

11-12-2014

TESIS DE GRADO

IMPLEMENTACION DEL PROTOCOLO PARA LA
DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y
E. COLI EN AGAR CHROMOCULT PARA LA
ASOCIACIÓN MUNICIPAL DE ACUEDUCTOS
COMUNITARIOS AMAC

ANGELA PATRICIA PAREDES PERALTA
UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

**IMPLEMENTACION DEL PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES
TOTALES Y E. COLI EN AGAR CHROMOCULT PARA LA ASOCIACIÓN MUNICIPAL
DE ACUEDUCTOS COMUNITARIOS AMAC**

ANGELA PATRICIA PAREDES PERALTA

CÓD. 1087987155

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
2014**

**IMPLEMENTACION DEL PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES
TOTALES Y E.COLI EN AGAR CHROMOCULT PARA LA ASOCIACIÓN MUNICIPAL
DE ACUEDUCTOS COMUNITARIOS AMAC**

ANGELA PATRICIA PAREDES PERALTA

CÓD. 1087987155

Trabajo de Grado Para Optar Al Título de

TECNÓLOGA QUÍMICA

DIRECTOR

Luz Stella Ramírez Aristizabal

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍAS
ESCUELA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA**

2014

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Contenido

INTRODUCCION.....	1
1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	3
2 OBJETIVOS.....	6
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 MARCO CONCEPTUAL.....	7
3.1 AGUA POTABLE.....	7
3.1.1 Características del agua potable	8
3.1.2 Análisis microbiológico del agua:.....	10
3.1.3 Potabilización del agua:.....	10
3.2 MICROORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD EN EL AGUA:.....	13
3.2.1 Coliformes Totales:	13
3.2.2 Coliformes Fecales:.....	14
3.3 TECNICA DE FILTRACION DE MEMBRANA PARA LA DETECCION DE COLIFORMES:.....	15
3.3.1 Filtros de Membrana:.....	17

3.3.2	Tipos de Filtros de Membrana:	17
3.4	MEDIOS DE CULTIVO	19
3.4.1	Medios Cromógenos	21
4	METODOLOGÍA	24
4.1	FASE I: DIAGNOSTICO	24
4.2	FASE 2: DOCUMENTACIÓN	24
4.3	FASE 3: IMPLEMENTACIÓN	24
5	PROCESO DE DESARROLLO	25
5.1	FASE I: DIAGNOSTICO	25
5.1.1	Ubicación	25
5.1.2	Exploración	25
5.2	FASE II: DOCUMENTACION	25
5.3	FASE III: IMPLEMENTACION	26
6	FASE DE PRODUCCIÓN	27
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	28
8	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30
9	ANEXO 1	33

INTRODUCCION

Nuestro planeta está compuesto de agua en $\frac{3}{4}$ partes, más que un planeta terrestre somos un planeta acuático; nuestros organismos se componen de 70% de agua, esta es esencial y vital para nuestra existencia.

Sin embargo pese a la gran cantidad de recurso hídrico existente en nuestro planeta, solo una pequeña porción equivalente a un 0.025% cumple con las características que la hacen potable, es decir, apta para ser consumida o para ser usada en diversas labores como la agricultura, el aseo y el consumo directo; y este porcentaje es cada vez menor debido a factores como la contaminación y el agotamiento de las fuentes de recurso hídrico potable.

El agua como fuente de vida y elemento esencial del desarrollo se encuentra bajo la tutela y protección del estado, es este el que dictamina los parámetros y/o características que se deben cumplir para que sea considerada apta para el consumo humano.

El agua no solo es uno de los principales factores para el desarrollo de la vida, también es uno de los principales transmisores de enfermedades entéricas si no se encuentra en las condiciones adecuadas; son diversos los microorganismos que encontramos en ella y que pueden generar diversas enfermedades. Dentro de los microorganismos indicadores de la calidad del agua potable se encuentran la *Escherichia coli*, *Enterobacterspp*, *Klebsiellaspp* y *Citrobacterspp*, pertenecientes al

grupo coliforme, los cuales se encuentran generalmente en la capa superficial del agua.

Los laboratorios de microbiología se encargan de realizar los diversos análisis y procedimientos para determinar la cantidad de microorganismos presentes en una muestra y así establecer el nivel de aceptabilidad y el grado de cumplimiento con la norma.

El laboratorio de análisis físico-químicos y microbiológicos de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC, se encarga de realizar los análisis y establecer el grado de riesgo IRCA para una serie de acueductos comunitarios ubicados en el Municipio de Dosquebradas como lo son los acueductos de Frailes-Naranjales, Divino Niño, La Romelia, Santa Teresita, entre otros.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

La permanente realización de análisis de laboratorio hace necesario el establecimiento de una guía que establezca las pautas y condiciones a seguir para el adecuado desarrollo del procedimiento, por esto se hace necesario implementar un **PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y E. COLI EN AGAR CHROMOCULT**, que permita una mayor eficiencia al momento de realizar el análisis microbiológico en agua potable.

1.2 JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, el agua se ha convertido en uno de los mayores bienes y en el principal factor para la continuidad y el mejoramiento de la calidad de vida en el planeta, su disponibilidad ha estado ligada directamente al desarrollo de las sociedades.

Con los cambios demográficos y la expansión de la población, así como el descubrimiento de patologías ligadas a la calidad del agua consumida por grupos poblacionales se ha hecho necesario realizar análisis y controles que indiquen el estado de esta y si es apta para el consumo humano.

Según el decreto 1575 de 2007 emitido por el gobierno de la República de Colombia se considera agua potable como aquella que por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas, en las condiciones señaladas

en el presente decreto y demás normas que la reglamenten, es apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal¹.

La incidencia de la calidad del agua potable en las condiciones de vida de la población hace necesaria una vigilancia constante por parte del gobierno nacional, el cual a través del Ministerio de Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial establece las características físicas y químicas del agua para el consumo humano, los parámetros y los organismos de control encargados de su vigilancia, así como el establecimiento del Índice de Riesgo de la Calidad del Agua para Consumo Humano, IRCA, el cual es el grado de riesgo de ocurrencia de enfermedades relacionadas con el no cumplimiento de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para consumo humano².

En el laboratorio de análisis de agua de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC ubicado en el municipio de Dosquebradas, recibe muestras provenientes de los diversos acueductos ubicados en dicho municipio para realizar el análisis de calidad y determinar el nivel de riesgo IRCA, es por esto que se hace necesaria la implementación de un protocolo

¹ DECRETO 1575 DE 2007¹

² RESOLUCIÓN 2115 DE 2007²

y manual de procedimiento para la realización de los análisis microbiológicos dada la ausencia de un documento que especifique el procedimiento a seguir por el analista.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Diseñar un manual de laboratorio como documento final para la determinación de coliformes fecales y totales en agua potable con agar chromocult, mediante el método de filtración por membrana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Revisar las condiciones actuales del laboratorio microbiológico para el análisis de agua potable de la asociación de acueductos municipal AMAC, ubicado en Dosquebradas.
- Realizar un seguimiento al procedimiento bajo el cual se realiza el muestreo actualmente.
- Revisar las condiciones y protocolos de seguridad manejados actualmente en el laboratorio de análisis microbiológico y determinar las correcciones y mejoras que sean necesarias.

3 MARCO CONCEPTUAL

3.1 AGUA POTABLE

El decreto 1575 de 2007 emitido por el Ministerio de Salud Y La Protección Social, establece que el agua potable es aquella que por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas, en las condiciones señaladas en el presente decreto y demás normas que la reglamenten, es apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal. (Decreto 1575 de 2007).

Puede provenir de distintas fuentes como lo son manantiales, ríos, pozos, y demás esta agua es captada y tratada para cumplir con la reglamentación vigente para el consumo humano.

El agua de consumo inocua (agua potable), no ocasiona riesgos significativos para la salud cuando se consume durante toda una vida, teniendo en cuenta las diferentes vulnerabilidades que pueden presentar las personas en las distintas etapas de su desarrollo. Las personas que presentan mayor riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el agua son los lactantes y los niños de corta edad, las personas debilitadas o que viven en condiciones antihigiénicas y los ancianos. El agua potable es adecuada para todos los usos domésticos habituales, incluida la higiene personal. (Guías para la calidad del agua potable, OMS).

El peligro más común relativo al agua potable es el de su contaminación, la cual puede ser directa o indirecta, debido al efecto de aguas residuales, de otros desechos o de las excretas del hombre o los animales. Si dicha contaminación es reciente y entre los factores que contribuyen a ella se hallan agentes portadores de enfermedades entéricas transmisibles, es posible que estén presentes los organismos causantes de dichas enfermedades. Beber agua contaminada o emplearla en la preparación de bebidas o alimentos puede producir mayor número de casos de infección. (OPS, 1997).

FIGURA 1



FUENTE: <https://encrypted-tbn2.gstatic.com/images?q=tbn:ANd9GcQmxvQdKdz4kw6JM9sS6zhqg6MaCDc20V661WOPLTF-u7yGKDj>

3.1.1 Características del agua potable

El agua contiene diversas sustancias químicas y biológicas disueltas o suspendidas en ella. Desde el momento que se condensa en forma de lluvia, el agua disuelve los componentes químicos de sus alrededores, corre sobre la superficie del suelo y se filtra a través del mismo.

Dentro de las características químicas podemos encontrar diversos estándares, tales como la dureza, alcalinidad, presencia de cloruros, sulfatos o hierro. Algunas de estas características cuando se encuentran a niveles elevados son causantes de daños o pérdidas económicas en distintas industrias u hogares; como por ejemplo un exceso de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} pueden presentar daños en tuberías y electrodomésticos; en el caso de el hierro y el manganeso pueden darle al agua un sabor, olor y color indeseable

Además el agua contiene organismos vivos que reaccionan con sus elementos físicos y químicos. Por estas razones suele ser necesario tratarla para hacerla adecuada para su uso como provisión a la población. El agua que contiene ciertas

substancias químicas u organismos microscópicos puede ser perjudicial para ciertos procesos industriales, y al mismo tiempo perfectamente idóneo para otros. Los microorganismos causantes de enfermedades que se transmiten por el agua la hacen peligrosa para el consumo humano.

(http://www.frro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/civil/ing_sanitaria/Ingenieria_Sanitaria_A4_Capitulo_03_Caracteristicas_del_Agua_Potable.pdf).

Es por esto que en el Capítulo II, artículo 2 de la resolución 2115 de 2007, se dictan los valores máximos de las diversas características físicas.

TABLA 1. CARACTERISTICAS FISICAS

Características Físicas	Expresadas como	Valor Máximo Aceptable
Color Aparente	Unidades de Platino Cobalto	15
Olor y Sabor	Aceptable o No Aceptable	Aceptable
Turbiedad	Unidades Nefelométricas de Turbiedad (UNT).	2

FUENTE: Resolución 2115 de 2007

TABLA 2. CARACTERISTICAS QUIMICAS

Elementos Y Compuestos Químicos Que Tienen Implicaciones De Tipo Económico	Expresadas Como	Valor Máximo Aceptable (mg/L)
Calcio	Ca	60
Alcalinidad Total	CaCO ₃	200
Cloruros	Cl ⁻	250

Aluminio	Al ⁺³	0.2
Dureza Total	CaCO ₃	300
Hierro Total	Fe	0.3
Magnesio	Mg	36
Manganeso	Mn	0.1
Sulfatos	SO ₄ ²⁻	250

FUENTE: Resolución 2115 de 2007

3.1.2 Análisis microbiológico del agua:

Son los procedimientos de laboratorio que se efectúan a una muestra de agua para consumo humano, para evaluar la presencia o ausencia, tipo y cantidad de microorganismos. (Resolución 2115 de 2007).

TABLA 3. CARACTERISTICAS MICROBIOLÓGICAS

Técnicas Utilizadas	Escherichia Coli	Coliformes Totales
Filtración por membrana	0 UFC/100 cm ³	0 UFC/100 cm ³
Enzima Sustrato	<de 1 microorganismo en 100 cm ³	<de 1 microorganismo en 100 cm ³
Sustrato definido	Menos de 0 microorganismos en 100 cm ³	Menos de 0 microorganismos en 100 cm ³
Presencia-Ausencia	Ausencia en 100 cm ³	Ausencia en 100 cm ³

FUENTE: Resolución 2115 de 2007

3.1.3 Potabilización del agua:

El agua que se toma de una fuente hídrica como lo es un lago, río, fuente, pozo subterráneo, etc. debe ser sometida a una serie de procedimientos para garantizar

que sea apta para el consumo humano. Con tal fin se han diseñado plantas de tratamiento de agua.

En el caso de los acueductos comunitarios que se encuentran afiliados a la AMAC, las plantas de tratamiento llevan a cabo los siguientes procesos:

3.1.3.1 Captación

Se entiende por captación el punto o puntos de origen de las aguas para un abastecimiento, así como las obras de diferente naturaleza que deben realizarse para su recogida.

La captación consiste en recolectar y almacenar agua proveniente de diversas fuentes para su uso benéfico. El agua captada de una cuenca y conducida a estanques reservorios puede aumentar significativamente el suministro de ésta para el riego de huertos, bebederos de animales, la acuicultura y usos domésticos.

3.1.3.2 Transporte

El agua debe ser transportada desde el lugar de captación hacia la planta de tratamiento, para tal fin se hace uso de tuberías o canales que la conducen a la planta de tratamiento, allí debe pasar por unos tamices gruesos, cuya función es la de eliminar los sólidos que han llegado al agua durante el proceso de transporte; posteriormente es almacenada para asegurar un buen suministro de agua, durante todos los periodos del año. Durante este proceso se pueden realizar otro tipo de procedimientos para mejorar su calidad, como por ejemplo filtración, si la concentración de sólidos es menor de 10 mg/L; es posible llevar a cabo un proceso de radiación ultravioleta con el fin de eliminar bacterias nocivas y organismos patógenos.

3.1.3.3 Coagulación

Después del proceso de microfiltrado la mayoría de los sólidos suspendidos tendrán un diámetro muy pequeño para sedimentar espontáneamente.

Generalmente las partículas de arcilla, óxidos de metal, moléculas de proteínas grandes y microorganismos se encuentran cargadas negativamente, por lo que se repelen unas a otras, evitando la formación de partículas mayores, las cuales podrían entonces sedimentar. Para generar una sedimentación se debe añadir un coagulante al agua para desestabilizar las partículas e inducir las a agregarse en partículas mayores conocidas como flóculos. Los coagulantes más usados generalmente son sales como por ejemplo el sulfato de aluminio, hidróxido de aluminio, cloruro de polialuminio o cal.

3.1.3.4 Floculación

Luego de la adición del coagulante y la formación de partículas de mayor tamaño, se hace necesario un proceso de agitación en el agua para así lograr la unión de los flocs con partículas más pequeñas durante el proceso de sedimentación, esta unión se genera debido a que la agitación aumenta las probabilidades de choque entre las partículas.

3.1.3.5 Clarificación

En este proceso el agua fluye hacia arriba, permitiendo así que los floculos al ser más pesados sedimenten en el fondo; posteriormente se debe realizar un nuevo proceso de filtración para decantar pequeñas partículas que pudieran encontrarse aun en el agua, se pueden usar filtros de arena o de diatomeas entre otros.

3.1.3.6 Desinfección

La desinfección es uno de los procesos fundamentales en la producción de agua potable, ya que consiste en disminuir la población bacteriana.

En el año de 1774 el químico sueco Karl Wihellm Scheele, descubrió el cloro como producto de formación en la reacción del ácido hipoclorhídrico y el dióxido de magnesio. Actualmente el cloro es el desinfectante más usado en la purificación del agua, debido a su efectividad y costos.

Para la realización de los análisis microbiológicos, el cloro debe ser inactivado, para evitar que continúe con su proceso de desinfección en la muestra a tratar.

El compuesto utilizado para inactivar el cloro es el tiosulfato de sodio, el cual está compuesto por tiosulfato, que a su vez también está compuesto de sales de ácido tiosulfúrico estables en medios de pH básicos y neutros; se descomponen bajo la formación de azufre elemental, dióxido de azufre y trazas de compuestos azufrados en presencia de ácido. (Walter, J. 2003).

3.2 MICROORGANISMOS INDICADORES DE LA CALIDAD EN EL AGUA:

Varios organismos patógenos de transmisión fecal-oral pueden estar presentes en el agua cruda, entre ellos bacterias como la *Salmonella sp*, *Shigella sp*, *coliformes fecales y totales*, las cuales han sido encontradas en abastecimientos de agua potable. (Ocasio y López, 2004).

La verificación de la calidad microbiológica del agua de consumo incluye el análisis de la presencia de *Escherichia coli*, un indicador de contaminación fecal. No debe haber presencia en el agua de consumo de *E. coli*, ya que constituye una prueba concluyente de contaminación fecal reciente. En la práctica, el análisis de la presencia de bacterias coliformes termotolerantes puede ser una alternativa aceptable en muchos casos *E. coli* es un indicador útil, pero tiene limitaciones. Los virus y protozoos entéricos son más resistentes a la desinfección; por tanto, la ausencia de *E. coli* no implica necesariamente que no haya presencia de estos organismos. En ciertos casos, puede ser deseable incluir en los análisis microorganismos más resistentes, como bacteriófagos o esporas bacterianas, por ejemplo cuando se sabe que el agua de origen que se usa está contaminada con virus y parásitos entéricos, o si hay una incidencia alta de enfermedades virales y parasitarias en la comunidad. (Guías para la calidad del agua potable, Vol.1, OMS).

3.2.1 Coliformes Totales:

Los coliformes totales son las *Enterobacteriaceae* lactosa-positivas y constituyen un grupo de bacterias que se definen más por las pruebas usadas para su aislamiento que por criterios taxonómicos. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* y se caracterizan por su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y

gas, más o menos rápidamente, en un periodo de 48 horas y con una temperatura de incubación comprendida entre 30-37°C. (http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html).

Son bacilos gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, no esporulados. Del grupo coliforme forman parte varios géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, etc. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: agua, suelo, plantas, cáscara de huevo, etc. Una elevada proporción de los coliformes que existen en los sistemas de distribución no se debe a un fallo en el tratamiento en la planta, sino a un recrecimiento de las bacterias en las conducciones. Dado que es difícil distinguir entre recrecimiento de coliformes y nuevas contaminaciones, se admite que todas las apariciones de coliformes son nuevas contaminaciones, mientras no se demuestre lo contrario. (http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html).

La prueba más relevante usada para la identificación del grupo coliformes es la hidrólisis de la lactosa. El rompimiento de este disacárido es catalizado por la enzima B-D-Galactosidasa. Ambos monosacáridos (la lactosa después es transformada en glucosa por reacciones bioquímicas) posteriormente son metabolizados a través del ciclo glicolítico y ciclo del citrato. Los productos metabólicos de estos ciclos son ácidos y/o CO₂. Para la determinación de la B-Galactosidasa se utilizan medios cromógenos tales como chromocult. (M.Manafi, 1998).

3.2.2 Coliformes Fecales:

Los coliformes fecales también denominados coliformes termotolerantes, llamados así porque soportan temperaturas de hasta 45°C, comprenden un grupo muy reducido de microorganismos los cuales son indicadores de calidad, ya que son de origen fecal. En su mayoría están representados por el microorganismo *E.coli*, pero se pueden encontrar entre otros menos frecuentes *Citrobacterfreundii* y *Klebsiellapneumoniae*, estos últimos hacen parte de los coliformestermotolerantes,

pero su origen se asocia generalmente con la vegetación, y solo ocasionalmente aparecen en el intestino. (Hayes, 1993).

Los coliformes fecales integran el grupo de los coliformes totales, pero se diferencian de los demás microorganismos que hacen parte de este grupo, en que son indol positivo, su rango de temperatura óptima de crecimiento es muy amplio (hasta 45°C) y son mejores indicadores de higiene en alimentos y en aguas, la presencia de estos indica presencia de contaminación fecal de origen humano o animal, ya que las heces contienen dichos microorganismos, presentes en la flora intestinal y de ellos entre un 90% y un 100% son E.coli mientras que en aguas residuales y muestras contaminadas este porcentaje disminuye a un 59%. (Gómez, 1999).

3.2.2.1 Escherichia coli

E. coli es una de las especies bacterianas más minuciosamente estudiadas, y no solamente por sus capacidades patogénicas, sino también como sustrato y modelo de investigaciones metabólicas, genéticas, poblacionales y de diversa índole (Neidhardt, 1999). Forma parte de la familia Enterobacteriaceae (Ewing, 1985).

Son coliformes capaces de producir indol, a partir de triptófano, en 21 ± 3 horas a $44 \pm 0.5^\circ\text{C}$. También poseen la enzima B-Galactosidasa, que reacciona positivamente en el ensayo del rojo de metilo y puede descarboxilar el ácido L-Glutámico, pero no son capaces de usar citrato como única fuente de carbono o de crecer en un caldo con cianuro de potasio (KCN). (Millipore, 2005).

3.3 TECNICA DE FILTRACION DE MEMBRANA PARA LA DETECCION DE COLIFORMES:

El decreto 2115 de 2007, establece las técnicas adecuadas para realizar el análisis microbiológico para la determinación de coliformes fecales y totales; dentro de las técnicas recomendadas se encuentra la de filtración de membrana.

La técnica del método de filtración por membrana se basa en un mecanismo mediante el cual se atrapan en la superficie de una membrana microorganismos cuyo tamaño es mayor que el tamaño del poro ($0.45 \mu\text{m}$); esto gracias a una bomba eléctrica que ejerce una presión diferencial sobre la muestra de agua, logrando así que esta se filtre. Los microorganismos de un tamaño menor que el del poro pasan la membrana o quedan retenidos en su interior, las bacterias quedan en la superficie de la membrana, y luego esta es llevada a un medio enriquecido, selectivo o diferencial, quien a través de un intercambio metabólico y una incubación, evidencian el crecimiento de microorganismos y Unidades Formadoras de Colonias. (APHA- AWWA-WPCF, 2000).

FIGURA 2: EQUIPO DE FILTRACION



FUENTE: Fotografía tomada por el analista laboratorio AMAC.

3.3.1 Filtros de Membrana:

Se deben utilizar filtros de membrana con un diámetro de poro que permita la completa retención de las bacterias coliformes. Solo se deben emplear filtros en los que mediante una adecuada prueba de calidad y por garantía del fabricante se compruebe la retención de las bacterias coliformes. (APHA, 1992).

Se debe tener en cuenta, que dichos filtros deben ser libres de químicos susceptibles de inhibir el crecimiento y desarrollo bacteriano, que posean una velocidad de filtración satisfactoria, ausencia de influencias significativas sobre el pH del medio (no más de ± 0.2 unidades) y que no produzcan un aumento en el número de colonias confluentes o expansivas, en comparación con los filtros de membrana en expansión. (APHA, 1992).

3.3.2 Tipos de Filtros de Membrana:

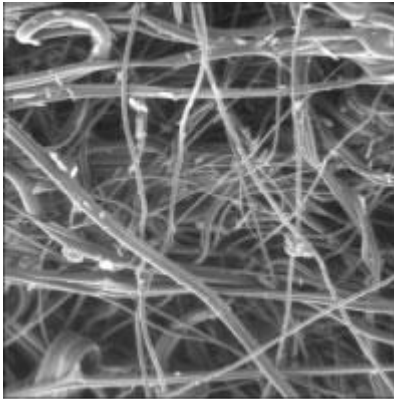
3.3.2.1 Filtros de Profundidad

Los filtros de profundidad funcionan interceptando y absorbiendo las partículas en forma directa (atracción molecular de partículas). Estos filtros utilizan distintos tipos de medios para lograr el objetivo de almacenar partículas. El fluido debe hacer un recorrido más largo por el filtro antes de salir. En general, estos filtros tienen mayor capacidad de almacenamiento e inicialmente poseen una mayor resistencia al flujo.

(<http://www.harvardcorp.com/es/filtration-process/surface-depth-filters.html>).

Presentan una elevada capacidad de retención y retienen las partículas tanto en la superficie como en el interior; generalmente se fabrican de fibras de celulosa, vidrio o silicato magnésico natural y fibroso.

FIGURA 3: Filtro de Profundidad



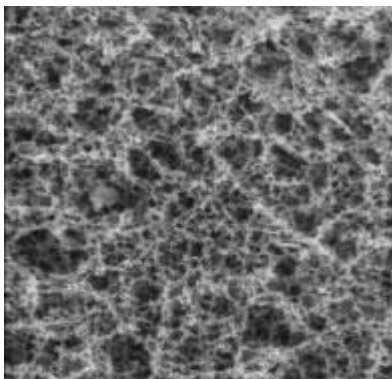
FUENTE: http://www.quiminet.com/imagen/millipore_01.jpg

3.3.2.2 Filtros de superficie o membrana

Los filtros de membrana son filtros de superficie y todas las partículas quedan retenidas en la superficie del filtro. Tienen una estructura y distribución de poro uniforme lo que permite determinar con exactitud el tamaño máximo de las partículas que lo atraviesan. Tienen un grado de filtración absoluto y una elevada velocidad de flujo y están fabricadas con una mezcla de nitrato y acetato de celulosa de naturaleza hidrofílica, biológicamente inerte y con una buena estabilidad térmica. Los filtros de membrana son ideales para la clarificación y esterilización de soluciones biológicas, soluciones acuosas o el análisis microbiológico de aguas, bebidas etc. (<http://comerciallabor.com/documents/filtros%20membrana.pdf>)

Se elaboran generalmente de acetato de celulosa o nitrato de celulosa.

FIGURA 4: Filtros de Superficie



FUENTE: http://www.quiminet.com/imagen/millipore_02.jpg

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es un sustrato o solución de nutrientes en donde crecen, y se multiplican los microorganismos, con el objetivo de aislar diferentes especies de microorganismos que induzcan al desarrollo de estrategias complementarias de identificación, cuantificación, caracterización de la microflora (Tortora G, 1993). De la inocuidad y de la capacidad de recuperación del medio de cultivo, así como de su posterior manipulación dependen en gran medida los resultados de una prueba microbiológica. (Tortora G, 1993).

Los medios de cultivo se clasifican según su origen:

- **NATURALES:** son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.
- **SINTÉTICOS:** son los medios que contienen una composición química definida cualitativa y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.

- SEMISINTÉTICOS son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura. (<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>).

Según su consistencia

- LÍQUIDOS: se denominan caldos y contienen los nutrientes en solución acuosa.
- SÓLIDOS: se preparan añadiendo un agar a un medio líquido (caldo) a razón de 15 g/litro. El agar es una sustancia inerte polisacárida (hidrato de carbono) que se extrae de las algas. Como esta sustancia no es digerida por las bacterias no constituye ningún elemento nutritivo. Este conjunto convenientemente esterilizado puede ser vertido en placas de Petri o en tubos de ensayo y presentan la posibilidad de aislar y diferenciar bacterias, "procesos que antes no eran posibles en medio líquido".
- SEMISÓLIDOS: contienen 7,5 g de agar /litro de caldo. Se utilizan para determinar la motilidad de las especies en estudio. Actualmente se encuentran disponibles comercialmente con el agregado de agar. (<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>).

Según su composición: A causa de los requerimientos químicos del mundo microbiano, a veces es necesario agregar o eliminar componentes químicos del medio.

- COMUNES O UNIVERSALES: su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos poco existentes. Es el medio más frecuentemente utilizado para mantener colonias microbianas. Por ejemplo: agar común o caldo común.
- ENRIQUECIDOS: están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero, líquido ascítico, etc. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales.

- **SELECTIVOS:** son sólidos en los que la selectividad se consigue alterando las condiciones físicas del medio o añadiendo o suprimiendo componentes químicos específicos con el fin de inhibir el crecimiento de especies químicas cuyo crecimiento no interesa. Este tipo de medio sólo permite el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. Se utiliza para seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Por ejemplo Agar salado-manitol o Chapman (permite el crecimiento de ciertos estafilococos). (<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>).

3.4.1 Medios Cromógenos

Los medios cromogénicos contienen nutrientes tales como peptonas, aminoácidos, extracto de levadura, minerales y vitaminas, además de inhibidores, gelificantes y sustrato cromogénico o cromógenos. Se ha comprobado que los sustratos cromogénicos son una herramienta potente en la identificación de microorganismos, debido a la detección de enzimas específicas producidas por los microorganismos en estudio. El principio de los medios cromogénicos son los sustratos cromogénicos como ONPG, X-Gal, o X-Glu junto con una selectividad específica del medio. Los microorganismos de estudio se caracterizan por tener sistemas de enzimas específicas que son responsables de la escisión del sustrato en el interior del cromógeno. Con el fin de separar el sustrato, la unión entre las dos partes del cromógeno se rompe por la enzima. De ese modo, los cromóforos son liberados y pueden ser detectados visualmente mediante la observación de un cambio de color en el medio. (<http://www.condalab.com/pdf/ChromogenicMediaSpanish.pdf>). Son medios rápidos, sencillos y fiables para detectar actividades enzimáticas específicas de varios organismos. (Tortora, G, 1993).

3.4.1.1 Ventajas De Los Medios Cromógenos

1. Menor tiempo en dar resultado comparado con los métodos tradicionales tanto negativo como presunto positivo. Algunos medios confirman resultado en 24 horas.
2. Con solo medio se puede identificar más de un organismo. Si adquirimos cada medio específico para más de un organismo, el medio cromogénico es más barato.
3. La interpretación del resultado es visual sin la necesidad de habilidades especiales o de instrumentos.
4. Los medios cromogénicos eliminan la necesidad de análisis bioquímicos adicionales para la identificación del agente patógeno.
5. La virulencia de un determinado microorganismo se puede detectar simultáneamente con su diferenciación y selección. Las pruebas de coagulasa y fibrino-lisina también se pueden llevar a cabo de forma simultánea en el medio.
6. Los medios cromogénicos se componen de nutrientes y hacen posible la supervivencia de los microorganismos dañados que están a punto de desaparecer.
(<http://www.condalab.com/pdf/ChromogenicMediaSpanish.pdf>).

3.4.1.2 Medio Chromocult Para Coliformes

Es un agar selectivo para el crecimiento de coliformes totales y E. coli en muestras de aguas y alimentos. Por la acción conjunta de peptonas selectivas, piruvato y tampón de fosfatos se garantiza un rápido crecimiento también de coliformes con daños sublaterales. El contenido de lauril sulfato inhibe el crecimiento bacterias

Gram positivas sin tener influencias negativas sobre el crecimiento de los coliformes. La formación simultánea de coliformes totales y *E. coli* se hace posible por la nueva formación de dos sustratos cromógenos: el sustrato Salmon-Gal es separado por la enzima β -D-galactosidasa característico de coliformes y provoca una coloración roja de las colonias de coliformes. (MERCK).

La formación de la β -D-glucoronidasa característica para *E. coli* tiene lugar mediante el sustrato X-glucoronido, que al ser cortado por la enzima produce una coloración azul para las colonias positivas. Ya que *E. coli* separa tanto Salmo-Gal como X-Glucoronido, las colonias se tiñen de violeta azul oscuro y debido a ellos se pueden diferenciar de los coliformes restantes que presentan coloración rojiza. (MERCK).

4 METODOLOGÍA

Para el desarrollo del procedimiento se llevaron a cabo las siguientes fases:

4.1 FASE I: DIAGNOSTICO

- Elaboración de un cronograma para el desarrollo del proyecto.
- Observación de la actual metodología usada en el laboratorio para la determinación de coliformes fecales y totales en agua.
- Observación de las pautas y protocolos que actualmente se siguen para la toma de muestra.
- Observación de las condiciones actuales del laboratorio de microbiología de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC.

4.2 FASE 2: DOCUMENTACIÓN

- Consulta de la normativa vigente para la calidad de agua potable.
- Consulta y lectura de los fundamentos de la determinación de coliformes fecales y totales en agar chromocult.

4.3 FASE 3: IMPLEMENTACIÓN

- Realización de los cambios necesarios en el actual procedimiento usado para la determinación de coliformes fecales y totales.
- Elaboración del manual de laboratorio para el análisis microbiológico de agua potable.
- Elaboración de un documento para la realización adecuada de toma de muestra para posterior análisis microbiológico.

5 PROCESO DE DESARROLLO

La propuesta de este proyecto surgió para dar respuesta a una de las carencias del laboratorio de microbiología de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC, los cuales prestan sus servicios a diversos acueductos ubicados en el municipio de Dosquebradas.

El presente proyecto recoge el procedimiento a seguir por parte del analista para realizar la determinación de Coliformes Totales y E. coli en agar chromocult mediante la técnica de filtración por membrana.

5.1 FASE I: DIAGNOSTICO

5.1.1 Ubicación

El presente trabajo se desarrolló en Colombia en el Departamento de Risaralda, Municipio de Dosquebradas en la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC.

5.1.2 Exploración

Se observaron las condiciones actuales del laboratorio de microbiología para establecer las mejoras que sean necesarias en caso de que las hubiera. Se realizó la constatación de las normas y parámetros que hasta el momento se habían establecido en el laboratorio, en lo referente a seguridad.

5.2 FASE II: DOCUMENTACION

Se dio inicio a la recolección de la información acerca de la técnica usada en la actualidad por los analistas del laboratorio, igualmente se procedió a la consulta de

la normativa vigente para agua potable; al finalizar la consulta y recolección de datos necesarios se pasó al análisis de la información.

5.3 FASE III: IMPLEMENTACION

Se llevó a cabo el cambio de medio de cultivo, se pasó de utilizar agar ENDO, el cual presentaba problemas al momento de realizar el conteo de las colonias, por lo tanto el medio de cultivo actual es el agar Chromocult.

6 FASE DE PRODUCCIÓN

En todo laboratorio se requiere de una serie de guías y/o manuales que ayuden e indiquen al analista cual es la metodología a seguir para obtener unos resultados adecuados y que se ajusten a la legislación vigente.

El principal objetivo de este trabajo fue la elaboración de un documento base para la realización de los análisis en el área microbiológica del laboratorio de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC.

Dicho manual incluye:

- Metodología para la adecuada toma de muestra.
- Normas de seguridad en el laboratorio
- Materiales y reactivos
- Procedimiento
- Análisis y lectura de resultados

Por ultimo en esta etapa se presentan las conclusiones y recomendaciones que se generaron a partir de la información recolectada durante el tiempo que duro la práctica empresarial.

7 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La legislación colombiana en el Decreto 1575 de 2007 Artículo 2 define que un laboratorio para el análisis de agua para consumo humano es aquel establecimiento público o privado, donde se realizan los procedimientos de análisis de las características físicas, químicas y microbiológicas del agua para consumo humano.

Los laboratorios de análisis microbiológicos tienen la responsabilidad de realizar sus procedimientos siguiendo las pautas y metodologías establecidas y aceptadas por los organismos de control. De los buenos procedimientos realizados en los laboratorios dependen no solo factores económicos, sino también la salud pública y las buenas condiciones de vida de la población; es por esto que se hace necesario que los laboratorios cuenten con una serie de guías y/o manuales en los que se establezca los pasos a seguir para realizar el análisis de las diversas características o parámetros a medir.

Con el desarrollo de este trabajo se logró obtener un manual de procedimiento para el área de microbiología, que servirá de guía y/o apoyo a los analistas que allí laboran, dado que dicho manual contiene la metodología a seguir por parte del analista desde el momento de toma de muestra hasta el momento de lectura y análisis de la información obtenida por medio de dichas pruebas.

Se constató que el agar Chromocult es más adecuado como medio de cultivo, para las condiciones actuales del laboratorio, ya que proporciona una mayor fiabilidad

para el conteo de las colonias que aparecen, debido a que la coloración que adquieren de azul-violeta para E. coli y rojo-salmón para coliformes totales son de fácil observación por parte del analista, en contra posición al agar Endo que venía siendo usado en el laboratorio y que presentaba problemas al momento de realizar el conteo, ya que en ocasiones la diferencia entre las colonias no era percibida por el ojo del analista.

Ante la observación inicial de las condiciones actuales del laboratorio, se sugiere la instalación de un fregadero dentro del área microbiológica, para así evitar que se puedan presentar contaminaciones durante los momentos que se requiere usar y/o lavar material por parte del analista, de igual manera la instalación de la autoclave dentro del área microbiológica y el anclaje o aseguramiento de la incubadora a un mueble o pared donde quede completamente fija para así evitar posibles accidentes.

De igual manera se sugiere que las diversas muestras microbiológicas que son analizadas sean tomadas por el analista para evitar posibles contaminaciones que interfieran en la adecuada realización y análisis de la prueba. Igualmente se sugiere cambiar los actuales frascos usados para la toma de muestra por frascos Scott que tengan una mayor capacidad de volumen, para que así el analista cuente con una muestra que le permita realizar en caso de ser necesario un nuevo análisis proveniente de la misma muestra.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- APHA-AWWA-WPCF, 2000. Métodos normalizados para el análisis de agua Potable y Residual. 17 Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. 1147 Págs.
- ESCOBAR, M. 2002. Fundamentos de Microbiología. Tercera Edición. Ceja. Bogotá, Colombia. Págs. 202-204.
- Filtros de Membrana 47 MM.
<http://comerciallabor.com/documents/filtros%20membrana.pdf>.
- GOMEZ, M.; PEÑA P.; VASQUEZ, M. 1999. Determinación y diferenciación de EscherichiaColi y Coliformes Totales usando un sustrato cromógeno. Laboratorio Central. Aquagest. Galicia, España.
- HAYES, 1993. Microbiología e Higiene de los Alimentos. ACRIBIA. Zaragoza, España.
- ICONTEC. NTC 813. Agua Potable.
- INSTITUTO NACIONAL de SALUD INS,2011. Manual de Instrucciones para la Toma, Preservación y Transporte de Muestras de Agua de Consumo Humano para Análisis de Laboratorio.
- LERMA, Héctor Daniel. Metodología de la investigación (Propuesta, anteproyecto y proyecto). Eco ediciones. Colombia. (2001). 161 p.

- MANAFI, M. 1998. New approaches for the fast detection of indicators in particular enzyme detection methods (EDM).
- Medios Cromogénicos.
Pronadisa.<http://www.condalab.com/pdf/ChromogenicMediaSpanish.pdf>, 4 de octubre de 2014.
- Medios de Cultivo. Facultad de Agroindustrias, Universidad Nacional del Nordeste.
<http://www.biologia.edu.ar/microgeneral/tp4.pdf>, 4 de octubre de 2014
- MERCK. Manual de medios de Cultivo. 2000.
- MILLIPORE 2005. Análisis Microbiológico. Madrid, España.
- Ministerio de la Protección Social. 2007. Decreto 1575. Por medio del cual se establece el sistema de la protección y control de la calidad del agua para consumo humano.
- Ministerio de la Protección Social. 2007. Resolución 2115. Por medio de la cual se señalan las características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.
- NEIDHART, F. C. 1999 Bacterial growth: constant obsession with dN/dt.
- OCASINO, N. Y LOPEZ, M. 2004. El Uso Del Cloro En La Desinfección Del Agua

- ORELLANA, J. Características del Agua Potable.
http://www.fro.utn.edu.ar/repositorio/catedras/civil/ing_sanitaria/Ingenieria_Sanitaria_A4_Capitulo_03_Caracteristicas_del_Agua_Potable.pdf, 10 de Septiembre de 2014.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD.1987.'Guías Para La Calidad Del Agua Potable. Volumen 2. Criterios Relativos A La Salud y Otra Información Base
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 'Guías Para La Calidad Del Agua Potable. Volumen 1. Primer Apéndice a la Tercera Edición.'
- PEARCE. 2007. Introduction to membranes: Filtration for wáter and wastewater treatment. Filtration&Separation.
- Recuento de Coliformes Totales, Filtración A Través De Membrana.
http://virus.usal.es/Web/demo_fundacua/demo2/FiltraMembColiT_auto.html, 20 de septiembre de 2014.
- ROMERO, J.1999. Potabilización Del Agua. Tercera Edición. Editorial Alfa Omega. México D.F
- ST: Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association. 20 Ediiion. Washington D.C, USA.
- Tipos de Filtros de Superficie y Profundidad, Harvard Corporation.
<http://www.harvardcorp.com/es/filtration-process/surface-depth-filters.html>, 20 de septiembre de 2014.
- TORTORA, G. 1993. Introducción a la Microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

9 ANEXO 1

MANUAL DE PROCEDIMIENTO PARA LA ADECUADA TOMA DE MUESTRA

La toma de muestra para un análisis microbiológico es de vital importancia; del cuidado y correcto procedimiento que tengamos al momento de realizar el muestreo, dependerán en buena parte los buenos resultados del análisis.

Al momento de tomar la muestra debemos tener en cuenta todos los criterios y precauciones para evitar una posible contaminación. Pese a que existen diversas metodologías y procedimientos al momento de realizar la toma de muestra.

Los criterios para localizar los puntos de recolección de las muestras de agua para consumo humano en la red de distribución, el número mínimo de estos puntos de muestreo, su identificación, el acta de concertación de puntos y lugares de muestreo entre la Persona

Prestadora y la Autoridad Sanitaria competente y la materialización de estos puntos de muestreo están consignados en la Resolución número 0811 de 2008 “Por medio de la cual los ministerios de la Protección Social y de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial definieron los lineamientos a partir de los cuales la Autoridad Sanitaria y las Personas Prestadoras concertadamente definieron en su área de influencia los lugares y puntos de muestreo para el control y la vigilancia de la calidad del agua para consumo humano en la red de distribución”. (Manual Toma de Muestras de Agua, INS)

En el caso de las muestras que nos competen, estas son tomadas desde un punto fijo, previamente establecido y mediante muestreo manual.

OBJETIVO

Indicar los criterios y el correcto procedimiento a seguir para realizar la toma de muestra para análisis microbiológico de la calidad del agua en el laboratorio de la Asociación Municipal de Acueductos Comunitarios AMAC.

Recipientes para la toma de muestra:

Para la toma de muestras microbiológicas, se usaran frascos de vidrio esterilizable. Los frascos de vidrio deben ser de borosilicato u otro vidrio neutro, provistos de tapa rosca hecha de metal o plástico. Las tapas de metal deben ser forradas con un protector no tóxico que evite el contacto directo entre el metal y la muestra. La ventaja de los vidrios borosilicatados o vidrios Pyrex es que son más resistentes que otros vidrios al choque térmico, es decir, resisten variaciones rápidas de temperatura sin rajarse. (Manual Toma de Muestras de Agua, INS)

Deben tener una capacidad de mínimo 300 mL, esto con el objetivo de llenarlos hasta una capacidad de 250 mL y dejar así un espacio vacío que facilite la supervivencia de los microorganismos aerobios; ser de boca ancha, con tapa protectora y cierre hermético para evitar escapes de agua y filtración de contaminación.

Los recipientes serán proporcionados por el analista del laboratorio, el cual deberá realizarles la limpieza y lavado adecuados, para lo cual los someterá a esterilización en húmedo durante 20 minutos a 121 ° C y 1 atmósfera de presión en autoclave.



FUENTE: https://www.google.com.co/search?q=frascos+schott&es_sm=93&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=qZtOVKrxMu

Limpieza y Desinfección De Los Puntos De Muestra:

Los procedimientos de lavado y desinfección de los grifos, o llaves de agua, o dispensadores de agua, previos a la recolección de la muestra y que se describen

a continuación, son indispensables para garantizar la representatividad de la muestra recolectada. Se debe proceder de la siguiente manera:

Cualquiera que sea el accesorio que descarga el agua, éste se debe limpiar y desinfectar con un paño limpio empapado en una solución de hipoclorito de sodio concentración del 5 al 10% de cloro activo. Las manos del operario deben estar protegidas con guantes para evitar quemaduras en la piel por la acción del hipoclorito, sustancia química oxidante y por supuesto corrosiva. Si el accesorio dispensador es metálico, la desinfección puede hacerse por temperatura aplicando durante un (1) minuto la llama (flamear) de un mechero de alcohol. Este procedimiento se puede realizar siempre y cuando el grifo metálico no esté conectado a un accesorio plástico que pueda resultar afectado por la temperatura transmitida por el metal al ser calentado por la llama.(Manual Toma de Muestras de Agua, INS)

PROCEDIMIENTO PARA LA ADECUADA TOMA DE MUESTRA

1. Realizar la actividad de muestreo, según cronograma previamente acordado con el laboratorio; y considerando las posibles intervenciones realizadas en la red de distribución.
2. Arribar al punto de toma según ruta, previo a la hora programada y revisar el tipo, protección, mantenimiento y cuidado del sitio y dispositivo de toma de muestra.
3. Alistar todo el material de recolección de muestras, que incluye el formato de acta de toma de muestra, los elementos de limpieza y desinfección del punto, los envases para recolección de las muestras, los equipos obligatorios para realizar los análisis en sitio, los materiales para preservación y transporte y elementos de protección personal necesarios para esta actividad.
4. Asear el sitio y revisar dispositivo de toma (grifo, válvula de globo, llave, corte rápido) que no haya fugas entre el tambor y el cuello. Limpiar el orificio de salida con una gasa o torunda de algodón con solución de hipoclorito u desinfectante y en los casos en que el material no sea plástico sino metálico, podrá flambearse con llama y limpiarse posteriormente con alcohol.

5. Abrir para purgar sistema, dejando fluir el agua mínimo 1 o más, para quitar la estanqueidad del tubo (tener presente pérdidas de aguas, sin detrimento de la purga) asegurando que el agua contenida en las tuberías ha sido renovada y la temperatura del agua se ha estabilizado para tomar las muestras definitivas.
6. La toma debe realizarse entre 3 y 5 minutos máximo, para considerar la toma como única en los procesos de vigilancia y control.
7. Realizar los análisis y registrar los resultados obtenidos del pH, Cloro.
8. Para realizar la toma de muestra siempre debe usar guantes nuevos y tapabocas; evitando las posibles contaminaciones a la muestra.
8. Recoger seguidamente, el volumen de muestra microbiológica, evitando contaminar el recipiente o dispositivo; dejar siempre cámara de aire en recipiente, tapar y refrigerar inmediatamente.

Por ultimo recuerde que del buen procedimiento de toma de muestra dependerán los resultados obtenidos en el laboratorio, por lo tanto la toma de muestra debe ser realizada con el mayor de los cuidados y siguiendo en todo momento el protocolo establecido.

