madre **Martha Quintero** por su apoyo incondicional, por brindarme su hogar en los momentos necesarios y los consejos que siempre me han llevado en un buen camino.

A nuestro mentor el **Msc. Heiry Roa** y nuestra familia del **Centro de Salud Sócrates Flores Vivas** por guiar nuestro camino.



## RESUMEN

El consumo del agua envasada ha aumentado durante la última década, no obstante, se desconoce la calidad que pueda ofrecer al consumidor. El objetivo del presente estudio, fue evaluar la calidad microbiológica del agua envasada en botellas y bolsas que se venden en la ciudad de Managua, con el fin de conocer la población bacteriana de las aguas envasadas.

Se seleccionaron 10 marcas comerciales de agua envasada, obtenidas en distintos puntos de venta de la ciudad. El análisis microbiológico de NMP para *pseudomona aeruginosa* se realizó de acuerdo al Estándar método para análisis de aguas y aguas tratadas, 21th edición, la evaluación de aerobios heterótrofos se realizó según las normas COVENIN. El comportamiento del índice de NMP para *Pseudomona aeruginosa* fue de un 8% de las muestras arriba de lo establecido (1,2 NMP/100ml), cabe mencionar que esta incidencia fue de la misma empresa denominada como G, lo cual significa que dos botellas con “agua purificada” contenían dicha bacteria a evaluar. Los resultados obtenidos con respecto a las bacterias heterótrofas fueron alarmantes, ya que el 24% de las muestras sobrepasaron el rango de referencia según la COVENIN (100 UFC/100ml), que corresponden a 1 muestra de las marcas A y J, y las 5 muestras de las marcas F y G, las marcas no mencionadas no se contaron colonias de heterótrofos lo cual garantiza un buen proceso de purificación.

## ÍNDICE

VALORACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
RESUMEN.....	vi
ÍNDICE.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES .....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	5
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	6
V. OBJETIVOS.....	7
VI. MARCO TEÓRICO .....	8
VII. DISEÑO METODOLÓGICO .....	32
VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES .....	35
IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	36
X. CONCLUSIÓN .....	40
XI. RECOMENDACIONES .....	41
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	42
XIII. ABREVIATURAS .....	45
XIV. GLOSARIO.....	46
ANEXOS .....	47

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades derivadas por la ingestión de agua, son muy frecuentes en países en desarrollo; es por esto que la vigilancia y control por parte de las entidades gubernamentales sobre las plantas procesadoras de agua es continua y deben ser controladas durante todas las etapas del procesamiento desde la recepción de la materia prima hasta el almacenamiento y distribución del producto empacado; a pesar de esto, se evidencia que en el mercado se expenden productos de diferentes calidades y sin registro sanitarios. El control de la potabilidad y calidad del agua es muy importante, ya que esta es vehículo de transmisión de enfermedades producidas por patógenos intestinales, como bacterias, virus, protozoos y helmintos; o por contaminación fisicoquímica debido a la aparición de sustancias no deseables o que siendo elementos de la composición habitual del agua superan la concentración máxima admisible. Para llevar a cabo la inspección, vigilancia y control es necesario realizar un seguimiento de las características fisicoquímicas y principalmente microbiológicas del proceso de potabilización de agua y del producto terminado, con el fin de comparar con los valores normativos.

Las aguas envasadas presentan una microflora autóctona o natural que no suele ser peligrosa para la salud. Estas bacterias autóctonas se adaptan bien a las condiciones oligotróficas del acuífero profundo. La microflora autóctona comprende microorganismos aerobios y psicrotróficos que se multiplican inmediatamente después del envasado, al pasar de un sistema abierto (manantial) a otro cerrado (interior de la botella). Las bacterias autóctonas sobreviven en agua envasada por varios años y presentan un crecimiento secundario al morir algunas especies y servir de nutrientes para la multiplicación de otras.

*Pseudomona aeruginosa* es una de las especies más reportadas en el agua envasada, de ahí la importancia de actualizar diferentes aspectos relacionados con los riesgos microbiológicos potenciales en aguas envasadas

Los microorganismos de esta especie son ubicuos en el ambiente. Su presencia es común en suelos y en agua naturales como lagos y ríos en concentraciones desde 10/100 ml hasta > 1 000/100 ml, sin embargo, no es frecuente en agua potable y se detecta en ella en bajas

concentraciones. Su presencia en agua potable está más relacionada con la capacidad de colonizar biofilm o biopelículas en las tuberías de los sistemas de distribución y de hemodiálisis. Esta especie sobrevive en agua destilada y agua desionizada, además, puede encontrarse tanto en ambientes oligotróficos como en ambientes con alto número de nutrientes, como en aguas residuales.

## II. ANTECEDENTES

En la última década, la preocupación sobre la calidad del agua que se consume se ha generalizado entre la población. El sabor, y algunos otros (olor, color y aspecto físico) problemas asociados con el agua potable han sido la causa del aumento en el consumo de agua embotellada.

El consumo de este producto en países desarrollados o en vías de desarrollo se ha incrementado. En muchos países el valor comercial es 1,000 veces mayor que el agua potable. En los Estados Unidos, el crecimiento anual ha sido de más de 25%, con un consumo aproximado de 4,646 millones de galones de agua embotellada. Anualmente se facturan 22,000 millones de dólares en concepto de venta del mismo. Por otro lado, en Inglaterra, las ventas de agua embotellada se triplicaron en los últimos años, ascendiendo a un total de 230 millones de libras esterlinas.

El estudio realizado en la ciudad de Buenos Aires- Argentina donde se analizaron 57 muestras de aguas envasadas a través de la técnica de tubos múltiples para *Pseudomonas aeruginosa* del cual se obtuvieron resultados negativos en un 100% para este perfil (Vilanova, 2004)

Un muestreo realizado en San Salvador a 10 marcas de agua purificada envasadas detecto la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en dos de las marcas en estudio “Agua helada” y “KUL (Aparicio Ramos & Ladino Solito, 2007)

En el municipio de Montería ciudad de Córdoba- Colombia en el cual se utiliza el método recomendado por la APHA (método de tubos múltiples con caldo Asparagina) se realizó una evaluación 16 envasadoras de agua obteniendo un 0% para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*. (Simanca, Álvarez, & Paternina, 2009); Por otra parte en la ciudad de Sincelejo- Colombia se analizaron 13 marcas diferentes de aguas envasadas en bolsas utilizando el método de filtración por membrana en donde el 92% de las envasadoras estudiadas se reportó aerobios heterótrofos, sumado que en la envasadora de agua La

Sierra presentó 100 UFC de *Pseudomonas aeruginosa* (D., Consuegra F., Gomescaseres P., & Marrugo N., 2009).

Se analizaron 25 marcas de agua purificada embotellada en la ciudad de Tijuana México con el método de tubos múltiples para *Pseudomonas aeruginosa* encontrando la presencia de esta en las siguientes 5 marcas: Fri, H2go!, Agua Nueva, Rocio, Victoria (Hurtado, Alcántara, Leal, Quiñone, & Amador, pág. 2010)

Es importante mencionar que en nuestro país aún no se han realizado estudios de este tipo por lo cual no existen antecedentes . Sin embargo en el CNDR se realizan cotidianamente análisis de aguas embotelladas para la aprobación de un registro sanitario por parte del MINSA. (CNDR, 2014)

### III. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas, esto debido a una densa capa polisacárida la cual establece una barrera no solo física sino química capaz de proteger a la bacteria de las moléculas e iones de Cloro libre residual. (REILLY, 2000)

En la última década, la preocupación sobre la calidad del agua que se consume se ha generalizado entre la población debido a cambios físico-químicos que resultan ser poco agradable también por causar grandes cantidades de afectaciones para la población. Esta ha sido una de las causas del aumento en el consumo de agua envasada por considerarse completamente libre de microorganismos y ser apta en cualquier condición para su consumo

No podemos afirmar que la presencia de microorganismo dañinos sea un problema generalizado en todas las marcas registradas y que se produzcan fallas en los procesos de purificación utilizadas por todas las compañías donde se envasa y que se encargan de distribuir este prestigioso producto, pero a pesar de exhaustivos esfuerzos por purificar, envasar y conservar el agua en perfectas condiciones para su posterior consumo este producto no se escapa haber sido estudiados con el propósito de confirmar dicha aseveración encontrándose en el proceso de análisis a *Pseudomonas aeruginosa* que es microorganismo considerado indicador para establecer los niveles de inocuidad del agua.

Por estos motivos hemos considerado realizar este estudio para que sea considerado agregar otro perfil en el análisis de las aguas embotelladas que llegan al CNDR MINSA y de esta manera aportar en el diagnostico emitido por el área de Aguas y Alimentos de esta institución, Además de contribuir a la salud de los Nicaragüenses.

#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Se encuentran *pseudomona aeruginosa* y bacterias heterótrofas en aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano comercializadas en la ciudad de Managua, Nicaragua en el período Diciembre 2014 a Enero 2015?

##### **Preguntas directrices:**

¿Se encontró *pseudomona aeruginosa* en las aguas envasadas?

¿Se verificó la reacción de los medios utilizados en el método de NMP para *pseudomona aeruginosa*?

¿Se comprobó el diagnóstico en muestras positivas para NMP utilizando las bioquímicas de oxidasa y catalasa?

¿Se evaluó la calidad bacteriológica de las aguas envasadas mediante el recuento de bacterias heterótrofas?

## V. OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Detectar *Pseudomonas aeruginosa* y bacterias heterótrofas en aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas al consumo humano comercializadas en la ciudad de Managua, Nicaragua en el periodo Diciembre 2014 a Enero 2015.

### **Objetivos específicos:**

1. Detectar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la técnica de número más probable (NMP).
2. Verificar la reacción de los medios de cultivos utilizados en el método de NMP.
3. Utilizar bioquímicas de oxidasa y catalasa para comprobar el diagnóstico de muestras positivas en la técnica de NMP
4. Evaluar la calidad del agua mediante el método vertido en placa para el recuento de aerobios heterótrofo (RHP).

## VI. MARCO TEÓRICO

### Agua envasada

Es aquella apta para el consumo humano, contenida en recipientes herméticamente cerrados, de materiales, formas y capacidades diversas, aprobadas por las autoridades competentes y que es adecuada para el consumo directo sin que sea necesario tratamiento ulterior y con cierre inviolable el cual deberá permanecer en tal condición hasta que llegue a manos del consumidor final.

Se considera, legalmente, un alimento en muchas naciones individuales y por el Codex Alimentarius de los estados de las Naciones Unidas, que está reglamentado por Food and Drug Administration (FDA), que define el agua embotellada como "agua que se destina al consumo humano y que es sellada en botellas o cualquier otro recipiente con ingredientes añadidos, excepto que puede contener opcionalmente agentes antimicrobianos seguros y adecuados y dentro de las limitaciones, el fluoruro puede también ser añadido bajo el estándar de calidad. El agua embotellada puede ser utilizada como una bebida por sí mismo o como ingrediente en otras bebidas. La FDA define también varios tipos de agua embotellada bajo la norma de identidad agua embotellada. (American Public Health Association, 2001)

Las empresas encargadas de la distribución domiciliar del agua potable (ENACAL) procesan y distribuyen agua al grado de uso humano y para beber, usualmente los parámetros que vigilan son: dureza, elementos tóxicos como el cadmio, plomo, cobre y cloro en niveles aceptables para el consumo.

El cloro se dosifica a medida que se extrae el agua de las fuentes (pozos, vertientes) y se conoce que el tiempo requerido de contacto del cloro con el agua es de 30 minutos para eliminar la flora microbiana existente. Es posible que la cantidad de cloro disminuya en el trayecto de la red subfluvial, y que en lugares lejanos la concentración sea mínima, como

una medida preventiva estas mismas empresas recomiendan hervir el agua durante 3 o 4 minutos y luego consumirla.

En las aguas embotelladas se utilizan diferentes tipos de agua: como el agua de manantiales, agua potable proveniente de sistemas públicos y agua mineral de pozos; la mayoría de estas pasan por un proceso de purificación antes de pasar al proceso de embotellado.

El primer paso en el embotellado es el proceso de recolecta del agua de una fuente. En función de la fuente, ya sea de la tierra o de un suministro de agua municipal, se necesitarán diferentes métodos para bombearla o simplemente recolectarla a través de tuberías. Luego filtrar el agua es uno de los pasos más importantes de la producción. Se utilizan diversos procesos para purificar el agua embotellada, entre los que se pueden citar son: luz ultravioleta, ozono, la ósmosis inversa y la filtración de micrones.

El agua embotellada no tiene por qué ser mejor que el agua de la red de agua potable, que tiene la regulación de la EPA. La FDA supervisa el proceso de embotellado, en el que no se comprueban ciertos contaminantes, como el amianto o los parásitos. Sin embargo, sí se controlan estrictamente el contenido en plomo y en cloro.

### **Procesos de Purificación de las Aguas destinadas al consumo Humano.**

**Pre tratamiento:** Busca acondicionar el agua residual para facilitar los tratamientos propiamente dichos, y preservar la instalación de erosiones y taponamientos. Incluye equipos tales como rejillas, tamices, desarenadores y desengrasadores.

**Tratamiento primario o tratamiento físico-químico:** busca reducir la materia suspendida por medio de la precipitación o sedimentación, con o sin reactivos, o por medio de diversos tipos de oxidación química poco utilizada en la práctica, salvo aplicaciones especiales, por su alto costo.

**Tratamiento secundario o tratamiento biológico:** se emplea de forma masiva para eliminar la contaminación orgánica disuelta, la cual es costosa de eliminar por tratamientos físico-químicos. Suele aplicarse tras los anteriores. Consisten en la oxidación aerobia de la

materia orgánica en sus diversas variantes de fangos activados, lechos de partículas, lagunas de oxidación y otros sistemas o su eliminación anaerobia en digestores cerrados. Ambos sistemas producen fangos en mayor o menor medida que, a su vez, deben ser tratados para su reducción, acondicionamiento y destino final.

**Tratamiento terciario de carácter físico-químico o biológico:** desde el punto de vista conceptual no aplica técnicas diferentes que los tratamientos primarios o secundarios, sino que utiliza técnicas de ambos tipos destinadas a pulir o afinar el vertido final, mejorando alguna de sus características. Si se emplea intensivamente pueden lograr hacer el agua de nuevo apta para el abastecimiento de necesidades agrícolas, industriales, e incluso para potabilización (reciclaje de efluentes).

**Desinfección:** El agua se desinfección antes de que entre el sistema de distribución para asegurar que los microbios potencialmente peligrosos se mueran. El cloro, clóramelos, o dióxido de cloro que se son usados más frecuentemente porque son desinfectantes más efectivos, no solo en la planta de tratamiento pero también en las tuberías que distribuyen el agua a nuestros hogares y negocios. El ozono es un desinfectante potente, y una radiación ultravioleta es un desinfectante eficaz y un tratamiento para una fuente de aguas relativamente limpia; pero ninguna de estas es efectiva para controlar contaminantes biológicos en las tuberías de distribución.

**Adsorción:** Contaminantes orgánicos, colorante no deseado y compuestos que causan sabor y olor se pueden pegar a la superficie de un carbón activado en polvo o granulado y así se eliminan del agua de tomar.

**Intercambio de Iones:** El proceso de Intercambio de iones se usa para extraer contaminantes inorgánicos si no se pueden extraer adecuadamente por filtración o sedimentación. El intercambio de iones puede ser utilizado para tratar el agua dura. También se utiliza para extraer arsénico, exceso de fluoruro, nitratos, radio y uranio.

**Filtración:** Muchos planteles de procesos de tratamiento de agua usan la filtración para extraer todas las partículas del agua. Esas partículas incluyen masillas y limo, materia natural orgánica, precipita otros procesos en el plantel, hierro y manganeso y microorganismos. La Filtración clarifica el agua y enaltece la efectividad de desinfección.

**Floculación/Sedimentación:** Floculación se refiere a un proceso de tratamiento de agua que combina o coagula partículas pequeñas, que se asientan en el agua como sedimento. El Alum y las sales de hierro o polímeros sintéticos orgánicos (usados solos o en combinación con sales de metal) se usan generalmente para promover la coagulación. Asentamiento ó sedimentación ocurre naturalmente como partículas floculadas que se asientan fuera del agua.

**Ozono:** La calidad de la desinfección con ozono es mejor que la conseguida con el cloro, debido al gran poder oxidante del ozono. Con el ozono se consigue eliminar virus, bacterias y microorganismos que son resistentes al cloro. Además actúa con gran rapidez por lo que en pocos segundos se pueden realizar tratamientos muy efectivos

**Filtros de carbón activado:** Se hace pasar el agua a través de un filtro con carbón activado, en bloque o granular. Es uno de los sistemas de tratamientos de agua muy eficientes para eliminar el cloro, mal olor y sabor del agua y también puede eliminar sólidos pesados.

**Osmosis inversa:** La ósmosis inversa está basada en la aplicación de una presión sobre una disolución concentrada para que el mismo pase a través de unas membranas. Al efectuarse ese proceso la mayor parte de las sales disueltas quedan retenidas y conseguiremos un agua con una menor concentración salina. (GOMEZ BERNAL, 2011)

## **La calidad microbiológica del agua embotellada**

El agua embotellada puede ser cualquier fuente de agua potable que recibe tratamientos físicos y químicos, y que está libre de agentes infecciosos. Como cualquier otro producto alimenticio, debe ser procesada, empacada y almacenada de manera sanitaria y libre de contaminación. Además de su consumo básico, ésta puede ser utilizada para la preparación de fórmulas infantiles, para reconstituir alimentos en hospitales, o además, para la limpieza de lentes de contacto, limpieza de heridas y el llenado de los humidificadores del ambiente. Como casi todos los productos alimenticios, el agua embotellada no es un producto libre de microorganismos, específicamente de bacterias que se encuentra en forma natural en los suministros de agua.

Se tiene la percepción de que una vez que el agua es embotellada, el producto es estéril, pero en realidad, el agua que es usada para envasado puede contener grandes cantidades de bacterias, que en ocasiones exceden los límites permitidos, las cuales se originan antes, durante y después del envasado y vida de anaquel. Además, las prácticas higiénicas deficientes del personal que participa en el procesamiento del agua, o el manejo inadecuado de los envases, dan como resultado un producto final de mala calidad.

Las fuentes de agua generalmente contienen una microflora muy variada, que incluyen las siguientes especies: *Achromobacter spp.*, *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Alcaligenes spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Cytophaga spp.*, *Moraxella spp.*, *Pseudomonas spp.*, Estas bacterias se encuentran en pequeñas cantidades, pero pueden multiplicarse rápidamente durante el envasado, almacenamiento y distribución del agua. Existe mucha controversia sobre el efecto que pueda causar la microflora del agua para consumo humano. La mayoría de estos organismos no son patogénicos en condiciones normales, pero han sido responsables de infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados, niños ancianos e inmunodeprimidos.

Algunas empresas productoras de agua envasada utilizan agua potable de la red como fuente principal, y las bacterias que residen en el agua pueden aparecer en el producto final

una vez que el agua es procesada. Si no se toman en cuenta las medidas sanitarias (HACCP).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) sugiere que la cuenta total bacteriana no debe exceder 500 UFC/ml, principalmente por la interferencia en la detección de coliformes. De acuerdo a las leyes mexicanas, el agua embotellada no debe contener más de 100 UFC/ml de CTB. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que el agua debe estar libre de *Pseudomonas aeruginosa*, debido a la vulnerabilidad que presentan niños y personas de la tercera edad a esta bacteria. (Chaidez Quiroz, 2002)

### **Pseudomonas en el agua envasadas**

Las personas consideran que el agua envasada está libre de microorganismos y es apta en cualquier condición para su consumo. Día a día se vende a través de la publicidad alrededor del mundo, que esta agua es totalmente libre de impurezas y absolutamente inocua. Generalmente se evalúa el contenido de bacterias en el agua envasada en botellas y bolsas únicamente en base al contenido de coliformes.

Después del embotellado, la cuenta bacteriana en el contenedor aumenta rápidamente gracias al contenido de materia orgánica en el agua. Este aumento tiende a ser mayor en aguas no carbonatadas y en contenedores plásticos. Entre las bacterias predominantes se encuentra el género *Pseudomonas*, algunas de las cuales son conocidas como oportunistas. Su presencia en estas aguas indica una contaminación en el proceso.

### **Descripción general de *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es una especie de bacilo recto o ligeramente curvado, que miden de 0,5 a 0,8  $\mu\text{m}$  x 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ , gramnegativos perteneciente a la rama  $\gamma$  de las proteobacterias, misma a la que pertenecen las enterobacterias (Woese, 1987), oxidasa positiva, aerobios estrictos, aunque en algunos

casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Además produce amoniaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. Los miembros de este género generalmente son móviles por un flagelo polar, catalasa positiva y no forman esporas. Algunas especies sintetizan una cápsula de exopolisacárido que facilita la adhesión celular, la formación de biofilm o biopelículas que los protege de la fagocitosis de los anticuerpos o del complemento, propiedad que le confiere un aumento en su patogenicidad.

Los microorganismos de esta especie son ubicuos en el ambiente. Su presencia es común en suelos y en agua naturales como lagos y ríos en concentraciones desde 10/100 ml hasta > 1 000/100 ml, sin embargo, no es frecuente en agua potable y se detecta en ella en bajas concentraciones. Esta especie sobrevive en agua destilada y agua desionizada, además, puede encontrarse tanto en ambientes oligotróficos como en ambientes con alto número de nutrientes, como en aguas residuales.

Dentro del género *Pseudomonas* se encuentran también algunas otras especies como *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. alcaligenes*. *P. aeruginosa* se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza (Huber Publisher, Berna, & Suiza, 1980), se puede aislar de muestras de suelo, aguas, aguas de piscinas contaminadas, así como de plantas y animales. Todas las cepas son potencialmente patógenas para el hombre y algunas pueden infectar también a plantas como *Arabidopsis thaliana* (Rhame, y otros, 1997), y a invertebrados como *Caenorhabditis elegans* (Tan & Ausubel, 2000). Esta bacteria es capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustrato para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos en los que son escasos los nutrimentos que otros organismos pueden asimilar. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón (Hardalo & SC Edberg, 1997).

Contrariamente a lo que parece, todos nosotros estamos en contacto diariamente con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que se encuentra en bajas cantidades en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de esta bacteria a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de personas sanas (Hardalo & SC Edberg, 1997), lo que nos muestra que

nuestro contacto con esta bacteria es cotidiano y sólo representa una amenaza para nuestra salud en condiciones especiales.

### **Estructura del genoma**

Recientemente se concluyó la secuencia completa del genoma de la cepa PAO1, que es la cepa tipo de *P. aeruginosa* y que fue aislada de un paciente con otitis media. Esta secuencia ya se encuentra disponible en el internet ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) y su análisis fue recientemente publicado. El tamaño aproximado del único cromosoma circular que forma el genoma de esta bacteria es de cerca de 6.3 millones de pares de bases, con mucho el de mayor tamaño de los genomas de bacterias secuenciados hasta ahora. Esta cepa, al igual que muchos otros aislamientos de *P. aeruginosa*, no contiene plásmidos.

Más de la mitad de los genes de *P. aeruginosa* PAO1 presentan una homología cercana y un arreglo transcripcional en operones similar a los de *Escherichia coli*. También es aparente que *P. aeruginosa* presenta homología en la secuencia y en la organización genética con bacterias ambientales, incluso con bacterias Gram-positivas. El 32% de los genes predichos a partir de la secuencia del genoma de esta bacteria no tienen homología con las secuencias depositadas en los bancos de datos, lo que sugiere que se trata de genes que codifican para actividades enzimáticas novedosas. Del análisis del genoma de esta bacteria es notoria la gran abundancia de genes que parecen codificar para bombas que sacan compuestos de la célula (Stover, y otros). La abundancia de estos transportadores pudiera estar relacionada con su alta resistencia a distintos compuestos tóxicos (Nikaido) y, en última instancia, con su extraordinaria versatilidad.

### **Variabilidad genética**

Contrariamente a lo que ocurre con otras bacterias patógenas, no existen clones de *P. aeruginosa* asociadas con el desarrollo de una enfermedad, por lo que la frecuencia de las distintas clones es la misma entre los aislamientos ambientales y clínicos. Esto es, en una determinada región geográfica se encuentra que la frecuencia con la que se aísla una cepa

es la misma si se muestrean hospitales, pacientes con distinto tipo de infecciones o se toman muestras ambientales (Römling, 1994). Sin embargo existe una gran variabilidad genética entre distintos aislamientos de esta bacteria aún aislada en la misma región. Esta variabilidad tiene características muy particulares (Kiewitz, 2000), como a continuación veremos. El tamaño del genoma de distintas cepas de *P. aeruginosa* varía entre 5 y 7 millones de pares de bases, y comprende un mosaico de genes específicos de la especie que va del 70 al 90% de la secuencia de DNA de una cepa. Esta proporción varía de acuerdo con la cantidad de información accesoría que cada cepa tiene, pero el orden de los genes propios de la especie está conservado entre todos los aislamientos. Estos bloques de DNA se interrumpen por secuencias específicas de cada cepa que pueden ser de entre 1 a 200 kb. La secuencia de los genes comunes está altamente conservada entre los distintos aislamientos de esta bacteria, a excepción del gen *pilA* que codifica para la fimbria tipo IV y que presenta un gran polimorfismo. De hecho la variabilidad de las secuencias específicas de *P. aeruginosa* es 10 veces menor que la que presentan distintas cepas de *E. coli* o *Salmonella*, lo que sugiere una alta tasa de recombinación entre la población de esta bacteria. La alta frecuencia de recombinación entre las distintas clonas, comparada con la menor tasa de mutación espontánea, mantiene una información genética común a toda la especie. De este modo, *P. aeruginosa* tiene una parte de su genoma altamente conservada y una proporción menor, pero significativa, que es distinta en cada clona de esta bacteria. La alta conservación entre cepas de la mayor parte del genoma de *P. aeruginosa*, asociada a la presencia de genes de clon específico, podría explicar la capacidad de esta bacteria de colonizar tan diversos nichos y de utilizar como sustrato una gran variedad de compuesto. En un determinado nicho ecológico toda la población bacteriana puede explotar toda la información genética propia de la especie y, al mismo tiempo, cada clona contiene secuencias propias que son blanco de una acelerada evolución genética.

## Determinantes de patogenicidad

- ❖ **Adhesinas:** Las adhesinas son, por lo general, lectinas (proteínas que tienen afinidad por los azúcares) y su función es la adherencia. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas. En algunos casos, la fimbria posee dos o más adhesinas distintas para dos o más receptores diferentes y se les llama adhesinas fimbriales. Las adhesinas que no están en fimbrias son denominadas adhesinas afimbriales. (UNAM, 2014).

La *P. aeruginosa* tiene como adhesinas a los pili, que se adhieren a la superficie epitelial (receptores aGM1) produciendo la liberación de IL-8 y neuraminidasa que a su vez altera al ácido siálico de la superficie celular y facilita nuevos receptores a GM1. Otras adhesinas no pilosas son las hemaglutininas, exotoxinas X, exopolisacárido mucoide y otras, que se adhieren a las mucinas e interaccionan con las células fagocíticas. (Salcedo Posadas & García Novo, 1998).

- ❖ **Endotoxinas:** La endotoxina o lipopolisacárido (LPS) corresponde a la membrana externa de las bacterias Gram-negativas. La porción lipídica (lípidio A) está embebido en la membrana externa con el Core, las porciones del antígeno "O" se extienden hacia afuera de la superficie de la bacteria. El lípidio A es la porción tóxica de la molécula, ejerce su efecto solamente cuando la bacteria se lisa. La lisis ocurre como resultado del efecto del complejo de ataque a membrana o por el complemento, ingestión y destrucción por fagocitos o la muerte por ciertos tipos de antibióticos.

Esta endotoxina o lípidio A está formada por ácidos grasos de cadena larga y fosfato, unidos a un disacárido de glucosamina. Aunque hay pequeñas variaciones en esta composición en las distintas especies de Gram-negativas, los efectos biológicos de todas las endotoxinas son idénticos:

- Fiebre.
- Leucopenia y después leucitosis.
- Activación del complemento.
- Mitogenicidad (activación policlonal de linfocitos).
- Síntesis de citosinas como interferón, TNF, 1-IL, 6-IL e 8-IL.
- Síntesis de prostaglandinas.

- Hipotermia.
- Necrosis de médula ósea.
- Hipotensión.
- Coagulación diseminada.
- Shock endotóxico.

Algunos de estos efectos (la activación del complemento y la síntesis de citosinas), en su justa medida, ayudan a controlar la infección, pero cuando se liberan muchas moléculas de endotoxina simultáneamente son muy perjudiciales para los órganos del huésped y pueden provocar la muerte por shock. Normalmente la endotoxina forma parte de la pared y sus efectos tóxicos aparecen cuando se libera.

- ❖ **Citotóxica:** Las bacterias producen una variedad de citotóxicas que difieren en: estructura, modo de acción, y blancos eucarióticos. Los cuales son proteínas que funcionan como reguladores maestros o exhiben funciones celulares vitales. Como las GTPasa Rho, que son blancos de citotóxicas. Muchas citotóxicas son enzimas, estas modifican los blancos eucariotes de manera catalítica, lo cual es responsable de su alta toxicidad. Las toxinas catalizan reacciones casi irreversibles, cuyo equilibrio favorece la modificación del blanco. Sin embargo, datos recientes indican que la modificación unilateral definitiva de los blancos no responde a los requerimientos de los patógenos. Por lo tanto algunas bacterias como la *P. aeruginosa* han desarrollado mecanismos para modular de manera reversible las proteínas blanco y funciones de los reguladores eucariontes. (Rocha García, Lozano Zaráin, & Martínez Laguna, 2006)
- ❖ **Exotoxina A:** Es una exotoxina producida por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. La exotoxina al factor de elongación-2 (EF2), como resultado se inhibe la síntesis de proteínas. La inhibición ocurre por la ADP ribosilación del EF2 y detiene la elongación durante la producción de las proteínas. Este mecanismo es igual al de la toxina diftérica.
- ❖ **Proteasas:** Producen necrosis en piel, pulmón, córnea, además de la inactivación proteolítica del interferón gamma humano y del factor de necrosis tumoral (TNF).

- ❖ **Elastasa:** La elastasa es una enzima encargada de la degradación de las fibras elásticas. En la etapa de invasión a los tejidos *P. aeruginosa* produce y excreta toxinas que le permiten implantarse como es la elastasa (Horii, Muramatsu, Monji, & Miyagishima, 2005), la cual es una metaloproteasa que degrada la elastina, el colágeno, Ig A, Ig G y la fibronectina, para exponer receptores al ataque bacteriano en la mucosa de los pulmones donde interfiere en la función ciliar en infecciones crónicas (Sokol, Kooi, Hodges, Cachia, & Woods, 2000). Asociada a la alta densidad de crecimiento bacteriano se ha demostrado que también degrada la transferrina y libera hierro al medio el cual puede generar radicales hidroxilos en el sitio de la infección y contribuir al daño tisular. Junto con la elastasa, la proteasa alcalina destruye estructuras compuestas por fibrinas y elastina; se reporta que inactiva el interferón  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Krunkosky, Maruo, Potempa, Jarrett, & Travis, 2005).
  
- ❖ **Antígenos:** Presenta tres tipos de antígenos O, H y M (somático, flagelar y mucoide).
  
- ❖ **Exoenzima S:** También es una enzima muy virulenta que media la fijación bacteriana a las células del huésped y actúa como inmunosupresora.
  
- ❖ **Bacteriocinas:** Son definidas como proteínas biológicamente activas contra miembros de la misma especie o especies muy relacionadas a la cepa productora. Las colicinas y las microcinas son las bacteriocinas de bacterias Gram-negativas más reportadas.
  
- ❖ **Pigmentos:** piocianina, pioverdina, piorrubina, fluoresceína, que poseen acción bactericida.

## Patogénesis

*P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y posee una virulencia particular. El microorganismo por lo común requiere de una alteración significativa en las líneas de defensa primarias (p. ej., una herida) o una vía para esquivarlas (p. ej., una solución contaminada o una sonda endotraqueal) para iniciar la infección. La unión a las células epiteliales es el primer paso en la infección y probablemente esté mediada por pilosidades, flagelos y una cubierta de polisacáridos extracelulares. Los receptores incluyen ácido siálico y N-acetilglucosamina que se originan en los glucolípidos de la superficie celular. La unión es favorecida por la pérdida de fibronectina de superficie, lo que explica en parte la propensión en personas debilitadas.

La importancia de ExoA se apoya en estudios en humanos y animales, que correlacionan su presencia con malos resultados y la presencia de anticuerpos contra ésta, con supervivencia. El efecto de ExoA no es inmediato, porque diversos factores se activan a través de un sistema sensor en el cual varios productos químicos (lactonas, quinolonas) producen señales de célula a célula. Cuando la población de *P. aeruginosa* alcanza cierto umbral, la señal favorece la traducción del gen de citotoxina y la toxina se secreta por toda la población al mismo tiempo. No se ha encontrado con ExoA un efecto sistémico similar al que se observa con la toxina diftérica, pero su acción se correlaciona con la invasión primaria y lesiones destructivas locales que se observan en las infecciones por *P. aeruginosa*.

La elastasa y fosfolipasa desdoblan proteínas y lípidos, respectivamente, lo que permite que el microorganismo adquiera nutrientes del huésped y se disemine a partir del sitio local. Muchos sustratos de importancia biológica de elastasa hacen evidente su importancia, en particular el que le da su nombre, elastina. La elastina se encuentra en algunos sitios con ataque preferente por *P. aeruginosa*, como los pulmones y vasos sanguíneos. La destrucción hemorrágica incluye las paredes vasculares, característica histológica distintiva de la infección por *Pseudomonas*. La disfunción intracelular causada por ExoS y por otros factores inyectados por un sistema de secreción inicia inmediatamente después del contacto

con la célula del hospedador. ExoS se asocia con diseminación a partir heridas de quemaduras y con acciones de destrucción de las células, lo que incluye su acción sobre el citoesqueleto. El pigmento azulado, piocianina, se ha detectado en lesiones en seres humanos y parece tener efectos tóxicos en la función de las células ciliares respiratorias.

### **Manifestaciones clínicas**

*Pseudomonas aeruginosa* puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario.

Infecciones respiratorias, en pacientes hospitalizados graves, politraumatizados, con procesos crónicos o fibrosis quística.

Las infecciones del tracto respiratorio inferior por *Pseudomonas aeruginosa* se observan casi exclusivamente en personas con afectación de los sistemas de defensa locales, del aparato respiratorio o sistémico.

La infección crónica por *P. aeruginosa* está presente en el 24–33% de los pacientes con bronquiectasias y se asocia a una función pulmonar peor y una frecuencia mayor de hospitalización. (Silver, Cohen, & Weinberg, 1992)

- ❖ Infecciones urinarias oportunistas, en enfermos portadores de catéteres o secundarias a exploraciones de las vías urinarias.

- ❖ Infecciones osteoarticulares en traumatismos penetrantes o procedimientos quirúrgicos.
- ❖ Infecciones oculares y óticas como queratitis bacteriana y otitis externa crónica.
- ❖ Infecciones de la piel como exantema vesiculo-papuloso o infección de quemaduras.
- ❖ Sepsis: el 10-20% de las producidas por bacilos Gram negativos tienen ésta etiología. En algunos casos, aparece ectima gangrenosa como complicación de ésta infección.
- ❖ Endocarditis: frecuente en ADVP y se localiza preferentemente en la válvula tricúspide.
- ❖ Meningitis: se producen con poca frecuencia, generalmente en intervenciones de neurocirugía.

### **Epidemiología**

El hábitat primario de *P. aeruginosa* es el medio ambiente. Se encuentra en agua, tierra y diversos tipos de vegetación en todo el mundo. *P. aeruginosa* se ha aislado de faringe y heces en 2 a 10% de las personas sanas. Las tasas de colonización son mucho más elevadas en individuos hospitalizados. La infección con *P. aeruginosa* es poco común en personas previamente sanas y es una de las causas más importantes de infección invasora en pacientes hospitalizados con enfermedades subyacentes graves como leucemia, fibrosis quística y quemaduras extensas. (Ver figura 2)

La capacidad de *P. aeruginosa* para sobrevivir y proliferar en agua con escasos nutrientes puede conducir a una gran contaminación de líquidos no estériles, como en ciertos humidificadores de respiradores mecánicos. La inhalación de aerosoles de tales orígenes puede evitar los mecanismos de defensa normales del aparato respiratorio e iniciar una infección pulmonar. Las infecciones han sido consecuencia de la proliferación de Pseudomonas en medicamentos, solución de lentes de contacto e incluso en algunos desinfectantes. Los fregaderos y grifos pueden estar muy contaminados y actuar como fuente ambiental para la contaminación de otros objetos. La presencia de *P. aeruginosa* en agua para consumo o en alimentos no es una causa de alarma si se encuentra en cantidad normal. El riesgo estriba en la presencia de la misma en cantidades que excedan el límite permitido y entre los objetos susceptibles de contaminación y las personas que están predisuestas para la infección.

*P. aeruginosa* es el patógeno bacteriano más común que complica el tratamiento de pacientes con fibrosis quística, trastorno hereditario en el transporte de iones cloruro que ocasiona la producción de moco viscoso en los conductos y en el árbol traqueo-bronquial. En un alto porcentaje de los casos, el aparato respiratorio es colonizado con *P. aeruginosa*, que una vez que se ha establecido, es prácticamente imposible de erradicar. Esta infección es la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. (Ahmad, Plorde, & Lawrence Drew, 2010)

### **Relevancia de su presencia en aguas de consumo**

Aunque la presencia de *P. aeruginosa* puede ser significativa en algunos entornos como en centros sanitarios, no hay evidencia de que los usos normales del agua de consumo sean una fuente de infección para la población general. No obstante, puede asociarse la presencia de altas concentraciones de *P. aeruginosa* en el agua potable, especialmente en el agua envasada, con quejas sobre su sabor, olor y turbidez. *Pseudomonas aeruginosa* es sensible a la desinfección, por lo que una desinfección adecuada puede minimizar su entrada en los sistemas de distribución. Las medidas de control diseñadas para limitar la formación de biopelículas, como el tratamiento para optimizar la eliminación del carbono orgánico, la restricción del tiempo de residencia del agua en los sistemas de distribución y el mantenimiento de concentraciones residuales de desinfectantes, deberían reducir la proliferación de estos microorganismos.

### **Heterótrofos**

Los organismos *heterótrofos* o consumidores son todos aquellos que no pueden fabricar sus propios alimentos. No pueden aprovechar la energía luminosa y no pueden sintetizar los nutrientes orgánicos y necesitan consumirlos de los tejidos de los productores o de otros consumidores. (Campos-Bedolla, y otros, 2003)

## **Características generales**

Utilizan la materia orgánica que obtienen del medio para obtener energía. La molécula más utilizada para obtener energía es la glucosa que es sometida a diversas reacciones químicas de oxidación en el interior celular, hasta que es degradada completamente y transformada en dióxido de carbono. (Morales, 2010)

### **Clasificación según fuente de carbono**

Heterótrofos: Requieren uno o más compuestos orgánicos como fuente de carbono.

Autótrofos: Utilizan el CO<sub>2</sub> como fuente de carbono.

### **Clasificación según fuente de energía**

Quimiorganótrofos: obtienen energía de compuestos orgánicos.

Quimiolitótrofos: obtienen energía a partir de compuestos inorgánicos.

Fotótrofos: fuente de energía es la luz.

### **Clasificación según aceptor final de electrones**

Aerobios: Aceptor final de electrones es el Oxígeno.

Anaerobio: Aceptor final de electrones es cualquier compuesto diferente al oxígeno ya sea orgánico o inorgánico.

Anaerobio Facultativo: Dependiendo de las condiciones puede desarrollar cualquiera de los dos metabolismos.

## **Métodos para su detección**

La cuenta de bacterias totales de un sistema se refiere a las bacterias heterótrofas presentes, es decir, aquellas que obtienen su fuente de carbono a partir de compuestos orgánicos. En este grupo de bacterias se puede encontrar la gran mayoría de la población microbiana del ambiente. Los medios usados para la cuenta de un amplio número de bacterias en el suelo, sedimento, agua, aguas residuales o composta pueden ser complejos en su formulación

(incluyendo peptona o extractos de carne o de levadura), pero relativamente escasos en su composición. (Lorch H. J., 1995)

### **Valor como indicador**

El análisis tiene poco valor como índice de la presencia de microorganismos patógenos, pero puede utilizarse en el monitoreo operativo como indicador de tratamiento y desinfección del agua, con el objetivo de mantener los recuentos en los valores más bajos que sea posible. Los recuentos de heterótrofos en placa también se pueden usar para evaluar la limpieza e integridad de los sistemas de distribución, así como la presencia de biopelículas.

### **Fuentes y prevalencia**

Son microorganismos heterótrofos tanto los microorganismos, normalmente inoos, que forman parte de la microflora natural de los medios acuáticos como los microorganismos presentes en diversas fuentes de contaminación. Son abundantes en fuentes de agua bruta. Los microorganismos concretos que detectan los RHP varían mucho de unos lugares a otros y entre muestras consecutivas. Algunos procesos de tratamiento del agua de consumo, como la coagulación y la sedimentación, reducen la concentración de microorganismos detectados mediante RHP del agua. Sin embargo, otros tratamientos, como la filtración en arena o en carbono bioactivo, sustentan la proliferación de estos microorganismos. Los microorganismos detectados mediante RHP disminuyen significativamente con los tratamientos de desinfección, como la cloración, la ozonización y la irradiación con luz UV. Sin embargo, en la práctica, ninguno de los procesos de desinfección esteriliza el agua, y los microorganismos detectados mediante RHP pueden proliferar con rapidez en condiciones adecuadas, como la ausencia de concentraciones residuales de desinfectantes.

Los microorganismos detectados mediante RHP pueden proliferar tanto en el agua como en superficies que están en contacto con el agua, como las biopelículas. Los factores principales que favorecen la proliferación o re proliferación son la temperatura, la

disponibilidad de nutrientes (incluido el carbono orgánico asimilable), la ausencia de concentraciones residuales de desinfectantes y el estancamiento del agua.

### **Relevancia de su presencia en el agua de consumo**

Después de la desinfección, cabe esperar que los RHP sean bajos; no obstante, para la mayoría de los usos de los RHP, los resultados concretos son menos importantes que sus variaciones en lugares determinados. En los sistemas de distribución, un aumento de los RHP puede indicar un deterioro de la limpieza, posiblemente la existencia de agua estancada, y el posible desarrollo de biopelículas. Entre los microorganismos detectados mediante RHP puede haber agentes patógenos potencialmente oportunistas como *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Moraxella*, *Serratia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Sin embargo, no se ha demostrado que ninguno de estos microorganismos esté asociado a infecciones del aparato digestivo en la población general por la ingestión de agua de consumo. (Ashbolt, Grabow, & Snozzi, 2001)

### **Recuentos de heterótrofos en placa**

El RHP detecta un amplio espectro de microorganismos heterótrofos, incluidas bacterias y hongos, basándose en la capacidad de estos microorganismos de crecer en medios ricos en nutrientes, sin agentes selectivos ni inhibidores, durante un periodo de incubación especificado y a una temperatura definida. El espectro de microorganismos detectados mediante este tipo de análisis incluye microorganismos sensibles a los procesos de desinfección, como las bacterias coliformes; microorganismos resistentes a la desinfección, como los esporulantes, y microorganismos que proliferan con rapidez en el agua tratada en ausencia de concentraciones residuales de desinfectantes. Los análisis detectan únicamente una pequeña proporción de los microorganismos presentes en el agua y la población recuperada será diferente según el método y las condiciones que se apliquen. Aunque se han desarrollado métodos normalizados, no existe un método universal y único de medición del RHP: existen diversos medios de cultivo, se utilizan diversas temperaturas de incubación, de 20 °C a 37 °C, y los periodos de incubación varían desde unas pocas horas hasta siete días o más.

## Aplicaciones

El recuento de heterótrofos placa , antes conocido como el recuento en placa estándar, es un procedimiento para estimar el número de bacterias heterótrofas en vivo en el agua y la medición de los cambios durante el tratamiento y distribución de agua o en las piscinas. Las colonias pueden surgir a partir de pares, cadenas, racimo, o células individuales, todos los cuales se incluyen en el término "unidades formadoras de colonias (UFC)". El recuento final también depende de la interacción entre las colonias en desarrollo; elegir que el mayor número de colonias dentro del tiempo de incubación designado. Para comparar los datos, utilice el mismo procedimiento y medio. Se describen tres métodos diferentes y cuatro medios diferentes.

### Selección del método

- *Vertido en placa:* El método de placa vertida puede acomodar volumen de muestra o muestra diluida que van de 0,1 a 2,0 ml. Las colonias producidas son relativamente pequeñas y compactas, que muestra menos tendencia a invadir y unos a otros que los producidos por el crecimiento de superficie. Por otro lado, las colonias sumergidas a menudo son de crecimiento más lento y son difíciles de transferir. Un baño de agua controlado por termostato es esencial para templar el agar ya que el contacto del medio con la muestra puede ocurrir un choque térmico y eliminar a las bacterias.
- *Esparcido en placa:* El método de esparcido en placa no causa choque térmico y todas las colonias están en la superficie del agar en el que se pueden distinguir fácilmente de las partículas y burbujas. Las colonias se pueden transferir rápidamente, y la morfología de la colonia se pueden discernir fácilmente, y se comparan con las descripciones. Sin embargo, este método está limitada por el pequeño volumen de muestra o muestra diluida que puede ser absorbido por el agar: 0,1 a 0,5 ml, dependiendo del grado en que se han secado las placas pre vertido. Para utilizar este procedimiento se debe mantener un suministro adecuado de pre secado, placas de agar absorbentes.

- *Método de filtro de membrana:* El método de filtro de membrana permite pruebas de grandes volúmenes de agua de baja turbidez y es el método de elección para el agua bajo recuento (<1 a 10 UFC / ml). Este método no produce ningún choque térmico, pero añade el gasto del filtro de membrana. Otras desventajas incluyen el área más pequeña de pantalla, la necesidad de detectar colonias por la luz reflejada sobre un fondo blanco si los filtros de colores o manchas de contraste no se utilizan, posible daño a las células por las presiones de filtración excesiva, y las posibles variaciones en la calidad del filtro de membrana. (American Public Health Association, 2005)

## PROCEDIMIENTOS

### Detección de *Pseudomona aeruginosa*

#### Número más probable

**Prueba presuntiva:** Se inoculan volúmenes de 10 ml de muestra en cada uno de 5 tubos que contienen caldo Asparagina, doble concentración, volúmenes de 1 y 0.1 ml en cada uno de 5 tubos con caldo Asparagina concentración sencilla respectivamente. Se mezclan suavemente. Otra opción es utilizar la serie de 10 tubos en los que se inoculan 10 ml en cada uno. Se incuban a 35 -37°C. Después de 24 horas, examine los tubos con lámpara ultravioleta de onda larga, en un cuarto oscuro, a fin de observar la aparición de un pigmento fluorescente verde. En caso de no observar fluorescencia se reincuban por 48 horas o más.

**Prueba confirmatoria:** De cada tubo positivo de la prueba anterior, se transfieren una asada o 0.1 ml del cultivo a un tubo de agar Acetamida sobre la superficie del agar (en bisel). Se incuban a 35 – 37°C durante 24 – 48 horas. Finalizado el período de incubación se consideran como tubos positivos en la prueba confirmatoria, aquellos donde se observa la aparición de fluorescencia. Se cuenta el número de tubos positivos obtenidos y el resultado se lleva a las tablas de número más probable que corresponda.

Expresión de los resultados:

El resultado se expresa como número más probable de Pseudomonas aeruginosa por 100 ml de muestra. En caso de que todos los tubos sean negativos, el resultado se expresa como “menos de 1.8 o menos de 1,1”, según hayan utilizado 5 a 10 tubos respectivamente. En caso de que todos los tubos sean positivos, el resultado se expresa como “más de 1600 o más de 23000”, según se hayan inoculado 5 o 10 tubos respectivamente. El resultado según el número de tubos positivos.

### **Medios de cultivo utilizado para el método NMP para Pseudomona aeruginosa.**

Caldo de Asparagina: este medio puede no estar disponible en forma deshidratada y puede requerir la preparación de los ingredientes básicos. Ajustar el pH a 6.9 a 7.2 antes de la esterilización

Fundamento: Hay que elaboran fluoresceína sin piocianina, otras elaboran sólo piocianina y otras que elaboran las dos. Se trata de un medio que potencia la producción de fluoresceína e inhibe la de piocianina. El colorante se difunde en el medio dando una coloración amarilla fluorescente.

Caldo Acetamida: Este medio puede no estar disponible en forma deshidratada y puede requerir la preparación de los ingredientes básicos.

Fundamento: La Acetamida actúa como elemento inhibidor de una amplia variedad de microorganismos, de tal manera que no inhibe el crecimiento de las Pseudomonas aeruginosa aunque sí lo hace sobre otras especies de Pseudomonas. Su acción tensioactiva produce la liberación del fósforo y del nitrógeno a las células bacterianas distintas de Pseudomonas aeruginosa. El Magnesio Sulfato y el Potasio Sulfato favorecen la producción de piocianina que cambia al medio a una coloración azul verdoso o marrón. El ácido nalidíxico aumenta la selectividad del medio inhibiendo posible flora acompañante (Proteus, Klebsiella, Providencia).

## **Confirmación de Pseudomonas aeruginosa a través de oxidasa y catalasa.**

Puesto que *Pseudomonas aeruginosa* es oxidasa y catalasa positiva se procedió a verificar con estas bioquímicas el microorganismo que se evidenció en la fase confirmatoria en agar Acetamida.

Oxidasa:

Fundamento: Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerófila, pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

Realización de la práctica: Utilizamos tiras de papel impregnadas con el reactivo para-amino-N-dimetil-anilina, que se oxida por la citocromo-oxidasa. El procedimiento consiste en impregnar la zona coloreada de la tira reactiva con una masa de bacterias. Se observa si en el transcurso de un minuto la zona impregnada vira a un color azul-violeta

Catalasa:

Fundamento: La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas.

Realización de la prueba: Utilizar una placa con el microorganismos crecido y en una zona donde haya bastante crecimiento añadir unas gotas de agua oxigenada y observar si en el transcurso de unos segundos se produce o no la aparición de burbujas. (Fernández Olmos, García de la Fuente, Saéz Nieto, & Valdezate Ramos, 2010)

### **Método vertido en placa para el recuento de aerobios heterótrofo (RHP).**

Se procedió a tomar 1 ml de la muestra y se trasvasó a un tubo de ensayo estéril que contenía 9 ml de agua peptonada al 0,1%, obteniéndose una dilución  $10^{-1}$ , repitiéndose el mismo procedimiento para obtener la dilución  $10^{-2}$ . El recuento de este grupo bacteriano se realizó siguiendo lo establecido en la norma COVENIN. Se sembró por inclusión y por duplicado 1mL del agua pura y sus diluciones, en placas de Petri, agregando agar Plate Count, para luego mezclar con movimientos circulares y dejándose solidificar. Las placas fueron incubadas a 35°C por 72 horas, luego se realizó el conteo a aquellas placas que representaban de 30-300 colonias, expresando los resultados en UFC/ml.

Medio PCA Fundamento: La composición de la media basada en la peptona de caseína como aportación nutritiva, el extracto de levadura como sustrato vitamínico y la glucosa como fuente energética, favorece el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos, sin precisar de otros aditivos.

## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

### **Tipo de estudio**

El tipo de estudio fue descriptivo de corte transversal.

### **Área de estudio**

El estudio se dio en diferentes puntos de ventas de Managua que distribuyen aguas envasadas en botellas y bolsas destinadas para consumo humano.

### **Universo y muestra**

El universo del estudio lo constituyeron todas las aguas envasadas en botellas y en bolsas que se distribuyen en la ciudad de Managua.

La muestra estuvo conformada por 50 unidades que corresponden a 5 muestras por cada una de las 10 marcas estudiadas.

### **Tipo de muestreo :**

Probabilístico por conveniencia

### **Criterios de inclusión:**

1. Sean aguas contenidas en botella y/o bolsas plásticas
2. Distribuidos en la ciudad de Managua
3. Que el producto pase por un proceso de purificación.

### **Técnicas**

En el proceso de obtención de la muestra nos dirigimos diferentes puntos de ventas de Managua en los cuales se distribuyen aguas envasadas para consumo de la población.

Se elaboró una ficha de recolección de datos para la obtención de la muestra donde se especificaba:

- Fecha de recolección
- Número de la muestra
- Número de Lote

- Fecha de Vencimiento
- Tipo de envase
- Fecha de procesado
- Tipo de agua
- Procesos de purificación:

Las muestras se procesaron en el área de aguas y alimentos del CNDR-MINSA con el fin de detectar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* por el método del número más probable, según “métodos estándar para el examen de agua y de aguas residuales. 21st edición”. Además se utilizaron las pruebas bioquímicas de oxidasa y catalasa para comprobar el diagnóstico de muestras positivas en la técnica de NMP.

Con el fin de evaluar la calidad del agua se aplicó el método de vertido en placa para el recuento de aerobios heterótrofo (RHP) según la norma COVENIN.

### **Limitaciones del estudio**

Una de las limitaciones en nuestro estudio fue el tiempo motivo por el cual no se agregó mayor cantidad de muestras al. Además por el mismo factor se dieron contratiempos en la preparación de materiales, tales como medios de cultivo necesarios para empezar nuestra investigación.

### **Redacción de la información**

El análisis estadístico se realizó en base a estadística descriptiva con tablas de contingencia. Para la elaboración se utilizó el paquete de office 2010, para realizar el trabajo escrito se utilizó Microsoft Office Word, Microsoft Office Excel para la elaboración de tablas y gráficos; PowerPoint para la presentación en la defensa de nuestra investigación.

### **Consideraciones éticas**

Para la realización de nuestro estudio en el área de Aguas y alimentos nos dirigimos al Dr. Ángel Balmaceda director del Centro Nacional de Referencia CNDR MINSA para solicitar su aprobación en la realización de nuestra investigación. Además de permitirnos ingresar a dicha área para el análisis de las muestras.

## **Instrumentos**

### Materiales

1. Tubos de ensayo con tapa de rosca de tamaño 150x 16 y 125 x 16.
2. pipetas descartables estériles de 0.1, 1.0, 10 ml
3. Gradillas
4. Placas Petri estériles 90 x 14 mm
5. Asa redonda no calibrada
6. Laminas portaobjetos

### Equipos

1. Vortex AX 681
2. Pipet-Aid XP
3. Incubadora Thermo cientif de 35°C

### Medios de cultivo

1. Caldo Asparagina
2. Agar cetrimide
3. Agua peptonada 0.1%
4. Agar PCA

## **Reactivos**

Peróxido de hidrogeno

Para- Amino-N –Dimetil Anilina

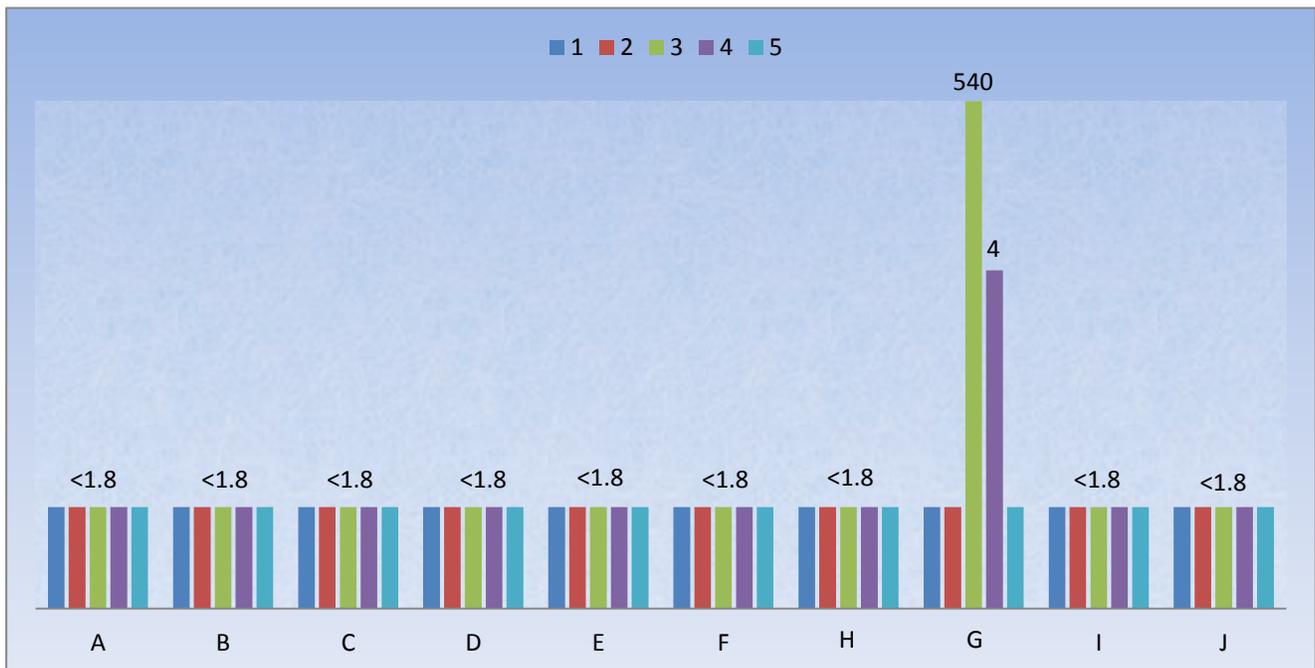
## VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Sub-Variable	Indicadores	Volares	Criterios
Método de Tubos Múltiples (NMP)		<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<1.8 NMP/100ml	Aceptable
			>1.8 NMP/100ml	No aceptable
Medios de Cultivos	Evaluar con cepas Control ATCC 27853	Asparagina	Positivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fluorescencia UV 395 nm
			Negativo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No hay reacción
		Acetamida	Positivo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Fluorescencia UV 395 nm
			Negativo para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No hay reacción
Pruebas Bioquímicas		Catalasa	Positivo	Formación de Burbujas
			Negativo	No hay Reacción
		Oxidasa	Positivo	Purpura Oscuro
			Negativo	No hay Reacción
Método de vertido en placa		Recuento de heterótrofos en placa	<100 UFC/ml	Aceptables
			>100 UFC/ml	No aceptables

## IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En el presente estudio se analizó por medio la técnica de número más probable para *Pseudomonas aeruginosa* descrita en Estándar método para el análisis de aguas y aguas residuales 21st edición, un total de 50 muestras de aguas envasadas, de las cuales 2 muestras de la marca denominada como G sobrepasaron los límites permisibles de esta técnica, una con 540 NMP/100ml y la otra con 4 NMP/100ml.

**Grafico N° 1. Resultados de la detección de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la técnica de número más probable (NMP)**

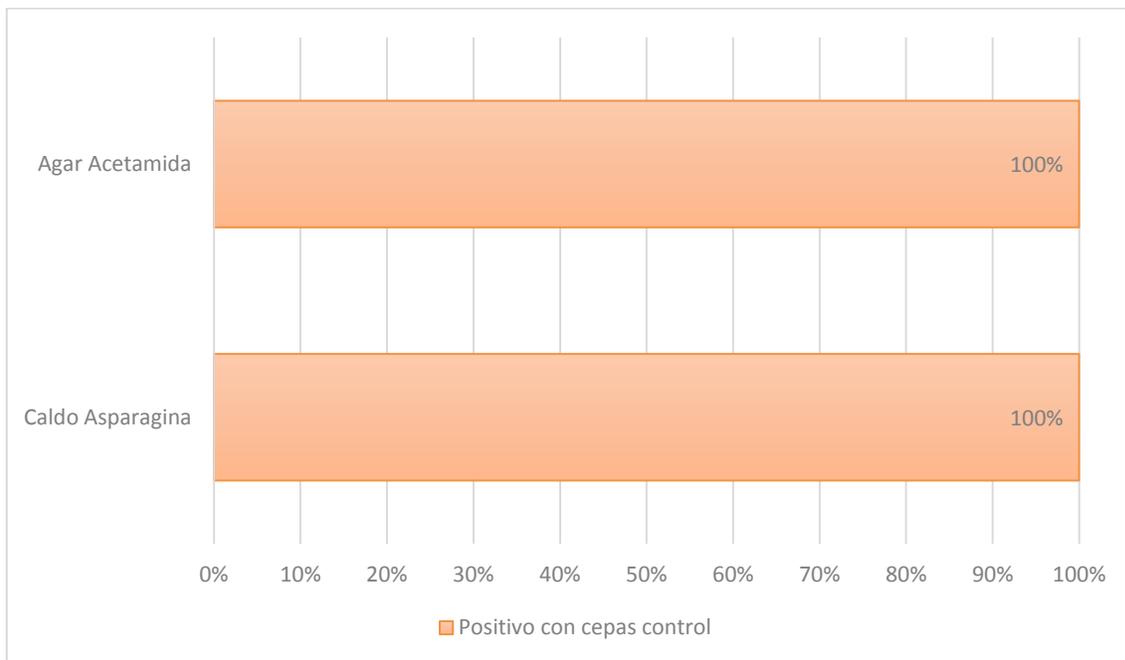


**Fuente:** tabla número 1

El agua envasada destinada para el consumo humano debe estar exenta de *P. aeruginosa*. Por lo anteriormente planteado, el hecho de que algunos autores señalen que ciertas especies de *Pseudomonas* se han aislado en el agua del enjuague final de máquinas lavadoras de botellas, advierte el riesgo de contaminación antes de ser llenadas y puestas en venta, pues su posterior multiplicación durante el almacenamiento, representa un peligro para los consumidores (Payares, Villasmil, Matos, Larreal, Barboza, & Levy, 2013).

La *P. aeruginosa* no se encuentra con frecuencia en el agua envasada, cuando esto ocurre generalmente es un indicador de la contaminación durante el proceso de envasado, mala aplicación de las Buenas Prácticas de Manufacturas (BPM), reactivos de desinfección ineficientes, y generalmente la presencia de este microorganismo está relacionado a su capacidad de formar biopelículas en los filtros de las maquinarias distribuidoras de aguas a las botellas.

### Gráfico N° 2: Verificación de la reacción de los medios de cultivos utilizados en el método de NMP



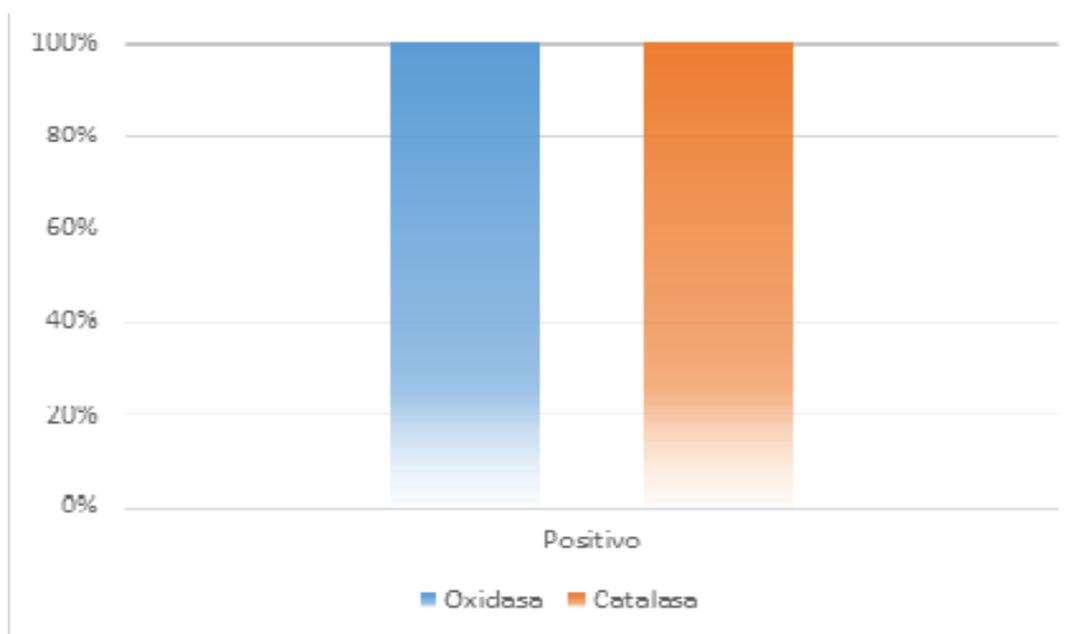
**Fuente:** tabla 2

Para poder brindar resultados de calidad y confiabilidad los medios de cultivos a utilizar fueron verificados antes de iniciar el procesamiento de las muestras, inoculando en ellos concentraciones de cepas ATCC 27853 de *Pseudomonas aeruginosa* en donde comprobaríamos si eran capaces de evidenciar al microorganismo, obteniendo como resultado que los medios Asparagina y Acetamida tienen la capacidad de un 100% para ayudarnos a identificar dicha bacteria.

En caldo Asparagina se observó turbidez, crecimiento y producción de Fluorescencia al exponerlo a luz UV de 395 nm, lo que evidenció la presencia del microorganismo.

En agar Acetamida la reacción que se evidencio fue la producción de fluoresceína que se comprobó con la exposición a luz UV de 395 nm.

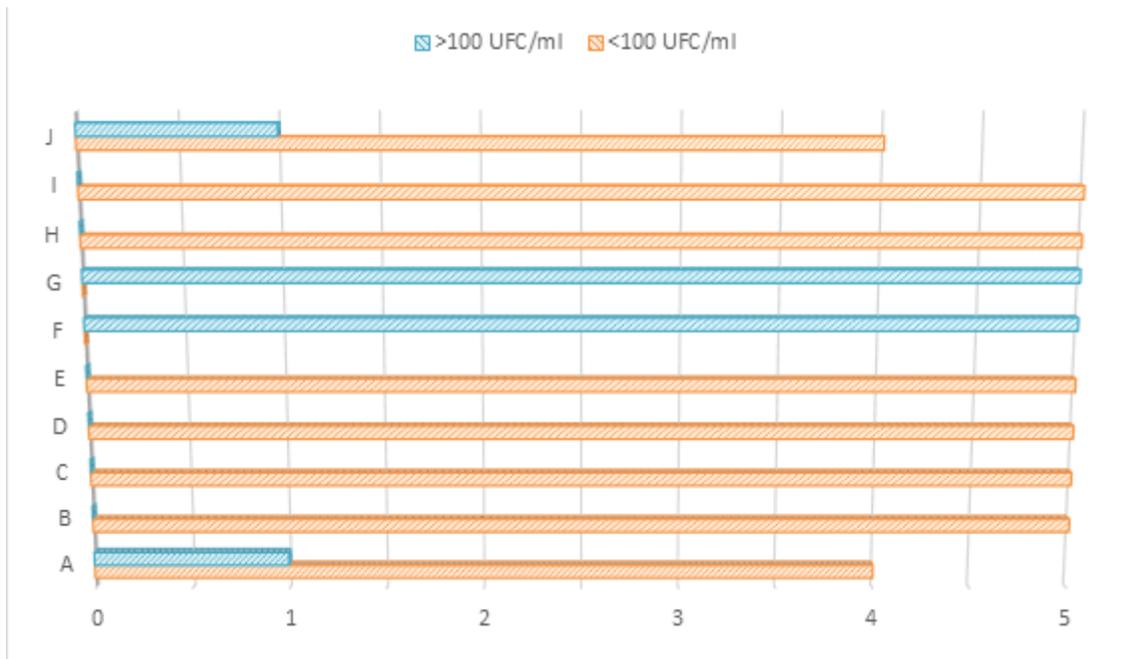
### Gráfico N° 3: Utilización de bioquímicas oxidasa y catalasa para comprobar el diagnóstico de muestras positivas en la técnica de NMP



Fuente: tabla 3

Para correlacionar resultados obtenidos del medio de cultivo Agar acetamida se realizaron dos pruebas bioquímicas, oxidasa y catalasa, ya que el microorganismo tiene la característica de producir ambas enzimas, donde obtuvimos como resultado que el 100% de las muestras positivas en la fase confirmatoria de la técnica de NMP para *Pseudomonas aeruginosa*, también fueron positivas para oxidasa y catalasa, lo que significa que evidentemente están contaminadas con esta bacteria.

#### Gráfico N° 4: Evaluación de la Calidad del Agua Envasada mediante el recuento de aerobios heterótrofos



Fuente: tabla 4

El recuento de los aerobios Heterótrofos es importante porque nos permite evaluar la calidad microbiológica y las BPM que estén implementando las empresas procesadoras del agua embotellada, ya que el producto final debe cumplir con recuentos lo más bajos posible según los valores establecidos <100 UFC/ml. En nuestra gráfica observamos que en las marcas A y J se encontró que 4 muestras de las 5 analizadas por cada marca cumplen con los estándares establecidos y 1 muestra tubo un recuento mayor del rango. Las 5 muestras de la marca B, C, D, E, H, I no se encontraron heterótrofos. De las marcas F y G en las 5 muestras analizadas se encontraron heterótrofos sobrepasando el valor establecido según las Normas COVENIN.

El crecimiento de estos microorganismos en botellas y bolsas plásticas puede estar relacionado a una mala aplicación de las BPM en el sistema de distribución. Su crecimiento determina si el agua es adecuada o no para consumo humano. Un recuento altos en un sistema de distribución pueden representar una contaminación o algún otro problema de calidad del agua; sin embargo, esto no puede relacionarse cuantitativamente a un riesgo de enfermedad.

## X. CONCLUSIÓN

Se detectó la presencia de *Pseudomona aeruginosa* en 2 muestras de las 50 analizadas, una con 540 y la otra 4 NMP/100ml ambas de la marca G.

Al verificar la reacción de los medios utilizados en el método de NMP para *pseudomona aeruginosa* obtuvimos como resultado que los medios Asparagina y Acetamida tienen la capacidad de un 100% para ayudarnos a identificar dicha bacteria.

Comprobamos el diagnóstico en muestras positivas para NMP utilizando las bioquímicas de oxidasa y catalasa, donde obtuvimos como resultado que el 100% de las muestras positivas en la fase confirmatoria de la técnica de NMP para *Pseudomonas aeruginosa*, también fueron positivas para oxidasa y catalasa.

También se evaluó la calidad bacteriológica de las aguas envasadas mediante el recuento de bacterias heterótrofas donde los resultados fueron que el 24% de las muestras analizadas presentaron un resultado mayor de lo indicado según la Norma COVENIN, que corresponde a 1 muestra de la marca A y otra de la marca denominada como J, y las 5 muestras de las marcas F y G sobrepasaron el valor de referencia; los que nos indica una mala aplicación de las BPM.

## **XI. RECOMENDACIONES**

### ***Al CNDR:***

Agregar al perfil de pruebas para las aguas envasadas el método de NMP para la detección de *Pseudomonas aeruginosa*.

### ***A las empresas procesadoras y distribuidoras de aguas envasadas:***

Realizar una evaluación amplia y constante de sus productos antes, durante y después del procesamiento de estos.

Realizar chequeos periódicamente de las maquinarias utilizadas para el envasado, de los sitios de almacenamiento del producto final.

Capacitar al personal para que este cumpla con las BPM y tomen las medidas de bioseguridad.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, N., Plorde, J. J., & Lawrence Drew, W. (2010). *Sherris. Microbiología Médica*. McGRAW-HILL.
- American Public Health Association. (2001). *Compendium of methods for the MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS*. Frances Pouch Downes, Keith Ito.
- American Public Health Association. (2005). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Andrew D Eaton, Lenore S Clesceri, Eugene W Rice, Arnold E Greenberg.
- Aparicio Ramos, C. L., & Ladino Solito, C. E. (2007). *EVALUACION DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA Y FÍSICO-QUÍMICA DE AGUAS ENVASADAS EN BOLSAS DISTRIBUIDAS EN EL ÁREA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR EN EL PERÍODO DE SEPTIEMBRE – OCTUBRE DE 2007*. San Salvador.
- Ashbolt, N., Grabow, W., & Snozzi, M. (2001). *Calidad del agua: Directrices, normas y -Evaluación de la salud y gestión del riesgo para las enfermedades infecciosas relacionadas con el agua. Serie de monografías de la OMS sobre el agua*. Londres (Reino Unido).
- C.H.Collins. (1969). *Metodos Microbiologicos*. Zaragoza: Acribia.
- Campos-Bedolla, Sanmartí, Torres, Mingo, Fernández, Boixaderas, y otros. (2003). *Biología*. Mexico, D.F: LIMUSA, S.A. DE C.V GRUPO NORIEGA EDITORES.
- Chaidez Quiroz, P. C. (Octubre de 2002). *Agua Embotellada y su Calidad Bacteriológica*. Recuperado el 10 de Diciembre de 2015, de <http://biblio.upmx.mx/Estudios/Documentos/adiccionpotomania021.asp>
- CNDR. (2014). *Estadísticas de resultados del laboratorio de Aguas y Alimentos*. Managua.
- D., J. V., Consuegra F., A., Gomecaseres P., L., & Marrugo N., J. (2009). *EVALUACIÓN DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL AGUA ENVASADA EN BOLSAS PRODUCIDA EN SINCELEJO-COLOMBIA*. SINCELEJO - COLOMBIA.
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Saéz Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). *Metodos de identificación*.
- GOMEZ BERNAL, J. (20 de 09 de 2011). *Repositorio Institucional de la Universidad Veracruzana*. Recuperado el 25 de 03 de 2015, de <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30514/1/GomezBernal.pdf>
- Hardalo, C., & SC Edberg. (1997). *Pseudomonas aeruginosa: Evaluación del riesgo del agua potable*.

- Horii, T., Muramatsu, H., Monji, A., & Miyagishima, D. (2005). *La liberación de la exotoxina A, peptidoglicano y endotoxinas después de la exposición de clínica Pseudomonas aeruginosa aísla a los carbapenémicos in vitro.*
- Huber Publisher, H., Berna, & Suiza. (1980). *Pseudomonas aeruginosa: el organismo, las enfermedades que causa y su tratamiento.* CD Sabath.
- Hurtado, Alcántara, Leal, Quiñone, & Amador. (2010). *ANALISIS MICROBIOLOGICO PARA LA BUSQUEDA DE ORGANISMOS COLIFORMES EN AGUA EMBOTELLADA DISTRIBUIDA EN LA CIUDAD DE TIJUANA, B. C. Tijuana.*
- Kiewitz, C. &. (2000). *Secuencia de la diversidad de Pseudomonas aeruginosa: Impacto en la estructura de la población y la evolución del genoma.*
- Krunkosky, T., Maruo, k., Potempa, J., Jarrett, C., & Travis, J. (2005). La inhibición de la necrosis tumoral por factor-alfa-inducida RANTES La secreción de la proteasa alcalina en células A549. *Revista Americana de la célula respiratoria y Biología Molecular.*
- Lorch H. J., B. G. (1995). *Los métodos básicos para el recuento de microorganismos en el suelo y el agua.* K. Alef and P.
- Morales, F. (29 de Agosto de 2010). *Biología Médica.* Obtenido de <http://biologiamedica.blogspot.com/2010/08/origen-de-la-celula-organismos.html>
- Nikaido, H. H.-Z. (s.f.). *Bombas de expulsión de 1996. Li múltiples fármacos hacen una importante contribución a la resistencia a los medicamentos en Pseudomonas. En: Biología Molecular de Pseudomonas.* Washington DC: T. Nakazawa, K. Furukawa, D. Haas y S. Silver.
- Payares, B. M., Villasmil, K. J., Matos, L. C., Larreal, A. G., Barboza, Y., & Levy, A. (2013). *Calidad microbiológica del agua potable envasada en bolsas y botellas que se venden en la ciudad de Maracaibo, estado Zulia-Venezuela.*
- Pelczar M. J., R. R. (1982). *Microbiología. 4ª edición.* McGraw-Hill.
- Rhame, LG, MWL Le, SM Wong, RG Tompkins, SB Calderwood, y otros. (1997). *El uso del modelo de planta acoge a identificar factores de virulencia de Pseudomonas aeruginosa.* EE.UU.
- Rocha García, R. d., Lozano Zaráin, P., & Martínez Laguna, Y. (2006). *Mecanismos de Patogenicidad e Interacción Parásito-Hospedero II.* Puebla, Mexico: Direccion de Fomento Editorial.
- Römling, U. W. (1994). *Un gran clon aeruginosa Pseudomonas común para los pacientes y los hábitats acuáticos.*
- Salcedo Posadas, A., & García Novo, M. D. (1998). *Fibrosis Quística.* Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos S.A.

- Silver, D., Cohen, I., & Weinberg, P. (1992). *Neumonía por Pseudomonas aeruginosa en una unidad de cuidados intensivos.*
- Simanca, M. M., Álvarez, B. E., & Paternina, R. (2009). *CALIDAD FÍSICA, QUÍMICA Y BACTERIOLÓGICA DEL AGUA ENVASADA EN EL MUNICIPIO DE MONTERÍA.* Cordoba.
- Sokol, P., Kooi, C., Hodges, R., Cachia, P., & Woods, D. (2000). *La inmunización con una Pseudomonas aeruginosa elastasa Péptido Reduce Severidad de la Experimental de pulmón Infecciones por P. aeruginosa y Burkholderia cepacia.*
- Stover, CK, Pahn, Q., Erwin, A., Miizoguche, S., Warrenner, P., y otros. (s.f.). *secuencia completa del genoma de Pseudomonas aeruginosa PAO1, un patógeno oportunista. Naturaleza.*
- Tan, M. W., & Ausubel, F. B. (2000). *elegans Caenorabditis: un huésped genética modelo para el estudio de Pseudomonas aeruginosa patogénesis.*
- UNAM. (11 de Febrero de 2014). *UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.* Recuperado el 19 de Noviembre de 2014, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/patogenicidad.html>
- Vilanova, S. (2004). *Evaluación de las aguas comercializadas y consumidas en la Ciudad de Buenos Aires.* Buenos Aires.
- Woese. (1987). *Evolución bacteriana. Microbiología.* Costa Rica.

### **XIII. ABREVIATURAS**

**APHA:** Asociación americana de la salud pública.

**COVENIN:** Comisión Venezolana de Normas Industriales.

**CNDR:** Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

**ENACAL:** Empresa Nicaragüense de Acueductos y Alcantarillados.

**EPA:** Agencia de Protección Ambiental.

**FDA:** Food and Drug Administration.

**HACCP:** Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control.

**MINSA:** Ministerio de Salud.

**NMP:** Número más probable.

**RHP:** Recuento de heterótrofos en placa.

## XIV. GLOSARIO

**Biofilm o biopelículas:** Es una población de microbios asociada a una superficie y embebida en una matriz de polímeros extracelulares. Es un estado de crecimiento natural común para muchos microorganismos, siempre que la humedad y los nutrientes disponibles sean suficientes.

**Desarenadores y desengrasadores:** Suministro para depuración de aguas residuales.

**Efluentes:** Término empleado para nombrar a las aguas servidas con desechos sólidos, líquidos o gaseosos que son emitidos por viviendas y/o industrias.

**Estriba:** Tener su origen una cosa en otra.

**Floculadas:** Es un proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado.

**Inocuidad:** Se refiere a las condiciones y prácticas que preservan la calidad de los alimentos para prevenir la contaminación y las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos.

**Microflora:** Flora microorgánica de un medio determinado.

**Oligotróficos:** Es un cuerpo de agua con baja productividad primaria, como resultado de contenidos bajos de nutrientes.

**Subfluvial:** Que se halla debajo del nivel de un río.

**Ubicuos:** En todas partes.

# ANEXOS

## Contenido de los medios

### Asparagina

Composición	Cantidad en gramos para diluir en 1 L de agua destilada
Asparagina DL	3,0
Dipostasio Anhidro	1,0
Sulfato de magnesio	0,5

### Acetamida

Composición	Cantidad en gramos
Acetamida	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Hidrogeno fosfato dipotasico anhidro	1,39
Dihidrogeno fosfato de potasio anhidro	0,73
Sulfato de magnesio	0,5

### PCA

Composición	Cantidad en gramos
Extracto de levadura	2.5
D(+) Glucosa	1,0
Triptona	5,0
Agar	15,0

**Tabla 1: Resultados del análisis de NMP para *Pseudomona aeruginosa***

Marca	Numero de Mx	Resultado NMP/100ml	Marca	Numero de Mx	Resultado NMP/100ml
<b>A</b>	5607	<1,8	<b>D</b>	5622	<1,8
	5608	<1,8		5623	<1,8
	5609	<1,8		5624	<1,8
	5610	<1,8		5625	<1,8
	5611	<1,8		5626	<1,8
<b>B</b>	5612	<1,8		<b>E</b>	5627
	5613	<1,8	5628		<1,8
	5614	<1,8	5629		<1,8
	5615	<1,8	5630		<1,8
	5616	<1,8	5631		<1,8
<b>C</b>	5617	<1,8	<b>F</b>	109	<1,8
	5618	<1,8		110	<1,8
	5619	<1,8		111	<1,8
	5620	<1,8		112	<1,8
	5621	<1,8		113	<1,8

**Fuente:** Resultados de laboratorio

Marca	Numero de Mx	Resultado NMP/100ml
<b>G</b>	114	< 1,8
	115	4,0
	116	520
	117	<1,8
	118	<1,8
<b>H</b>	119	<1,8
	120	<1,8
	121	<1,8
	122	<1,8
	123	<1,8
<b>I</b>	124	<1,8
	125	<1,8
	126	<1,8
	127	<1,8
	128	<1,8
<b>J</b>	129	<1,8
	130	<1,8
	131	<1,8
	132	<1,8
	133	<1,8

**Tabla 2: Resultados de evaluación de los medios de cultivo con cepas de control ATCC 27853.**

	Positivo con cepas ATCC 27853	Negativo con cepas ATCC 27853
Caldo Asparagina	100%	0%
Agar Acetamida	100%	0%

Fuente: Resultados de laboratorio

**Tabla 3: Resultados de confirmación mediante pruebas bioquímicas oxidasa y catalasa la presencia de *Pseudomonas aeruginosas* en aguas envasada.**

	Positivas	Negativas
<i>Oxidas</i>	100%	0%
<i>Catalasa</i>	100%	0%

Fuente: Resultados de laboratorio

**Tabla 4: Resultados de la evaluación de la calidad del agua mediante el recuento de aerobios heterótrofo.**

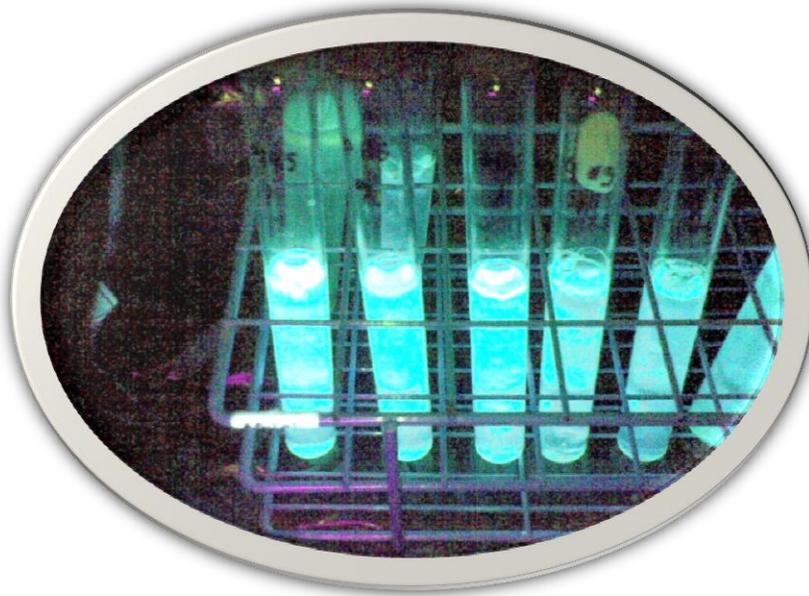
<i>Marca</i>	Numero de Mx	1 ml	1ml	0.1ml	0.1ml	-2	-2	Resultado UFC/ML
<i>A</i>	5607	7	10	0	0	0	0	8,5
	5608	333	336	30	36	4	5	330
	5609	0	0	0	0	0	0	0
	5610	0	0	0	0	0	0	0
	5611	0	0	0	0	0	0	0
<i>B</i>	5612	0	0	0	0	0	0	0
	5613	0	0	0	0	0	0	0
	5614	0	0	0	0	0	0	0
	5615	0	0	0	0	0	0	0
	5616	0	0	0	0	0	0	0
<i>C</i>	5617	0	0	0	0	0	0	0
	5618	0	0	0	0	0	0	0
	5619	0	0	0	0	0	0	0
	5620	0	0	0	0	0	0	0
	5621	0	0	0	0	0	0	0
<i>D</i>	5622	0	0	0	0	0	0	0
	5623	0	0	0	0	0	0	0
	5624	0	0	0	0	0	0	0
	5625	0	0	0	0	0	0	0
	5626	0	0	0	0	0	0	0
<i>E</i>	5627	0	0	0	0	0	0	0
	5628	0	0	0	0	0	0	0

	5629	0	0	0	0	0	0	0
	5630	0	0	0	0	0	0	0
	5631	0	0	0	0	0	0	0
<i>F</i>	109	202	199	23	22	4	2	200
	110	>300	>300	45	45	5	5	450
	111	>300	>300	31	31	5	2	310
	112	>300	>300	72	73	8	8	720
	113	>300	>300	123	119	23	19	1200
<i>G</i>	114	>300	>300	>300	>300	80	83	8100
	115	>300	>300	>300	>300	139	133	14000
	116	>300	>300	>300	>300	>300	>300	30000
	117	>300	>300	>300	>300	74	77	7600
	118	123	120	17	17	1	1	122
<i>H</i>	119	0	0	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0	0	0
	121	0	0	0	0	0	0	0
	122	0	0	0	0	0	0	0
	123	0	0	0	0	0	0	0
<i>I</i>	124	0	0	0	0	0	0	0
	125	0	0	0	0	0	0	0
	126	0	0	0	0	0	0	0
	127	0	0	0	0	0	0	0
	128	0	0	0	0	0	0	0
<i>J</i>	129	0	0	0	0	0	0	0
	130	>300	>300	>300	>300	46	46	4600
	131	0	0	0	0	0	0	0
	132	0	0	0	0	0	0	0
	133	0	0	0	0	0	0	0

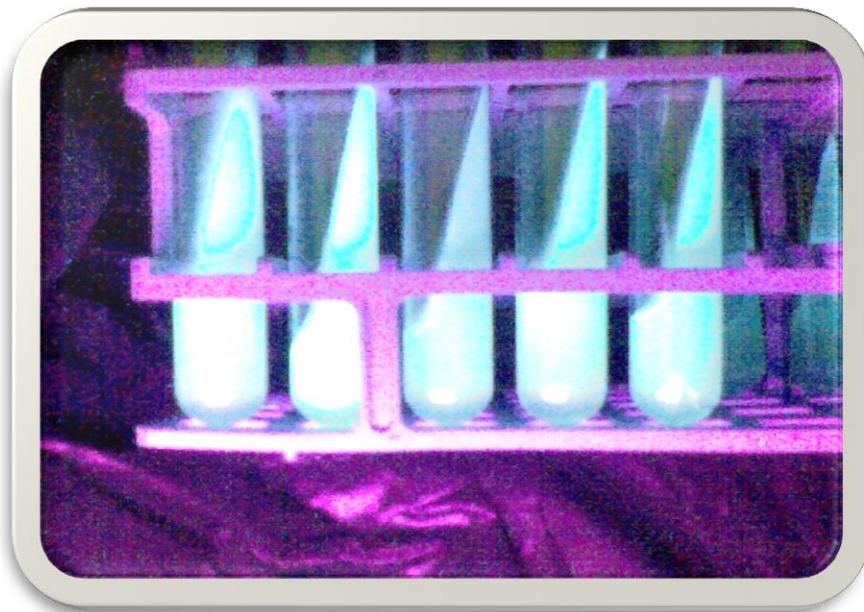
Fuente: Resultados de laboratorio

### Ficha de recolección de datos

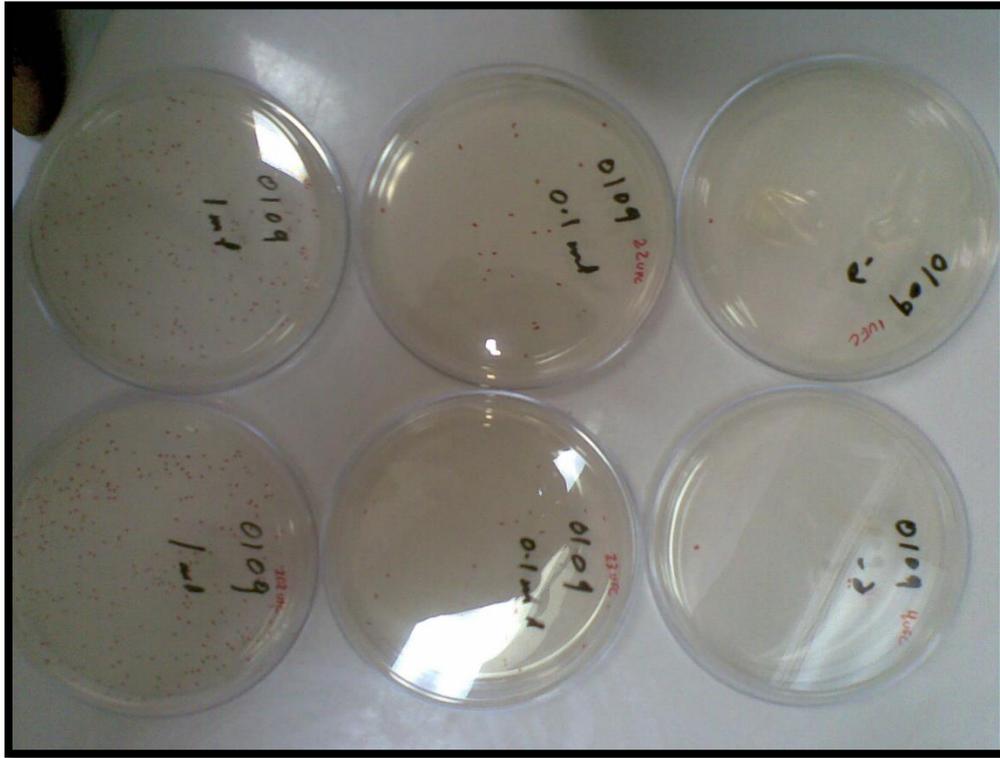
Ficha de recolección de datos			
Fecha de recolección:		Fecha de análisis:	
Lote:		Número de Mx:	
Fecha de vencimiento:		Tipo de envase:	
Tipo de agua:		Procesos de purificación:	



Tubos positivos con caldo asparagina



Tubos positivos con agar acetamida



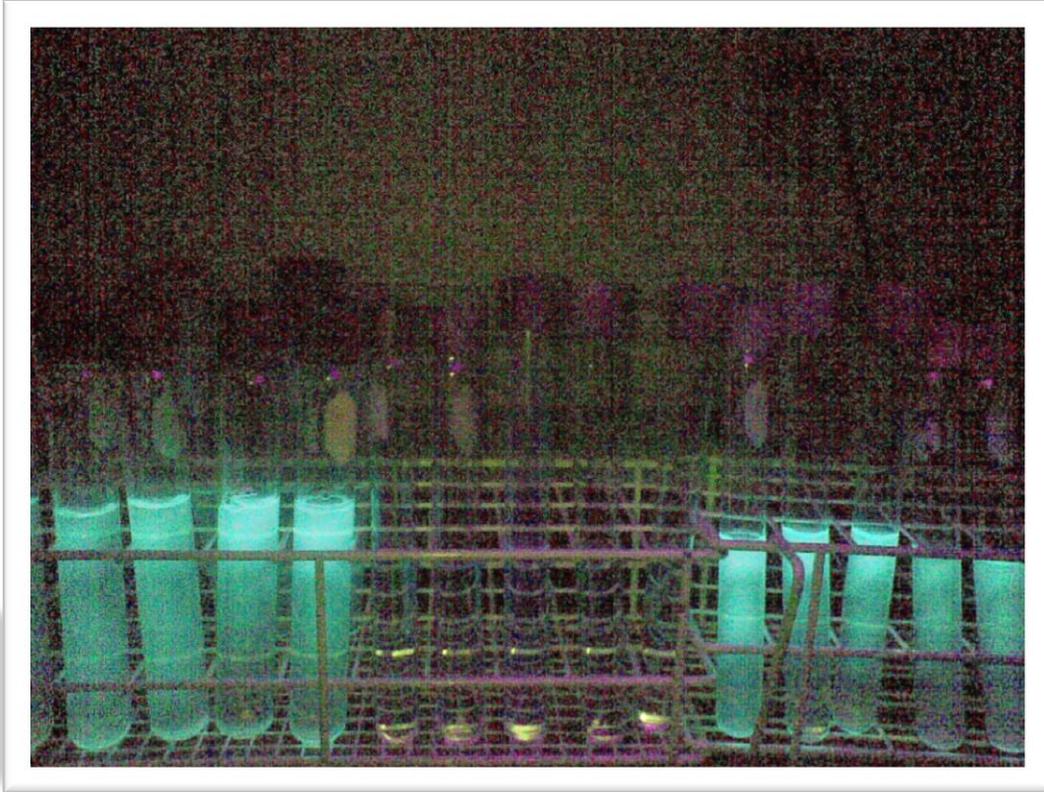
Placas con crecimiento de heterótrofos



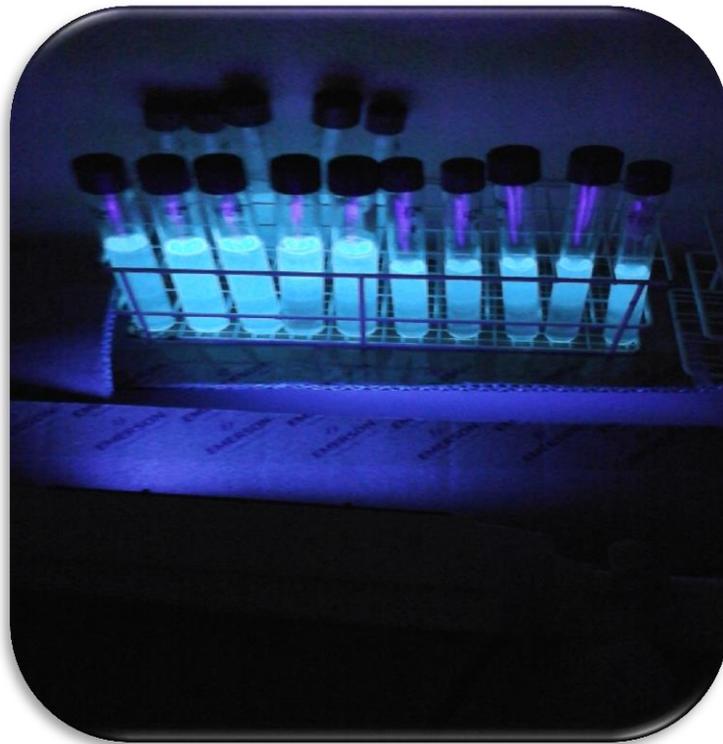
Francisco Morales



Salomón Delgado



Tubos positivos (derecha e izquierda) y tubos negativos (centro) en caldo Asparagina



Serie de 15 tubos positivas 5-5-2

## Tabla de Numero Mas Probable

TABLA 9221: IV. MPN INDEX AND 95% CONFIDENCE LIMITS FOR VARIOUS COMBINATION OF POSITIVE RESULT WHEN FIVE TUBES ARE USED PER DILUTION

Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza		Combinación de tubos positivos			NMP/100mL	Límites de 95% de confianza	
				Inferior	Superior					Inferior	Superior
0	0	0	< 1.8	-	6.8	4	0	3	25	9.8	70
0	0	1	1.8	0.090	6.8	4	1	0	17	6.0	40
0	1	0	1.8	0.090	6.9	4	1	1	21	6.8	42
0	1	1	3.6	0.70	10	4	1	2	26	9.8	70
0	2	0	3.7	0.70	10	4	1	3	31	10	70
0	2	1	5.5	1.8	15	4	2	0	22	6.8	50
0	3	0	5.6	1.8	15	4	2	1	26	9.8	70
1	0	0	2.0	0.10	10	4	2	2	32	10	70
1	0	1	4.0	0.70	10	4	2	3	38	14	100
1	0	2	6.0	1.8	15	4	3	0	27	9.9	70
1	1	0	4.0	0.71	12	4	3	1	33	10	70
1	1	1	6.1	1.8	15	4	3	2	39	14	100
1	1	2	8.1	3.4	22	4	4	0	34	14	100
1	2	0	6.1	1.8	15	4	4	1	40	14	100
1	2	1	8.2	3.4	22	4	4	2	47	15	120
1	3	0	8.3	3.4	22	4	5	0	41	14	100
1	3	1	10	3.5	22	4	5	1	48	15	120
1	4	0	10	3.5	22	5	0	0	23	6.8	70
2	0	0	4.5	0.79	15	5	0	1	31	10	70
2	0	1	6.8	1.8	15	5	0	2	43	14	100
2	0	2	9.1	3.4	22	5	0	3	58	22	150
2	1	0	6.8	1.8	17	5	1	0	33	10	100
2	1	1	9.2	3.4	22	5	1	1	46	14	120
2	1	2	12	4.1	26	5	1	2	63	22	150
2	2	0	9.3	3.4	22	5	1	3	84	34	220
2	2	1	12	4.1	26	5	2	0	49	15	150
2	2	2	14	5.9	36	5	2	1	70	22	170
2	3	0	12	4.1	26	5	2	2	94	34	230
2	3	1	14	5.9	36	5	2	3	120	36	250
2	4	0	15	5.9	36	5	2	4	150	58	400
3	0	0	7.8	2.1	22	5	3	0	79	22	220
3	0	1	11	3.5	23	5	3	1	110	34	250
3	0	2	13	5.6	35	5	3	2	140	52	400
3	1	0	11	3.5	26	5	3	3	170	70	400
3	1	1	14	5.6	36	5	3	4	210	70	400
3	1	2	17	6.0	36	5	4	0	130	36	400
3	2	0	14	5.7	36	5	4	1	170	58	400
3	2	1	17	6.8	40	5	4	2	220	70	440
3	2	2	20	6.8	40	5	4	3	280	100	710
3	3	0	17	6.8	40	5	4	4	350	100	710
3	3	1	21	6.8	40	5	4	5	430	150	1100
3	3	2	24	9.8	70	5	5	0	240	70	710
3	4	0	21	6.8	40	5	5	1	350	100	1100
3	4	1	24	9.8	70	5	5	2	540	150	1700
3	5	0	25	9.8	70	5	5	3	920	220	2600
4	0	0	13	4.1	35	5	5	4	1600	400	4600
4	0	1	17	5.9	36	5	5	5	>1600	700	-
4	0	2	21	6.8	40						

Fuente: STANDARD METHODS 9221 B. STANDARD TOTAL COLIFORM FERMENTATION TECHNIQUE, JUNE 2003