

* COLIMETRIA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Miguel González Milliani* y Ricardo Corona Salas**

SUMMARY

Spectrophotometric methods were used in order to establish a standard curve for coliform bacteria growth in Brilliant Green Bile broth.

This standard curve can be used as a pattern for the estimation of the colimetric index in class 1 waters (according to COPLANARH classification of waters). The time employed in such estimation is less than 8 hours. Thus, the advantage of the use of this method over the COVENIN MPN recommended method for colimetric number estimation in water, is that it allows for rapid water purifying treatment when necessary before sending it for consumption.

For this method to be used with advantage, it is necessary that the water has to have a ranging electric conductivity between the average limits accepted for this water class.

RESUMEN

Utilizando el método espectrofotométrico, para elaborar una curva standard de crecimiento de bacterias coliformes en caldo Bilis Verde Brillante y usando esta curva como patrón de comparación, es posible calcular el índice colimétrico en aguas clase I (COPLANARH) en un tiempo no mayor de ocho (8) horas, lo que traería ciertas ventajas sobre el método del NMP recomendado por COVENIN, ya que se podrían aplicar los correctivos necesarios a dichas aguas en caso de necesidad antes de ser enviadas a la red de distribución.

Para la aplicación del método es necesario que las muestras de agua a analizar tengan una conductibilidad eléctrica ubicada entre los límites promedios aceptables para la clase establecida.

Profesor Asociado de la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial.
Escuela de Agronomía, Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado
Barquisimeto, Venezuela.

** Profesor Asistente de la Cátedra de Microbiología Agrícola e Industrial.

INTRODUCCION

La determinación de la calidad bacteriológica de las aguas destinadas a uso domiciliario, urbano e industrial primario, tradicionalmente se ha venido realizando siguiendo la metodología de NMP/100 ml, aplicando la técnica de los tubos múltiples de fermentación, con sus tres tipos de pruebas (preventiva, confirmativa y completa) y la cuenta directa de colonias en Agar Nutritivo, después de un período de incubación a 35 ± 0.5 °C durante 24 horas (COVENIN 1A-1104-1977).

Tanto la prueba del NMP como la cuenta directa, tienen el inconveniente, de que tardan mucho tiempo en su realización, 76 y 24 horas respectivamente, lo que trae como consecuencia, que en muchos casos cuando los resultados se obtienen, ya dichas aguas están en la red de distribución, con el consecuente perjuicio para los consumidores en caso de que dichas aguas resultaren contaminadas.

Aplicando técnicas espectrofotométricas, es posible determinar el índice coliforme en un tiempo que oscila entre 6 y 8 horas, lo que trae como consecuencia el poder parar a tiempo la distribución del agua a nivel de planta o fuente de suministro y así aplicar los correctivos necesarios antes de enviarla a los sitios de consumo.

MATERIALES Y METODOS

El método Espectrofotométrico de determinación del índice coliforme, es bastante sencillo y consiste en determinar la curva standard de crecimiento de microorganismos del grupo coliforme (bacterias aeróbicas o anaeróbicas, Gram negativas, no esporógenas, fermentadoras de lactosa con formación de gas) en Caldo Lactosado incubado por 24 horas a 35 ± 0.5 °C y luego repicado en Caldo Bilis Verde Brillante, haciendo las lecturas espectrofotométricas a las 2,6,8 horas de incubación a diferentes longitudes de onda (desde 500-600 nm. en Coleman Junior II).

La curva standard obtenida con el promedio de las lecturas a diferentes longitudes de onda, nos dará el patrón de comparación que utilizaremos para las muestras de agua, las cuales serán preparadas a la concentración promedio establecida y leída a la longitud de onda promedio.

ELABORACION DE LA CURVA ESTANDARD

Como quiera, que dentro del grupo coliforme presente en aguas, encontramos diferentes géneros y especies, es conveniente seleccionar cepas puras de ellos para preparar el inóculo. Dicho inóculo se prepara colocando en tubos de espectrofotometría de 12 x 15, 5cc de agua destilada estéril, con la cual se ha calibrado previamente el aparato y agregando una gota de una solución sobre saturada de células de cada cepa seleccionada, hasta preparar un inóculo que leído a 525 nm. de una lectura de 0.020

Con este inóculo sembramos 5 tubos de espectrofotometría de 12 x 15 que contienen 5 cc de caldo lactosado hasta obtener una lectura de 0,020 (aproximadamente 3 gotas con pipeta de 1 ml) se incuban por 18-24 horas y luego sembramos en 5 tubos de espectrofotometría de 12 x 15 conteniendo 5 cc de caldo Bilis Verde Brillante, calibrando previamente el aparato con CBVB e inoculando hasta lectura de 0,020 a 525 nm (aproximadamente 3 gotas con pipeta de 1 ml.)

Una vez inoculados los tubos, se tapan con papel parafilm y se incuban a 35 ± 0.5 °C durante 4, 6 y 8 horas, tiempo a los cuales se harán las lecturas (Experiencias previas indican que para este grupo de bacterias coliformes, la mejor D.O. es 525 sobre CBVB (Anexo 1).

Con los promedios de las lecturas de los 5 tubos a los diferentes tiempos, se elabora la curva standard de crecimiento para organismos coliformes sobre CBVB, la cual se usará como patrón de comparación para las muestras de agua a analizar (Anexo II).

Si se quiere diferenciar *Escherichia coli*, se puede elaborar una curva standard de crecimiento para ella siguiendo las mismas técnicas.

PREPARACION DE LAS MUESTRAS

A cinco tubos de espectrofotometría de 12 x 15 conteniendo 5 cc caldo Lactosado los inoculamos directamente sobre el aparato con la muestra de agua hasta alcanzar una lectura de 0,020 a 525 nm (El agua problema debe tener una conductibilidad eléctrica entre 100 y 1.600 Mmhos).

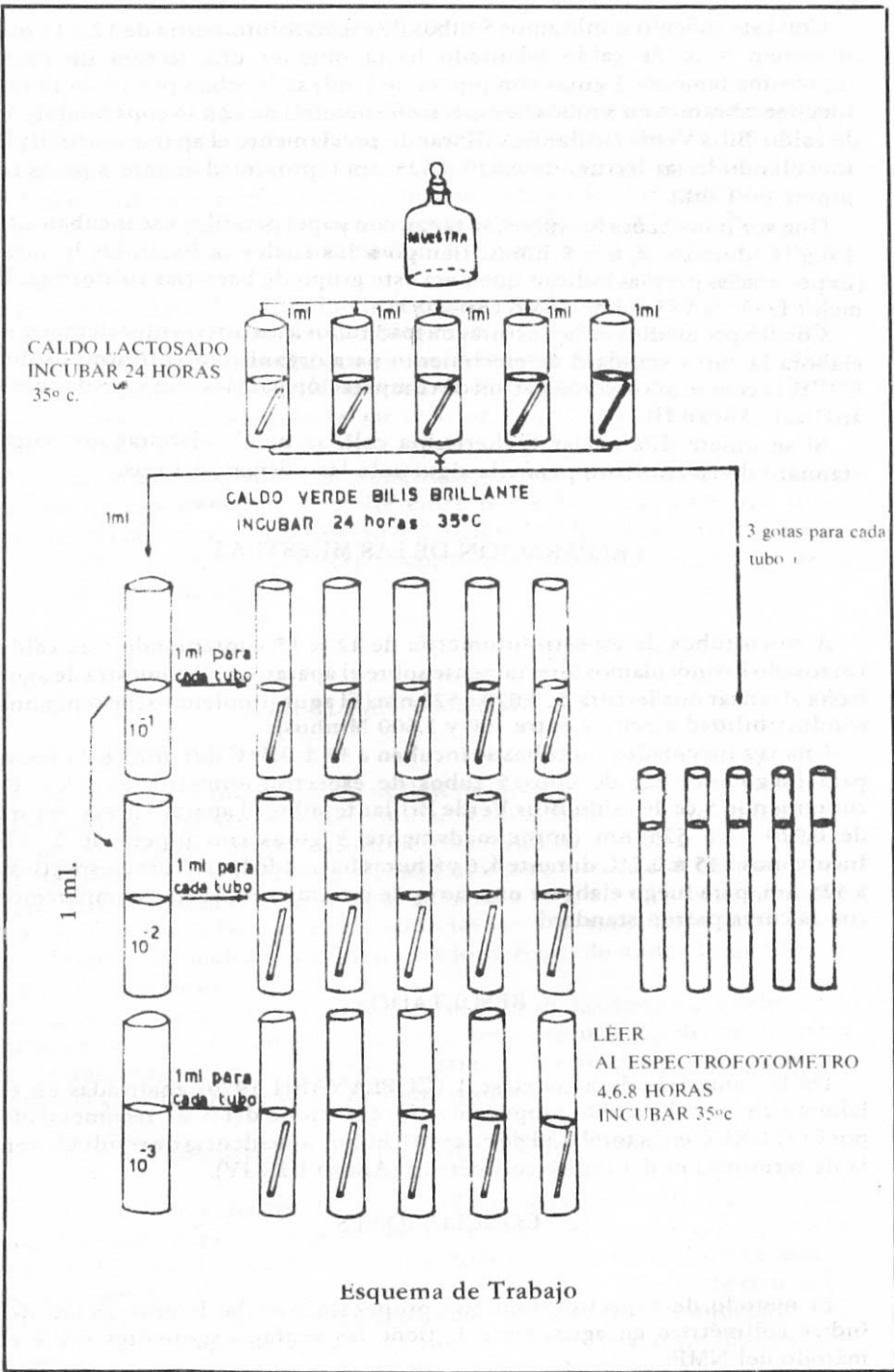
Una vez inoculados los tubos se incuban a 35 ± 0.5 °C durante 18-24 horas para luego inocular de ellos 5 tubos de espectrofotometría de 12 x 15 conteniendo 5 cc de caldo Bilis Verde Brillante sobre el aparato hasta lectura de 0,020 a 525 nm (aproximadamente 3 gotas con pipeta de 1 ml) Incubamos a 35 ± 0.5 °C durante 4, 6 y 8 horas haciendo las lecturas respectivas a 525 nm, para luego elaborar una curva de crecimiento, la cual comparamos con la curva patrón standard.

RESULTADOS

De las muestras de agua clase 1 (COPLANARH 1979) analizadas en el laboratorio por el método propuesto y por el método del NMP recomendado por COVENIN, en la totalidad de ellas (10) hubo coincidencia de resultados en la de terminación del índice colimétrico (Anexo III y IV).

CONCLUSIONES

El método de Espectrofotometría propuesto para la determinación del índice colimétrico en aguas clase 1, tiene las ventajas siguientes sobre el método del NMP:



- 1.- Es más sencillo de realizar.
- 2.- Es más económico.
- 3.- Es más rápido.
- 4.- Tiene igual precisión.
- 5.- Se pueden analizar mayor número de muestras por día.

La aplicación de este método en las plantas de tratamiento de aguas clase 1 y en las fábricas de alimentos, podrían mejorar notablemente la calidad de las aguas y por ende la calidad bacteriológica de muchos alimentos.

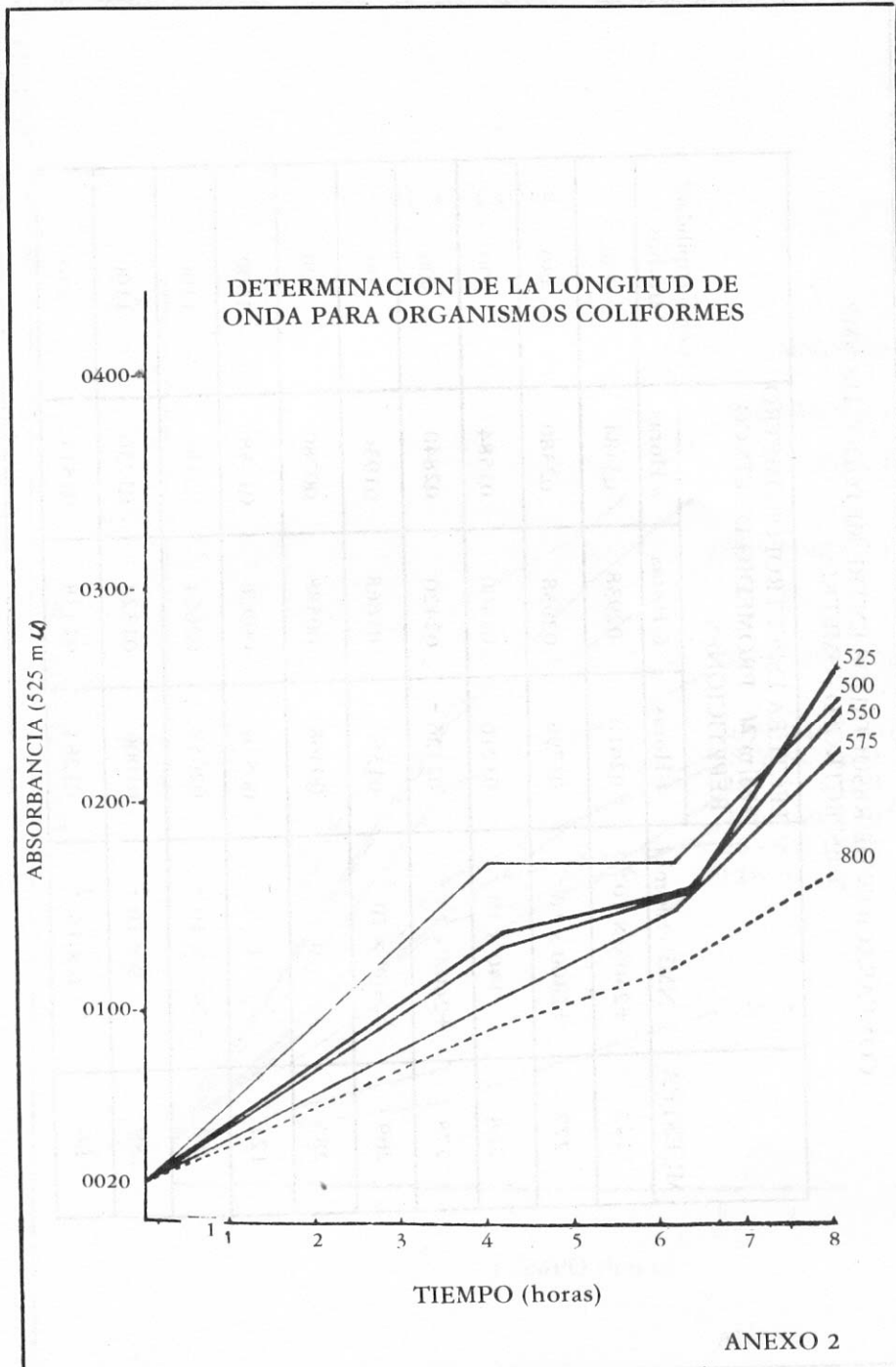
BIBLIOGRAFIA

- 1 COMENGE, Miguel. Análisis de Alimentos. Madrid, 1966. Tomo IV p. 9-93.
- 2 COVENIN. Norma 1A-1104. Caracas. 1979.
- 3 GEBHARDT, Louis. Microbiología. México. Interamericana. 1972. p. 141-168.
- 4 RAMIREZ, Filiberto, Técnicas de medición e investigación de calidad de agua. UCOLA. MARNR. DGIIA. DIA. Barquisimeto 1979.
- 5 VERONA, Onorato y PICCI, Giovanni. Microbiología degli Alimenti. Torino, Ital. UTET. 1968. p.3-44.

DETERMINACION DE LA LONGITUD DE ONDA PARA ORGANISMOS COLIFORMES

LONGITUD DE ONDA (m λ)	CEPAS											
	Escherichia Coli Prom. 5 Repeticiones			Aerobacter Aerogenes Prom. 5 Repeticiones			E Coli + A Aerogenes Prom. 5 Repeticiones					
	4 Horas	6 Horas	8 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas	4 Horas	6 Horas	8 Horas
500	0092	0144	0138	0134	0197	0228	0173	0183	0254			
525	0099	0148	0176	-	0314	0308	0149	0185	0271			
550	0099	0138	0163	-	0316	0337	0141	0181	0268			
575	0086	0133	0165	-	0161	0272	0122	0164	0239			
600	0078	0112	0127	-	0075	0087	0104	0140	0182			

ANEXO 1

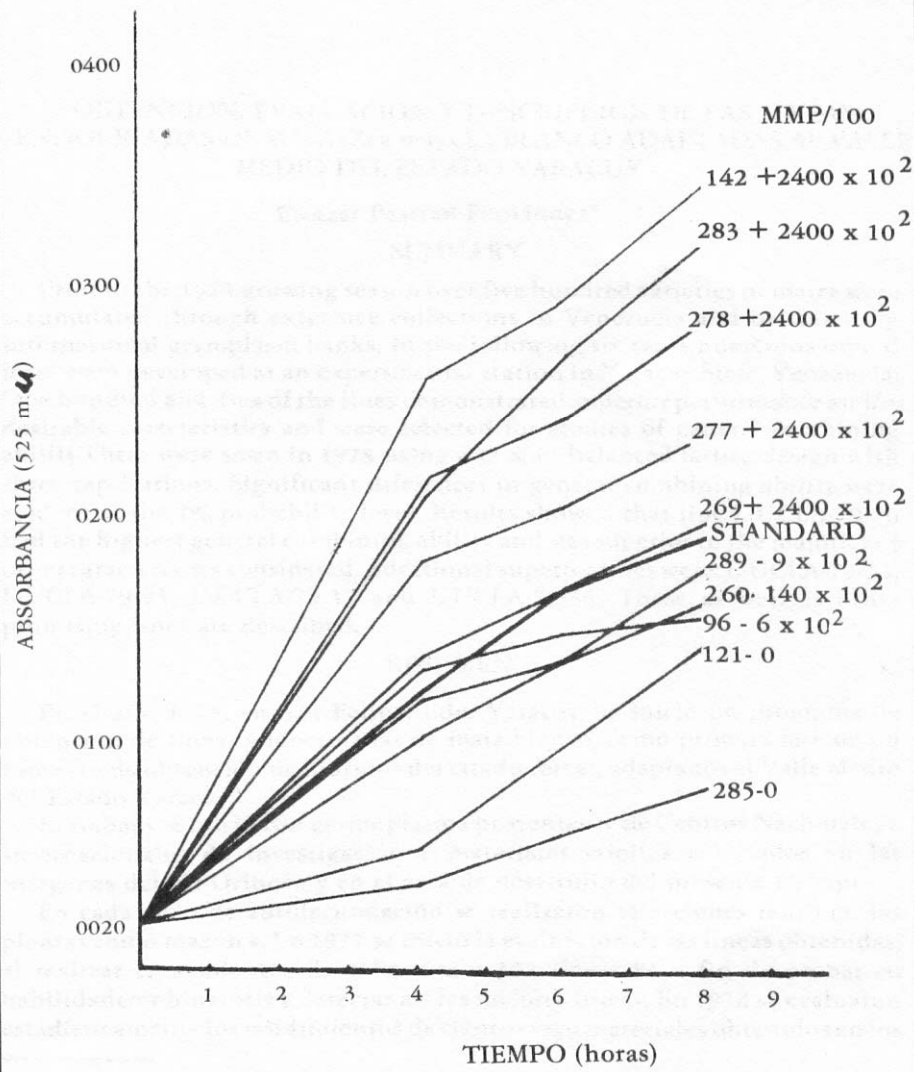


COMPARACION DE RESULTADOS ENTRE METODOS DE NMP
Y ESPECTROFOTOMETRIA

MUESTRA	NMP /100ml	LECTURA ESPECTROFOTOMETRO * 525 m μ PROMEDIO DE CINCO REPETICIONES			Conductipilidad/ (μ mhos)
		4 Horas	6 Horas	8 Horas	
142	+2400 x 10 ²	02610	02938	03484	250
277	+2400 x 10 ²	01798	02038	02380	430
268	140 x 10 ²	01210	01400	01584	390
278	+2400 x 10 ²	02126	02420	02840	900
269	+2400 x 10 ²	01356	01668	01936	700
* 285	0	00368	00588	00780	900
121	0	00516	00976	01388	1600
283	+2400 x 10 ²	02058	02664	03180	1100
288	9 x 10 ²	01006	01324	01750	1100
86	6 x 10 ²	01284	01438	01514	450

ANEXO 3

RESULTADOS



ANEXO 4