



Escuela Superior de Ciencias Experimentales y Tecnología

GRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Curso Académico 2023/24

Trabajo de Fin de Grado

**METODOLOGÍA SENCILLA Y ECONÓMICA DE
DETECCIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES EN
AGUA DE COMUNIDADES RURALES DEL
MUNICIPIO DE TELA (HONDURAS)**

**Proyecto de Aprendizaje Servicio nº 23/22.23 "Cuidado de los
ríos y educación hídrica en comunidades rurales de Honduras"**

Autora: Marina Navarro Díaz

Tutora: Nuria Navarro Andrés

Índice

Resumen	2
Introducción y objetivos	3
Material y métodos	6
Bacterias coliformes.....	6
Medios de cultivo.....	6
Área de estudio	7
Fechas de realización del proyecto	11
Experimentos en el laboratorio	11
<i>Citometría de flujo</i>	14
Muestras y análisis del agua en el municipio de Tela (Honduras).....	16
<i>MC-Media Pads</i>	18
Educación hídrica.....	19
Resultados	20
Experimentos en el laboratorio	20
<i>Citometría de flujo</i>	21
Muestras y análisis del agua de los ríos de Tela (Honduras)	22
<i>MC-Media Pads</i>	23
Educación hídrica.....	29
Discusión	30
Conclusiones	32
Líneas futuras de investigación	32
Agradecimientos.....	32
Bibliografía.....	33
Anexo	37

Resumen

Las enfermedades derivadas de la contaminación del agua por bacterias coliformes suponen la segunda mayor causa de mortalidad infantil a nivel mundial y, en Honduras, una gran parte de los hogares no dispone de agua de consumo y depende del agua purificada ofrecida por el sector privado, lo cual supone un gasto fijo añadido a la economía doméstica. Este trabajo propone un método sencillo y económico de análisis de estas bacterias, relativamente rápido (24-48 h, dependiendo de la concentración), muy visual y fácil de enseñar y asimilar, para así empoderar a las comunidades rurales de áreas con un sistema de depuración y potabilización de aguas pobre o inexistente. Al mismo tiempo, pretende determinar las concentraciones mínimas de *E. coli* detectables mediante el método propuesto en el laboratorio y en tres cuencas del Municipio de Tela (Honduras). Para ello, la metodología ha consistido en realizar experimentos en los laboratorios de la Universidad Rey Juan Carlos a fin de determinar su viabilidad y buen funcionamiento general para después recrearlos *in situ* en Honduras, utilizando *Google Earth* como herramienta de trabajo para establecer los puntos en los que se recogen las muestras y así tener una imagen clara del área de trabajo. Asimismo, se han realizado diferentes cálculos para organizar los datos de forma concisa en tablas y figuras.

En este trabajo se ha obtenido un nivel mínimo de concentración bacteriana que permite detectar el método, siendo este $1,27 \times 10^4$ células/ml. Además, las concentraciones encontradas en las cuencas hondureñas de las que las poblaciones rurales se abastecen resultan alarmantes. Se concluye que estas zonas precisan de mayor atención por parte de la Administración pertinente y del colectivo científico. Es fundamental mejorar el tratamiento de las aguas y continuar con este proyecto para detectar posibles episodios de contaminación por bacterias coliformes y preservar la salud pública. Se hace especial hincapié en la importancia de incluir a la población local con sus conocimientos y costumbres en la implantación de esta propuesta; pues las personas, el arraigo y la tradición son importantes y parte del territorio, y no se podría llevar a cabo sin ellos.

Introducción y objetivos

El agua es un líquido imprescindible para el desarrollo de la vida tal y como es conocida y, a su vez, un recurso valioso para la salud, el bienestar y la recreación de las personas. Sin embargo, su uso y consumo puede suponer un gran riesgo si se encuentra contaminado. Los patógenos provenientes de las excreciones de humanos y otros animales son especialmente preocupantes, ya que pueden producir enfermedades, infecciones e incluso la muerte (Fleisher, 1985; Pruss, 1998; PAHO, 2003).

Este tipo de contaminación es un problema latente en las aguas en América central y del sur debido en gran parte a la falta de sistemas de depuración de las aguas domésticas y a su consecuente vertido directo a cuerpos de agua (Galv, 2003). A esto, se suman las defecaciones en los mismos por parte de personas y animales domésticos y salvajes.

Las bacterias coliformes son ampliamente utilizadas como indicadores de contaminación hídrica, pues su presencia en el agua refleja una probable contaminación fecal (Larrea-Murrell et al., 2013), dado que muchas de ellas habitan en el tracto intestinal del hombre y de otros animales (Madigan et al, 2015). Una de las enfermedades que producen las bacterias coliformes es conocida como “síndrome diarreico infantil”. Este síndrome es responsable de una tasa de mortalidad infantil alarmante: alrededor de 525.000 niños fallecen cada año, siendo la segunda causa mundial de mortalidad infantil según la Organización Mundial de la Salud (2018b). Especialmente, la bacteria *Escherichia coli* (bacteria coliforme) es responsable de producir infecciones diarreicas moderadas o graves en países con escasez de saneamiento (OMS, 2018a). Se estima además que 2.200 millones de personas no tienen acceso a servicios de agua potable gestionados de forma segura (Naciones Unidas, 2020).

Para detallar la calidad microbiana del agua, se establece una normativa en la que se describen los métodos de análisis de coliformes, así como sus límites de aceptabilidad. En la industria del agua se busca constantemente mejorar la sensibilidad y velocidad de las pruebas para lograr un seguimiento del agua tratada y de aquella que proviene de fuentes naturales sin procesar; por ello, existen métodos novedosos para la detección de coliformes (la detección basada en actividad enzimática, la citometría en fase sólida, las técnicas inmunológicas, de reacción en cadena de la polimerasa y de hibridación in situ). Sin embargo, estas herramientas más sofisticadas presentan ciertas limitaciones, como la duración de la incubación, la interferencia de organismos antagonistas, la falta de especificidad para el grupo coliforme y un nivel débil de detección de coliformes de crecimiento lento o estresados; a lo que se suma la necesidad de disponer de personal especializado para llevar a cabo los análisis y el alto coste económico de los mismos (Rompré, A. et al., 2002).

Hoy en día, la técnica del filtro de membrana es la más utilizada y es el método designado en Europa y en España, según la norma UNE EN ISO 9308-1 (BOE, 2009). Otros países europeos aprueban técnicas complementarias; por ejemplo, la Asociación Francesa de Normalización (1985) aprueba también técnicas de fermentación en tubos múltiples además del filtro de membrana, según la norma NF

T90-413. Estos métodos son usados asimismo en países del continente americano como México, Honduras y Nicaragua (Secretaría de Salud, 2015; Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud y Comité Técnico Nacional de Calidad del Agua, 1995; Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, Ministerio de Fomento, Industria y Comercio, 2003). Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (1989) propone la prueba de presencia/ausencia, además de respaldar las anteriores.

Todas las técnicas de análisis mencionadas en la normativa anterior implican la necesidad de disponer de personal especializado y laboratorios de microbiología, que implican un coste elevado.

En cuanto a los límites de aceptabilidad, ni la normativa de la Unión Europea ni la EPA admiten la presencia de ningún coliforme en aguas de consumo humano, coincidiendo con lo establecido en la normativa de Brasil (Diario Oficial de la Unión Europea, 2020; EPA, 2013; Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2017). En América Central, la Norma Técnica Nacional (NTN) para la Calidad del Agua Potable de la República de Honduras (1995) recomienda también la ausencia de coliformes totales y fecales, aunque admite un máximo de 3 UFC/100ml para coliformes totales en aguas de abastecimiento entubada o el agua no tratada que entra en el sistema de distribución; mientras, Nicaragua establece el límite en <1,1 UFC/100ml (CNNyCTC, MFIC, 2004). En otros países del continente americano encontramos diferentes límites: la Norma Oficial Mexicana para el agua de uso y consumo humano, establece el límite de coliformes fecales permisible como <1 UFC/100ml y el límite de aceptabilidad establecido en la República del Perú es de 5 UFC/100ml coliformes totales (en aguas superficiales que pueden ser potabilizadas con desinfección) y 2 UFC/100ml para coliformes fecales (SS, 2022; Ministerio del Ambiente, 2017).

En un contexto de crisis climática (Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico, 2020) y de cumplimiento con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030 (Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030, 2023), es latente la necesidad de proteger este precioso recurso que es el agua, así como a las personas más vulnerables, y ayudar a que las zonas con mayor riesgo de exclusión y pobreza puedan disponer de sistemas que permitan detallar la calidad de las aguas de consumo y mejorar las prácticas de higiene. Así, este trabajo se realizó dentro del proyecto de Aprendizaje Servicio nº 23/22.23 “Cuidado de los ríos y educación hídrica en comunidades rurales de Honduras”, en relación con el ODS 6 (garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible y el saneamiento para todos), y con sus metas 6.b (apoyar y fortalecer la participación de las comunidades locales en la mejora de la gestión del agua y el saneamiento) y 6.2 (de aquí a 2030, lograr el acceso a servicios de saneamiento e higiene adecuados y equitativos para todos y poner fin a la defecación al aire libre, prestando especial atención a las necesidades de las mujeres y las niñas y las personas en situaciones de vulnerabilidad); y el ODS 3 (Garantizar una vida sana y promover el bienestar para todos en todas las edades) y con sus metas 3.9 (de aquí a 2030, reducir sustancialmente el número de muertes y enfermedades producidas por productos químicos peligrosos y la contaminación del aire, el agua y el

suelo) y 3.2 (de aquí a 2030, poner fin a las muertes evitables de recién nacidos y de niños menores de 5 años).

Centrando el proyecto en el territorio de estudio, según datos de UNICEF (2016), la problemática en la República de Honduras respecto al abastecimiento de agua es grave y multifacética. El 44,7% de los hogares carecen de acceso a agua potable y esta situación se ve agravada por la contaminación fecal en los ríos de ciertas comunidades rurales. Este es el caso de las comunidades ubicadas en el municipio de Tela, donde se han observado problemas de salud asociados con el consumo de agua. La municipalidad no dispone de depuradora y los sistemas de potabilización con cloro muchas veces no son utilizados, debido bien a la turbidez del agua tras fuertes tormentas tropicales, o a la falta de mantenimiento de las instalaciones. Además, la falta de equipos de protección para el personal de las plantas de potabilización hace difícil la manipulación de los productos químicos necesarios para el tratamiento de las aguas.

Pese a estos problemas en la calidad del agua, las comunidades recurren al agua de las cuencas para una variedad de actividades cotidianas como la cocina, el aseo y el baño recreativo o para hacer la colada. Debido a que las comunidades no disponen en la actualidad de vertedero oficial, los ríos se perciben como medio para deshacerse de residuos y sirven también como abrevaderos para diferentes animales, tanto salvajes como domésticos y de libre pastoreo.

En la municipalidad de Tela existen dos organismos encargados de controlar la calidad del agua. Por un lado, las Juntas de Agua del casco urbano Mezapa son organizaciones comunitarias que administran la distribución de agua potable en el área urbana y pretenden garantizar un acceso equitativo y eficiente al recurso para los residentes. Por otra parte, la División Municipal de Aguas de Tela (DIMATELA) gestiona el suministro y tratamiento del agua en la ciudad y debe asegurar que el agua suministrada a los ciudadanos sea potable y cumpla con los estándares de calidad establecidos. A pesar de haber llevado a cabo análisis de calidad del agua de los prestadores urbanos en mayo y diciembre de 2022 y haber señalado la ausencia de contaminación por bacterias coliformes fecales, existe escepticismo entre los residentes respecto a la calidad de las aguas y la población opta por consumir agua embotellada en lugar de la proveniente del suministro municipal (DIMATELA, 2022). Según un análisis económico del consumo de agua en Tela, realizado por Flores Velásquez et al. (2022), se consumen ocho botellones de 5 galones (aproximadamente 18,93 l) de agua embotellada al mes, pagando un precio promedio de 25 lempiras (0,93 €). Cada año, la población del casco urbano de la ciudad de Tela gasta 30.426.600 lempiras (1.098.298 €) en consumo de agua.

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente respecto a la problemática de la contaminación de las aguas, este trabajo tiene como objetivo general diseñar e implementar una metodología sencilla y de bajo costo que detecte la presencia de bacterias coliformes en agua. A su vez, se plantean como objetivos específicos la evaluación de la viabilidad y precisión del método propuesto en un entorno controlado en el laboratorio, así como en mediciones directas del agua de las cuencas de la municipalidad de Tela (Honduras).

Material y métodos

Bacterias coliformes

Las bacterias coliformes (tanto totales como fecales o termotolerantes), comprenden una amplia diversidad de géneros y especies (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*), de la familia Enterobacteriaceae, que comparten unas ciertas características bioquímicas comunes.

La Asociación Francesa de Normalización (AFNOR, 1985) define a los coliformes totales (CT) como bacterias no esporuladas, Gram negativas, aeróbicas o facultativamente anaeróbicas, capaces de fermentar la lactosa y producir gas y ácido (o aldehído) en 48 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Dentro de los coliformes totales se engloba el subgrupo de los coliformes fecales, el cual es importante al realizar valoraciones sobre la salubridad del agua (Madigan et al., 2015). Los coliformes fecales, también llamados termotolerantes, tienen las mismas propiedades que los coliformes totales, pero a $44 \pm 0,5^\circ\text{C}$. La presencia de *E. coli* se asocia principalmente con la contaminación fecal, siendo común en la flora intestinal de animales de sangre caliente. Aunque dentro de los coliformes fecales hay especies de bacterias de origen ambiental, es decir, que provienen del agua, vegetación o suelo, el agua potable no deberá contener *E. coli*. La especie *E. coli* se encuentra dentro del género *Escherichia* (Cabello, 2015) y puede provocar infecciones gastrointestinales y fiebre generalizada (Madigan et al., 2015). Tienen un efecto inhibitorio sobre otros patógenos que pudieran suponer un perjuicio al hospedador, pero hay cepas que sí pueden resultar patógenas y originar efectos negativos: infección, sepsis, meningitis, enteritis y enterocolitis (diarrea del turista). En cuanto a las pruebas bioquímicas, esta bacteria es positiva al indol, descarboxilasa de lisina, fermentación de manitol y gas a partir de glucosa y es lactosa positiva (Larrea-Murrell et al., 2013; Rompre et al., 2002; Montville y Matthews, 2009).

Medios de cultivo

Teniendo en cuenta que las bacterias coliformes totales y fecales fermentan la lactosa y producen gas y ácido (o aldehído) en 48 h a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, se escoge la leche entera como medio de detección. En este proyecto, también se empleó el MC-Media Pad de la marca Merck como método de detección para evaluar las concentraciones de coliformes totales y *E. coli*. Cada cien unidades de estos pads tienen

un costo de 320 €, lo que implica un gasto aproximado de 80 € para analizar las 24 muestras recogidas en el Municipio de Tela. Además, para el análisis de las muestras de agua contaminada en el laboratorio, se utiliza un citómetro cuyo precio oscila entre los 96.420 € y 135.144 € (VWR International, 2024).

En comparación, el medio seleccionado presenta un precio económico (alrededor de 1 € por litro, generalmente) y amplia disponibilidad en el mercado, con lo que se pretende proporcionar una herramienta de costo asequible para analizar la calidad del agua y empoderar a los más vulnerables.

Área de estudio

La República de Honduras es un país localizado en América Central. Tiene una extensión territorial de 112,492 km² y está dividido en 18 departamentos (Instituto Nacional de Estadística, 2024). Limita al norte con el Golfo de Honduras y el Mar Caribe, al este con Nicaragua, al sur con el Golfo de Fonseca y El Salvador, y al oeste con Guatemala (Secretaría de Relaciones Exteriores y Cooperación Internacional de Honduras, 2022). En la figura siguiente, se muestra la situación geográfica del municipio de Tela (jurisdicción del departamento de Atlántida) en la costa norte de la República de Honduras, área donde se ha aplicado el proyecto.



Figura 1: Se indica la localización del municipio de Tela con un punto azul en el mapa de la República de Honduras. Elaboración propia a partir de Google Earth.

El proyecto se pone en práctica en tres comunidades rurales del Municipio de Tela, realizando los muestreos de la calidad del agua en tres cuencas hidrográficas de la municipalidad, las cuencas de Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek, donde se realizaron muestreos en conjunto con la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (sede de Tela). Los puntos de recolección de muestras se encuentran en la zona 16P de coordenadas UTM.

- Río Lancetilla

La cuenca hidrográfica del río Lancetilla abarca un área de gran importancia ecológica en la región y desempeña un papel vital en el ecosistema local, en la provisión de agua para la agricultura y el consumo humano. La cuenca alberga una gran diversidad de flora y fauna, y también es el hogar del Jardín Botánico Lancetilla, un referente en la conservación de la biodiversidad del país (UNACIFOR, 2023). El río Lancetilla nace de la cordillera Nombre de Dios, es alimentado por 13 quebradas diferentes y abarca una longitud total de 10,5 km hasta su desembocadura (SERNA, CATIE y Municipalidad de Tela, 2005). En esta cuenca se tomaron muestras de agua el día 12 de julio de 2022, cuyos puntos de recogida quedan reflejados en la figura siguiente.

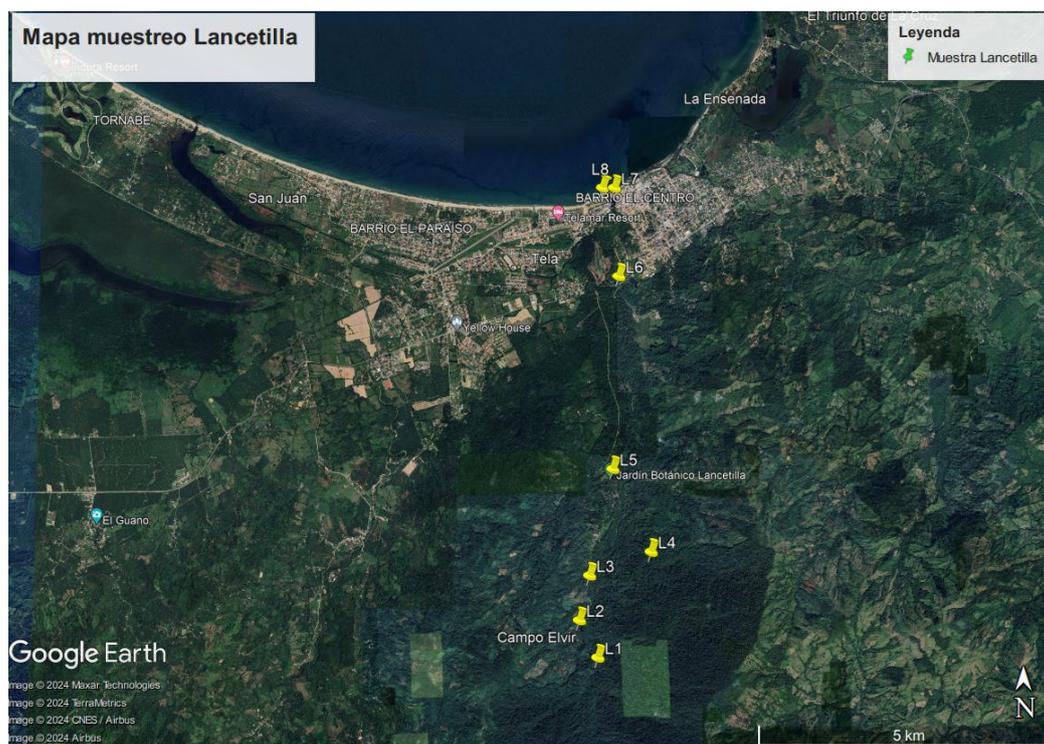


Figura 2: Se indican los puntos de muestreo de agua con marcadores amarillos en la cuenca del río Lancetilla. Punto 1: Represa grande Lancetilla. Punto 2: Quebrada Las Moncadas. Punto 3: Quebrada tanque. Punto 4: Represa pequeña, arriba. Punto 5: Quebrada La Primavera. Punto 6: Carretera CA5. Punto 7: Puente Nuevo Boulevard. Punto 8: Mar frente a contaduría. Elaboración propia a partir de Google Earth.

En la figura 2 se observan los puntos de obtención de muestras de agua a lo largo del cauce, en la cuenca del río Lancetilla. Las muestras se recogen en ocho puntos diferentes, marcados como L1-L8, desde el nacimiento hasta la desembocadura del río en el mar.

- Río La Esperanza

En el caso de la cuenca del río La Esperanza, su drenaje principal está formado por el río La Esperanza, con 9,5 km de longitud. También cuenta con varios afluentes y quebradas de invierno. La cuenca desemboca en la Laguna de Tornabé (Ponce Salgado, J. A, 2011). Los muestreos en esta cuenca se tomaron el día 13 de julio de 2022, cuyos puntos de obtención se localizan en la figura siguiente.

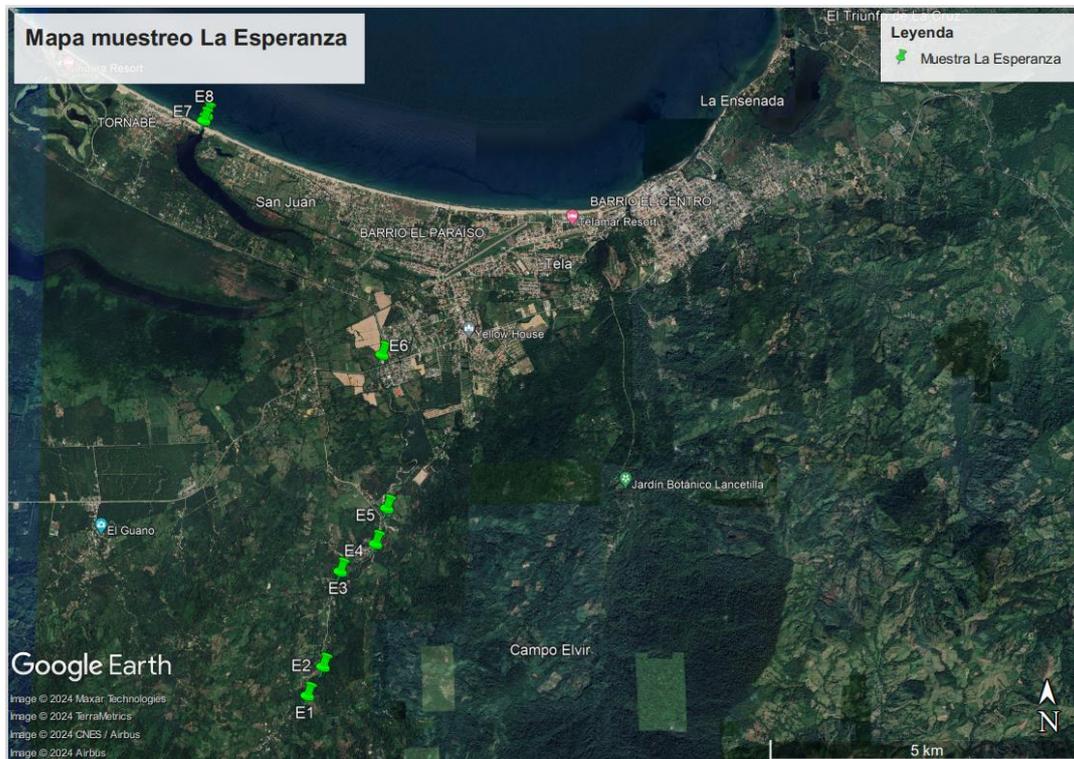


Figura 3: Se indican los puntos de muestreo de agua con marcadores verdes en la cuenca del río La Esperanza. Punto 1: Punto arriba del cruce camino-río. Punto 2: Detrás de la represa en el cruce con carretera. Punto 3: Detrás del Colprosumah, balneario de la comunidad. Punto 4: Puente color amarillo, entrada Colprosumah. Punto 5: Comunidad La Esperanza. Punto 6: Posta policial/puente. Punto 7: Laguna Tornabé. Punto 8: Mar frente a Laguna Tornabé. Elaboración propia a partir de Google Earth.

En la figura 3 se muestran en verde los puntos en los que se recogieron muestras de agua a lo largo del recorrido del río, indicando con la letra “E” que se trata de las obtenidas en la cuenca del río de la comunidad de La Esperanza. Los puntos de obtención de muestras se reflejan como E1-E8, habiéndose tomado un total de ocho muestras desde el nacimiento de río hasta su desembocadura en la laguna, incluyendo una muestra en el área marítima próxima a la laguna.

- Río Highland Creek

La cuenca de Highland Creek tiene gran importancia económica, pues las comunidades desarrollan aquí su actividad ganadera tanto intensiva como extensiva. Se encuentra, en gran porcentaje deforestada por diferentes causas (compañías bananeras, asentamientos humanos, ...) (Ponce Salgado, J. A., 2011). El río Highland Creek nace en la parte sur del municipio y tiene una longitud de 7,5 km, encontrando su desembocadura en el mar. Presenta dos afluentes: Piedras Gordas y El Cedro (SERNA, CATIE y Municipalidad de Tela, 2005). En esta cuenca se toman muestras el día 19 de julio de 2022; los puntos de recolección se encuentran representados en la figura siguiente.

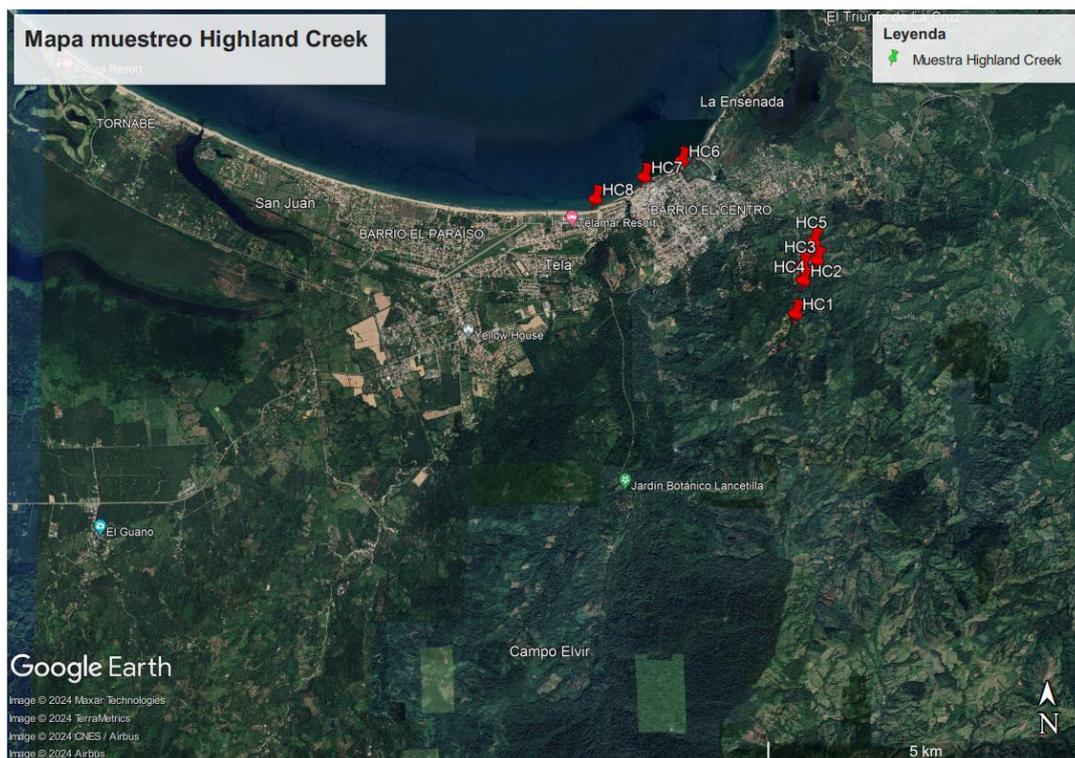


Figura 4: Se indican los puntos de muestreo de agua con marcadores rojos en la cuenca del río Highland Creek. Punto 1: Vado del río. Punto 2: Represa de la Comunidad de Piedras Gordas. Punto 3: Debajo del balneario. Punto 4: Detrás de la represa de Piedras Gordas. Punto 5: Vado debajo represa Piedras Gordas. Punto 6: Barrio Lempira. Punto 7: Hotel Puerto Rico, playa. Punto 8: Zona del muelle, frente a canchas deportivas Telamar. Elaboración propia a partir de Google Earth.

En la figura 4 se marcan en rojo los puntos de colecta de muestras, indicando con “HC” que se trata de las obtenidas en la cuenca del río de Highland Creek. Los puntos de obtención de muestras se reflejan como HC1-HC8, tomando ocho muestras desde el nacimiento de río hasta su desembocadura en el mar.

Fechas de realización del proyecto

El método planteado en este proyecto se pone en práctica *in situ* en el municipio de Tela (Honduras) durante los meses de julio y agosto de 2022. Previa y posteriormente, desde el mes de abril de 2022 hasta el mes de mayo de 2023, se realizaron diversos experimentos en el laboratorio de la Universidad Rey Juan Carlos, a fin de evaluar la viabilidad y precisión del método.

Experimentos en el laboratorio

El método propuesto se prueba en el laboratorio de la URJC (España) para verificar su fiabilidad y precisión. En la tabla 1 se describe el material necesario para ponerlo en práctica en el laboratorio.

Tabla 1: Material necesario para la realización de los análisis según el método propuesto en el laboratorio. Elaboración propia.

Laboratorio	
Leche entera	Agua destilada
Tubo de ensayo (8+1)	Probeta de 10 ml (2)
Pipeta (2)	Probeta de 500 ml
Estufa	Vaso de precipitados (2)
Asa de siembra	Frasco de 1 l
Mechero	Siembra de <i>E. coli</i> en placa AN/EMB

En el laboratorio es necesario mantener la esterilidad del entorno de trabajo, por lo cual deben seguirse ciertos protocolos: es necesario colocar hojas de papel de filtro de laboratorio que cubran la mesa de trabajo, llevar guantes de látex y una bata de laboratorio. El material debe ser autoclavado previamente; tras esto, se puede comenzar con el experimento.

En primer lugar, se recrea una muestra de agua contaminada con distintas concentraciones de *E. coli*; para ello, se toma la probeta de 500 ml y se rellena con agua de grifo hasta alcanzar el volumen deseado. Parte de ese volumen se vierte en un tubo de ensayo, al que se le rotula como “AC. 1”; esto es, “Agua Contaminada 1”. El “1”, hace referencia al número de muestras a realizar en una misma sesión. En caso de hacer más muestras de agua, se rotularían como: “AC. 2, AC. 3, ..., AC. N”.

Después, se toman otros 8 tubos de ensayo. Estos son rotulados del 1 al 8, con la información siguiente: fecha, muestra de agua a la que corresponden (p. ej.: AC.1) y el porcentaje de leche entera y agua que contienen. Estos porcentajes se establecen de la siguiente forma:

Tabla 2: Porcentajes de leche (L), agua destilada (AD) y agua contaminada (AC) añadidos a cada vial.

Elaboración propia.

Nº tubo	Porcentaje Leche - Agua
1	100% L
2	50% L - 50% AD
3	75% L - 25% AD
4	25% L - 75% AD
5	100% L + <i>E. coli</i>
6	50% L - 50% AC
7	75% L - 25% AC
8	25% L - 75% AC

Habiendo rotulado los tubos correctamente y haciendo uso de una de las probetas de 10 ml y una de las pipetas, se procede a añadir la leche (L) en los tubos de ensayo 1-8. El volumen máximo añadido es de 10 ml de leche, en las muestras 1 y 5 (100% L), mientras que el mínimo es de 2,5 ml, correspondiente a las muestras 4 y 8 (25% L). Una vez finalizado este proceso, se pipetea el agua destilada (AD) requerida en la segunda probeta de 10 ml para añadirla luego en los tubos 2, 3 y 4, donde el volumen es de 5 ml, 2,5 ml y 7,5 ml, respectivamente. Los tubos 1-4 sirven como controles para las muestras a realizar, pues permiten saber si ha ocurrido alguna anomalía en el experimento debido a la calidad de la leche.



Figura 5: Trabajo en campana, inoculación de aguas con *E. coli* (Tomada en los laboratorios de la URJC, 2022).

Después, se toma el tubo AC 1 rotulado al inicio y el tubo 5, el asa de siembra, el mechero y la placa con cepa *E. coli* de la estufa y se llevan a campana, como se puede ver en la figura 5. Es necesario desinfectar la campana antes de utilizarla; para esto, se hace uso de la luz UV durante 15 min y se desinfecta la superficie de trabajo con alcohol al 70% utilizando papel para secarlo.

Una vez desinfectada, se enciende la luz de trabajo y el flujo de aire. Con el mechero encendido y trabajando siempre cerca de la llama, se flambea primeramente el asa de siembra al rojo, se enfría en una zona del agar donde no haya microorganismos y, tras esto, se toma cierta cantidad de los mismos. El tubo AC 1 es inoculado con la muestra recogida mediante el asa de siembra. Para el tubo 5, rotulado como “100% L + *E. coli*”, tal y como se describe en la tabla 2, se vuelve a realizar todo el proceso (flambeado, enfriamiento e inoculación).

Una vez se termina el trabajo en campana, es necesario volver a pulverizar el alcohol al 70% y prender la luz UV. La placa agar utilizada debe sellarse tras su uso con Parafilm antes de colocarse dentro de la estufa nuevamente. La estufa debe mantener una temperatura de 35-38°C y en el laboratorio mantiene una temperatura constante de 37°C, para asegurar la proliferación de bacterias en las placas de cultivo y la correcta coagulación de la lactasa.

Volviendo a la mesa de trabajo, el agua inoculada con *E. coli* del tubo de ensayo AC 1 es vertido en el frasco de 1 l. Se enjuaga el tubo dos o tres veces con el agua restante de la probeta de 500 ml, añadiendo esos enjuagues al frasco. A continuación, se vierte toda el agua de la probeta dentro del frasco y se enrasa con agua del grifo hasta alcanzar el volumen de disolución deseado. Así, se logra recrear la muestra de agua contaminada. En este punto, es posible reutilizar la pipeta y la probeta de 10 ml con las que se añade el agua destilada, puesto que no están contaminadas. El volumen de agua contaminada a añadir en los tubos 6, 7 y 8 queda descrito en la tabla 2, y es de 5 ml, 2,5 ml y 7,5 ml, respectivamente. Es imprescindible mover el frasco de agua contaminada antes de añadir estas medidas a cada tubo de ensayo para asegurar que la cantidad de bacterias queda distribuida uniformemente en lugar de decantarse en el fondo. Este paso puede realizarse haciendo uso de un vórtex o manualmente, dependiendo del volumen total de la muestra de agua contaminada. Una vez se terminan de añadir los volúmenes requeridos en cada tubo de ensayo, se procede a agitar cada uno de ellos mediante un vórtex para homogeneizar las mezclas. Debe realizarse con cuidado para no provocar derrames, pues los tapones no son herméticos y el contenido puede rebosar si la potencia del vórtex es demasiado alta. Los tubos, una vez homogeneizados, son colocados dentro de la estufa a 37°C por un mínimo de 24 h. Pasado este tiempo se observan los resultados obtenidos en cada tubo, señalando la presencia de bacterias coliformes en una muestra de agua si aparece coagulación de la leche.

Si los resultados no son concluyentes, los tubos se pueden dejar dentro de la estufa 48 h en tanto que no haya coagulado ningún control. La figura 6 muestra, a modo de ejemplo, cómo se observa de forma directa la ausencia de *E. coli* en los controles y su presencia en la muestra de leche y agua contaminada después de 24 h.



Figura 6: se muestran los resultados obtenidos de una muestra de agua contaminada con E. coli tras 24 h. De izquierda a derecha: control de leche CL1 (100%L), control de leche inoculado con E. coli CL5 (100%L + E. coli) y muestra de leche y muestra de leche con agua contaminada ML7 (75%L-25%AC). Tanto CL5 como ML7 muestran coagulación, lo que indica presencia de E. coli. Tomadas en el Laboratorio URJC (experimento 56, 27-06-2022).

Como se muestra en la Figura 6, el control de leche CL1 (100% leche) no presenta coagulación. Tanto el vial CL5 (100% leche + E. coli) mostrado en el centro, como la muestra de leche y agua contaminada ML7 (75% leche-25% agua contaminada) a la derecha, exhiben grumos por fermentación de la lactosa, indicando presencia de bacterias coliformes.

Citometría de flujo

Para cuantificar la concentración de *E. coli* en las muestras de agua contaminada y evaluar la precisión del método propuesto se empleó citometría de flujo. Esta caracterización es muy sensible, pues permite determinar la cantidad de células por microlitro de una muestra y separarlas del ruido de fondo.

El citómetro de flujo utilizado es el CytoFLEX de Backman Coulter, equipado con tres láseres (violeta, azul y rojo) y trece parámetros de detección de fluorescencia que cubren el espectro visible. Los citómetros discriminan diferentes especies en una muestra dada basándose en la fluorescencia de sus pigmentos naturales. Al carecer las bacterias de pigmentos para la autofluorescencia, se utiliza la tinción del ADN celular. Se puede hacer uso de diferentes colorantes (SYBR Green I y II, SYTOX Green, SYTO, ...), siendo SYTO 13 el utilizado en este caso (Schirra y Zhang, 2014). En cuanto al procedimiento, se toman 400 μ l de cada muestra que se marcan con SYTO 13 a una concentración final de 5 micromolar durante 2 h, a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, en placa de 96 pocillos en el citómetro, se analizan 50 μ l de cada muestra con excitación de láser azul y detección a 525 nm (verde). En el laboratorio, se analiza un volumen estándar de 50 μ l en todas las muestras, ya que el equipo utilizado permite fijar este volumen sin necesidad de utilizar microesferas.

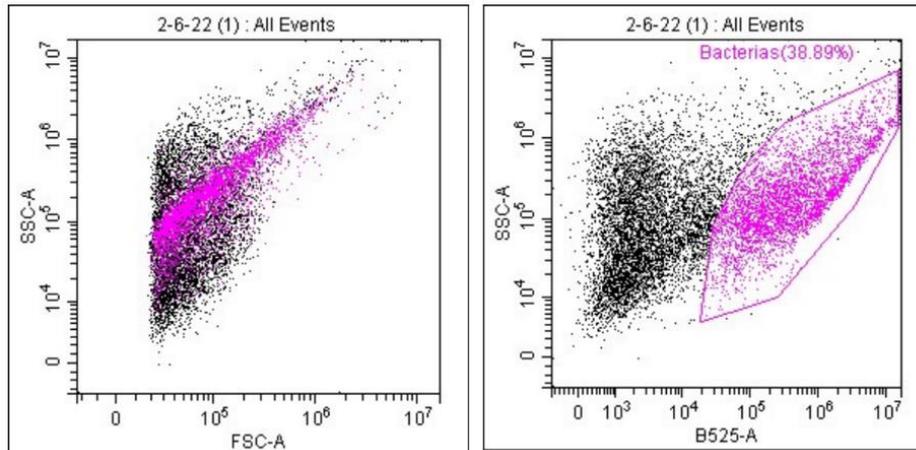


Figura 7: se muestra la agrupación de bacterias detectada por citometría de flujo. En magenta aparecen las células marcadas con SYTO 13 que emiten fluorescencia; en negro, el resto de eventos. Experimento número 43 (02-06-2022).

Para distinguir las bacterias del resto de eventos, se marca con SYTO 13, que se une al ADN y emite fluorescencia verde (B525 se refiere al conjunto de láser azul y detector centrado en 525 nm, esto es, excitación en luz azul y detección de luz verde); aquí, “bacterias” hace referencia a la concentración de *E. coli* detectada en una muestra de agua contaminada. El número total de eventos recogidos equivale a la suma de todas las partículas que pasan por el detector más algo de ruido electrónico (Figura 7).

Tube Name: 04-05-23 (1)			
Sample ID:			
Population	Events	% Total	% Parent
● All Events	1168	100.00%	100.00%
● Bacterias	634	54.28%	54.28%

Figura 8: Se señalan en magenta las bacterias marcadas con SYTO 13 en la citometría de flujo que emiten fluorescencia; en negro, el resto de eventos. Experimento número 85 (04-05-2023).

Se calcula la concentración de bacterias dividiendo el número de células obtenido en cada muestra por el volumen estándar de 50 μl , dando los resultados en célula/ μl y multiplicando estos resultados por 10^3 para convertirlos a célula/ml. Para los datos reflejados en la figura 8, la concentración se calcularía como:

$$\text{Concentración } E. coli = \left(\frac{634 \text{ células}}{50 \mu\text{l}} \right) \times 10^3 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}} = 1,27 \times 10^4 \text{ células/ml}$$

Muestreos y análisis del agua en el municipio de Tela (Honduras)

Esta metodología se ha llevado a cabo en tres cuencas de Tela (Honduras). En cada una de las mismas se recogen ocho muestras a distintas alturas del río, desde su nacimiento hasta su desembocadura, totalizando así 24 muestras recogidas. Estas muestras se analizan por el método propuesto de la leche y después con el medio MC-Media Pads, a fin de validar la presencia de bacterias coliformes totales y de *E. coli* en las aguas y determinar sus las concentraciones (en UFC/ml). A continuación se detalla el material necesario para aplicar el método propuesto:

*Tabla 3: Material necesario para la realización de los análisis según el método propuesto en Tela (Honduras).
Elaboración propia.*

Tela (Honduras)
Leche entera
Tubo de plástico (8+1)
Pipeta (2)
Agua purificada
Estufa
Lejía

El agua purificada que se menciona en la tabla 3, es el agua embotellada que beben los habitantes de las comunidades. La forma de proceder en los experimentos realizados en Tela (Honduras) es diferente a la que se sigue en el laboratorio. Al no disponer de un laboratorio de microbiología bien equipado (figura 9), las condiciones higiénicas y tecnológicas no son las óptimas, por lo que es necesario idear otras estrategias para compensar estos inconvenientes.

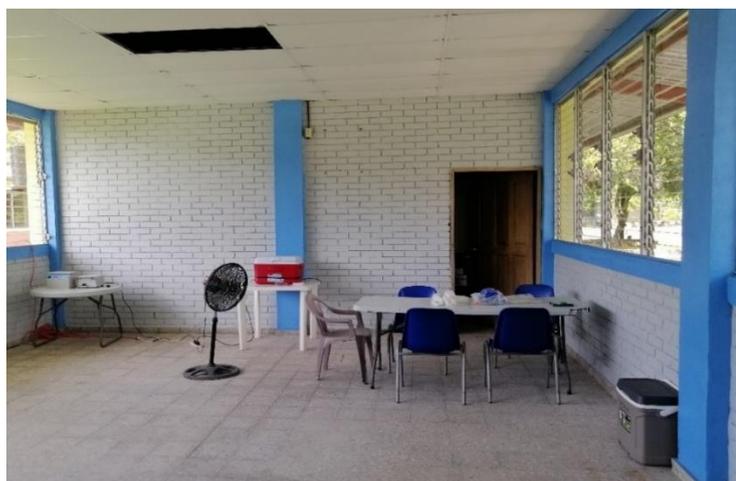


Figura 9: Laboratorio y espacio de trabajo en la Universidad Autónoma de Honduras en Tela.

Al no disponer de un autoclave en el espacio de trabajo, es necesario lavar todo el material con lejía y aclararlo con agua purificada (tabla 3). Se debe usar agua purificada en lugar de destilada para los controles en los tubos 2-4. El agua purificada sustituye a la destilada ya que esta última es difícil de conseguir en la zona. También es necesario contar con un aparato que pueda hacer de estufa, manteniendo una temperatura alrededor de 37°C. La entidad DIMATELA prestó una incubadora para este proyecto.



Figura 10: Se muestra la mini nevera convertida en estufa con bombilla regulable y termómetro en su interior, vista externa e interna (Tomada en la zona de trabajo de la UNAH, 2022).

Pese a tener una estufa disponible, se fabrica otra a partir de una mini nevera a la que se le añade una bombilla de intensidad regulable, cuya temperatura se mide con un termómetro, apreciable en la figura 10. Se pudo observar su buen funcionamiento, aunque se prefirió hacer uso de la estufa brindada por la municipalidad para asegurar la menor interferencia posible de factores externos en los experimentos.

Como se quiere estudiar si las aguas de la zona están contaminadas o no por bacterias coliformes, las muestras son tomadas en diferentes puntos de una misma cuenca hidrográfica. Las muestras se rotulan con la inicial o iniciales del lugar donde son recogidas junto al número de muestra que contienen (p. ej.: Highland Creek; HC 1, HC 2, ..., HC N). Después, estas son preservadas en una nevera con hielo durante el desplazamiento al espacio de trabajo en la Universidad de Tela.

Una vez en el espacio reservado para los experimentos, se rotulan los tubos de plástico como se indica en la tabla 2 y, así, se procede a pipetear los volúmenes de leche, agua purificada y agua contaminada indicados, procurando limpiar la superficie de trabajo y mantener la mayor higiene posible. Una vez preparadas las muestras, se cierran con el tapón, se agitan con la mano, se desenroscan ligeramente y se colocan dentro de la estufa disponible. Tras esto, solo queda asegurarse de que la estufa mantiene la temperatura correcta ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) y esperar 24-48 h.

MC-Media Pads

Las muestras obtenidas en Honduras se analizaron mediante el uso de MC-Media Pads (Merck) para garantizar la eficacia del método propuesto en un entorno donde los errores tanto humanos como de equipo podían ser significativos. Se trata de un medio de detección basado en la presencia de la enzima β -galactosidasa, lo que proporciona resultados fiables. Este medio cumple con la normativa internacional de alimentos y bebidas (AOAC PTM, AOAC OMA, ISO 16140-2); no obstante, se deben seguir las precauciones recomendadas, como almacenar adecuadamente las almohadillas y no utilizarlas después de la fecha de vencimiento. Los pasos para obtener resultados mediante estos pads son los siguientes: abrir la película de cobertura diagonalmente, inocular 1 ml de muestra (la cual se difundirá automáticamente), cerrar la película de cobertura e incubar, y finalmente contar los resultados (Merck, 2021).



*Figura 11: Resultado obtenido con el medio MC-Media Pad de la muestra de agua L4 recogida en la cuenca hidrográfica de Lancetilla (quebrada Las Moncadas, fig. 2), el 13-07-2022. El color azul-verde/azul muestra las unidades formadoras de colonias de coliformes totales (220 UFC/ml) y el color morado las de *E. coli* (7 UFC/ml).*

Como se puede observar en la figura 11, este medio consiste en una lámina que presenta una fina almohadilla deshidratada, cubierta con medios de crecimiento y sustratos para la detección específica, que permite obtener resultados rápidos. Tras la adición de 1 ml de muestra y la incubación a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h, los coliformes totales se manifiestan como colonias de color azul-verde/azul, mientras que las bacterias fecales *E. coli* aparecen en color morado (Teramura et al., 2019). Todas las colonias eran contadas manualmente una a una. En caso de que el número de colonias fuese tan alto que no se pudiera cuantificar, se le denominaba entonces “incontable”; se exhibe un ejemplo en la figura 12.

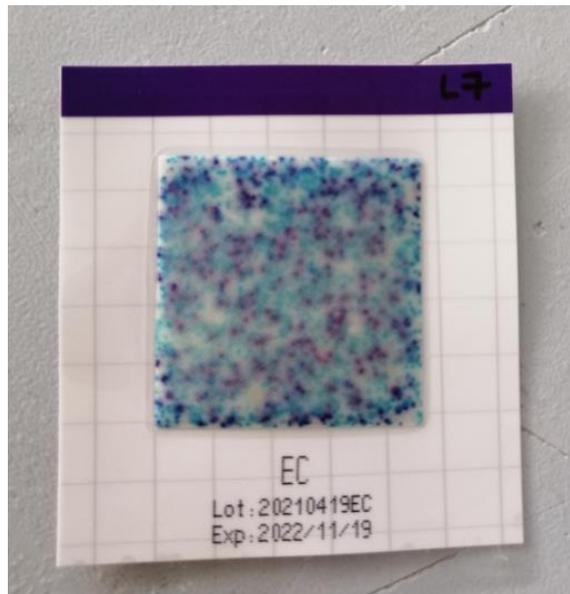


Figura 12: Resultado obtenido con el medio MC-Media Pad de la muestra de agua L7 recogida en la cuenca hidrográfica de Lancetilla (Puente Nuevo Boulevard, fig. 2), el 13-07-2022. Este punto presenta “incontables” colonias. El color azul-verde/azul muestra las unidades formadoras de colonias de coliformes totales y el color morado las de E. coli.

En la figura 12 se expone el análisis mediante MC-Media Pad de la muestra de agua contaminada recogida en Puente Nuevo Boulevard en el río Lancetilla (L7, fig. 2) en la que se encuentra una concentración de colonias que no es posible cuantificar a simple vista, por lo que se nombra como “incontable”.

Educación hídrica

Como parte del proyecto de Aprendizaje Servicio de “Cuidado de los ríos y educación hídrica en comunidades rurales de Honduras”, se llevó a cabo una iniciativa educativa en las comunidades rurales de Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek. Esta iniciativa implica la enseñanza del método de detección de bacterias coliformes utilizando leche, a través de sesiones teórico-prácticas en las escuelas locales. Esta actividad permitió a los alumnos analizar la calidad del agua de sus propios ríos, involucrándolos directamente en la importancia de controlar y proteger los recursos hídricos de su comunidad. Además, se organizaron jornadas de capacitación dirigidas a los miembros de las Juntas de Agua del casco urbano Mezapa, con el objetivo de fortalecer sus habilidades de gestión de la calidad del agua en la localidad. Esta estrategia integral busca fomentar una participación activa y consciente de la

población local en la preservación de la salud y el bienestar ambiental a través del control y la gestión adecuada del agua.

Resultados

Experimentos en el laboratorio

En el laboratorio de la URJC se llevaron a cabo 86 experimentos para poner a prueba la viabilidad, reproducibilidad y precisión del método propuesto.



Figura 13: Porcentaje de experimentos válidos (sombreado azul) y fallidos (sombreado rojo). Elaboración propia a través de datos obtenidos en laboratorio.

Para que un experimento sea considerado como válido, debe cumplir dos premisas: no haber coagulado en ninguno de los controles (CL 1-4) y sí haberlo hecho en el control en el que se inocula *E. coli* directamente (CL 5). Se puede apreciar en la figura 13 que 62 de los mismos (80,52%) fueron válidos, mientras que 24 de ellos (31,17%) no se consideraron válidos por no haber cumplido alguna de las dos premisas. Esto ocurrió al inicio de los experimentos por problemas de contaminación, que se resolvieron incrementando las medidas de esterilización.

Tras haber confirmado con un porcentaje elevado de experimentos válidos que el método propuesto era viable para analizar la presencia de bacterias coliformes en agua, se procede a evaluar qué proporción de leche y agua contaminada es óptima; para esto, se contabiliza el número de veces que cada porcentaje de leche ha coagulado.

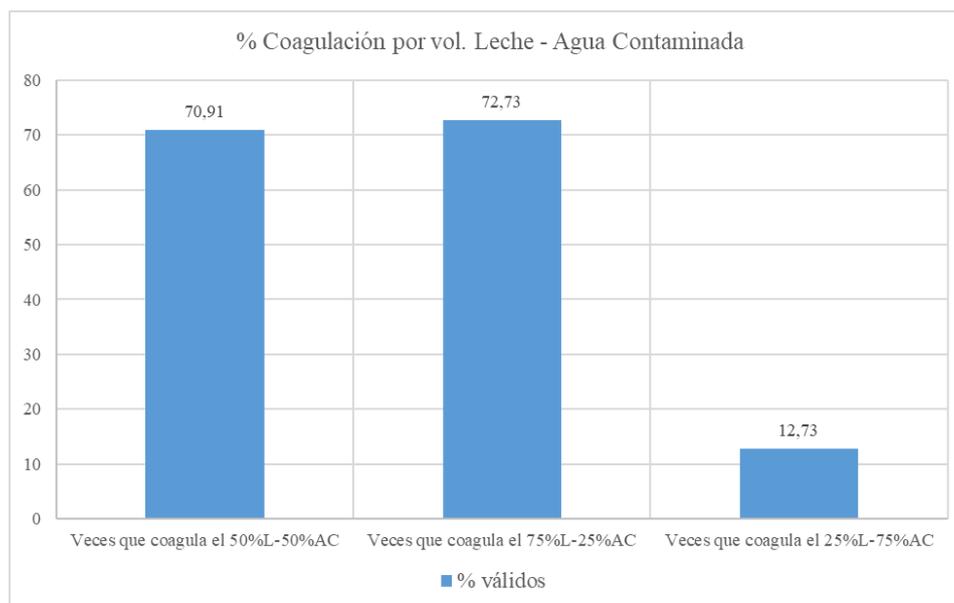


Figura 14: Porcentaje de coagulación según el volumen de leche (L) y agua contaminada (AC) presente en las muestras pasadas 24 h. Elaboración propia a partir de datos obtenidos en laboratorio.

Como se puede apreciar en la figura 14, los viales de muestra de leche (ML) 6 y 7, con proporciones a 50%-50% y 75%-25% de leche (L)-agua contaminada (AC) respectivamente, podrían ser utilizadas para determinar la presencia de coliformes de forma más rápida, pues ambos coagulaban en unos porcentajes similares (70,91% y 72,73%, fig. 11) en 24 h o menos. Por el contrario, la cantidad de *E. coli* añadida debía ser elevada, o el tiempo que se le daba al experimento mayor de 24 h, para que coagulasen aquellos con proporción 25% leche (L) -75% agua contaminada (AC). Los resultados desglosados pueden consultarse en la tabla 6 (Anexo).

Así, al presentar la proporción 75%-25% L-AC un porcentaje de coagulación ligeramente superior, es esta la utilizada en el análisis de las cuencas hidrográficas del municipio de Tela (Honduras) para reducir el tiempo de espera en los experimentos.

Citometría de flujo

En cuanto a la citometría de flujo, se analizaron 40 muestras de agua inoculadas con *E. coli* en el laboratorio de España. El rango de concentraciones en el que se ha trabajado oscila de $1,59 \times 10^5$ células/ml a $1,27 \times 10^4$ células/ml. Según los resultados de los análisis por citometría de flujo (tabla 7, Anexo), la concentración mínima recogida que ha permitido validar el método propuesto en el laboratorio es de $1,27 \times 10^4$ células/ml.

Muestras y análisis del agua de los ríos de Tela (Honduras)

Como se ha mencionado anteriormente en el apartado de Área de estudio (pág. 7), este método se prueba en tres cuencas hidrográficas del municipio de Tela: Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek. A continuación, se expone en la tabla 4 los resultados de la metodología propuesta que utiliza la leche entera como medio, utilizada para evaluar la presencia de coliformes en las 24 muestras.

Tabla 4: Resultados obtenidos mediante el análisis del método de la leche de las muestras recogidas (M1-M8) en la cuenca del río Lancetilla, del río La Esperanza y del río Highland Creek y sus respectivos controles (CL) tras 24 h. L indica “leche” y AP indica “agua purificada”; “Ausencia” indica que no se detectaron concentraciones de bacterias coliformes y “Presencia” indica que sí se detectaron. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

Experimento	Fecha	Muestra	Tratamiento	Resultados 24h
Lancetilla	13 de julio de 2022.	Control	CL 100%L	Ausencia
		Control	CL 75% L 25% AP	Ausencia
		M1	M 75% L 25% AP	Presencia
		M2		Presencia
		M3		Presencia
		M4		Presencia
		M5		Presencia
		M6		Presencia
		M7		Presencia
M8	Presencia			
La Esperanza	14 de julio de 2022.	Control	CL 100%L	Ausencia
		Control	CL 75% L 25% AP	Ausencia
		M1	M 75% L 25% AP	Presencia
		M2		Presencia
		M3		Presencia
		M4		Presencia
		M5		Presencia
		M6		Presencia
		M7		Presencia
M8	Presencia			
Highland Creek	19 de julio de 2022.	Control	CL 100%L	Ausencia
		Control	CL 75% L 25% AP	Ausencia
		M1	M 75% L 25% AP	Presencia
		M2		Presencia
		M3		Presencia
		M4		Presencia
		M5		Presencia
		M6		Presencia
		M7		Presencia
M8	Presencia			

En la tabla 4 se puede apreciar que los controles no detectaron coliformes en ninguno de los tres experimentos (proporción 75%L-25%AP seleccionada en la figura 14), y que todas las muestras de los ríos analizadas siguiendo el método propuesto evidenciaron presencia de bacterias coliformes tras haber pasado 24 h en la incubadora, incluyendo aquellas recogidas en zonas más altas e inaccesibles.

Para verificar que los resultados obtenidos mediante el método de la leche (tabla 4) son fiables, se cuantifican las concentraciones de coliformes totales y *E. coli* en UFC/ml para las tres cuencas haciendo uso del medio MC-Media Pad (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de las concentraciones bacterianas de coliformes totales y E. coli (UFC/ml) para las muestras recogidas en la cuenca del río Lancetilla (L1-L8, sombreado amarillo), La Esperanza (E1-E8, sombreado verde) y Highland Creek (HC1-HC8, sombreado rojo), utilizando el medio MC-Media Pad.

Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

Cuenca	Fecha del muestreo	Punto de muestreo	Cantidad de coliformes totales (UFC/ml)	Cantidad de coliformes fecales (UFC/ml)
Lancetilla	12 de Julio de 2022	L1. Represa grande Lancetilla	230	1
		L2. Quebrada Las Moncadas	131	0
		L3. Quebrada tanque	189	2
		L4. Represa pequeña. Parte de arriba	220	7
		L5. Quebrada La Primavera	380	4
		L6. Carretera CA5	582	2
		L7. Puente Nuevo Boulevard	Incontables	268
		L8. Mar frente contaduría	273	68
La Esperanza	13 de Julio de 2022	E1. Punto más arriba del cruce del camino con el río	331	6
		E2. Detrás de la represa en el cruce con carretera	288	12
		E3. Detrás Colprosumah, balneario de la comunidad	215	1
		E4. Puente color amarillo entrada Colprosumah	249	4
		E5. Comunidad de La Esperanza	308	3
		E6. Posta policial/puente	443	79
		E7. Laguna Tornabé	103	63
		E8. Mar, frente laguna Tornabé	9	0
Highland Creek	19 de julio de 2022.	HC1. Vado del río	527	14
		HC2. Represa de la comunidad Piedras Gordas	375	14
		HC3. Debajo del balneario	315	33
		HC4. Detrás de la represa de Piedras Gordas	177	7
		HC5. Vado debajo de la represa piedras Gordas	309	64
		HC6. Barrio Lempira	Incontables	Incontables
		HC7. Hotel Puerto Rico, playa	19	5
		HC8. Zona del muelle, frente a canchas deportivas de Telamar	32	2

En la tabla 5 podemos ver la concentración bacteriana de coliformes totales y *E. coli* en unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias coliformes por ml, de las cuencas de los ríos Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek. Las localizaciones geográficas de cada uno de estos puntos según su cuenca están recogidas en las figuras 2, 3 y 4, respectivamente. Las mayores concentraciones de bacterias coliformes y de *E. coli* se registran en el río Highland Creek, donde la muestra recogida en Barrio Lempira (HC6, fig. 4) presenta un número incontable tanto para las totales como para las fecales (tabla 5). En Lancetilla, las concentraciones de los coliformes totales son también incontables para la

muestra obtenida en el Puente Nuevo Boulevard (L7, fig. 2). Mientras, La Esperanza muestra unas concentraciones entre 9-331 UFC/ml de coliformes totales y 0-79 UFC/ml de *E. coli*.

- Río Lancetilla

La figura 15 muestra los resultados de las concentraciones de bacterias coliformes totales en UFC/ml obtenidos del río Lancetilla, expuestos anteriormente en la tabla 5.

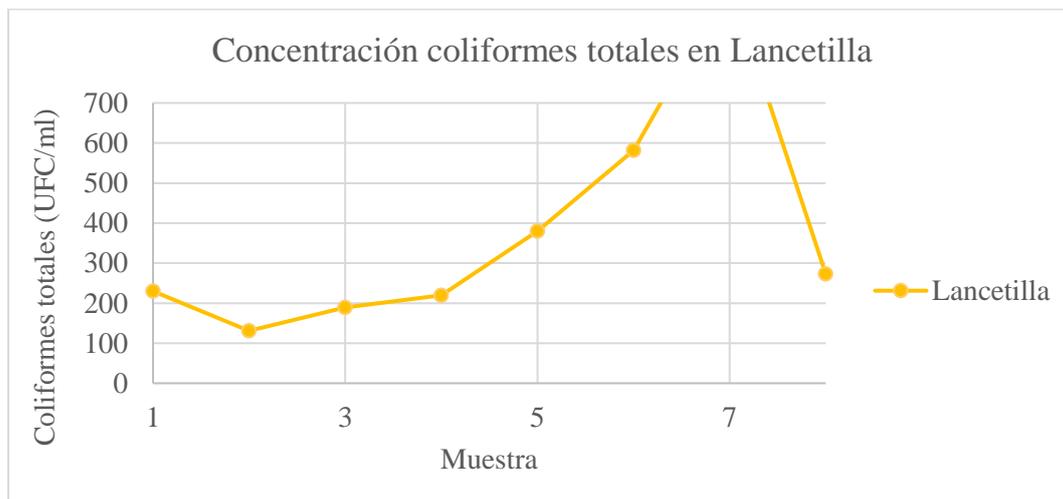
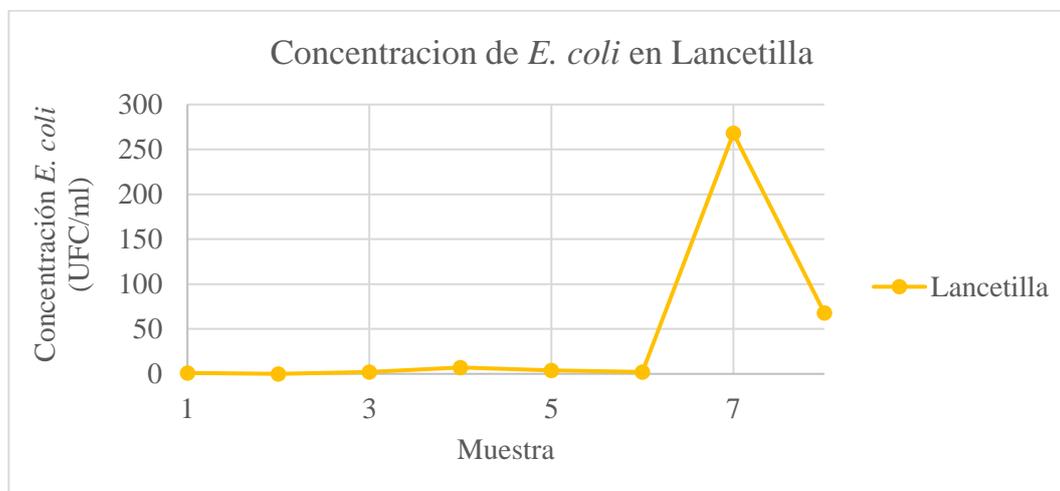


Figura 15: Concentración de bacterias coliformes totales en UFC/ml para las muestras recogidas en la cuenca del río Lancetilla, utilizando como medio MC-Media Pads. El punto de muestreo 7 presenta “incontables” colonias. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

Se puede advertir que es el río que presenta una menor concentración de bacterias coliformes totales en la cabecera, con 230 UFC/ml en la muestra de la Represa grande Lancetilla (L1, fig. 2; tabla 5). Pese a esto, es la cuenca que mayor concentración presenta en la desembocadura, con una concentración de 273 UFC/ml en el punto Mar frente a contaduría (L8, fig. 2). Esto puede deberse a que el nacimiento de este río se encuentra en una zona poco accesible para los habitantes del municipio, mientras que la desembocadura se encuentra en una zona de baño frecuente.

El punto de la que presenta la menor concentración en esta cuenca se obtiene en la Quebrada Las Moncadas (L2, fig. 2), con 131 UFC/ml. También presenta la concentración cuantificada más alta de las tres cuencas, con 582 UFC/ml, en el punto de la Carretera CA5 (L6, fig. 2) y es incontable en el Puente Nuevo Boulevard (L7, fig. 2), siendo ambas zonas altamente transitadas por los habitantes y animales callejeros de Tela.

En la figura 16 se reflejan los resultados de las concentraciones bacterianas de *E. coli* en UFC/ml obtenidos del río Lancetilla, previamente detallados en la tabla 5.



*Figura 16: Concentración de bacterias coliformes fecales *E. coli* en UFC/ml para las muestras recogidas en la cuenca del río Lancetilla, utilizando como medio MC-Media Pads. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.*

Como se muestra en la figura 16, el río Lancetilla es nuevamente el que presenta una menor concentración de *E. coli* en la cabecera, encontrando valores entre 0-0,07 UFC/ml para el rango de muestras L1-L6, desde la Represa grande Lancetilla hasta la Carretera CA5, siendo en la Quebrada las Moncadas (L2, fig. 2) donde encontramos 0 UFC/100mL.

Sin embargo, en el Puente Nuevo Boulevard (L7, fig. 2) se aprecia un valor bastante más acusado que el resto: 268 UFC/ml. Esta concentración elevada de *E. coli* es observada en el mismo punto en el que la concentración de coliformes totales es incontable, señalados anteriormente en la figura 15. Una vez más, es la cuenca con mayor concentración bacteriana en la desembocadura, con una concentración de 68 UFC/ml en el Mar frente a contaduría (L8, fig. 2).

- Río La Esperanza

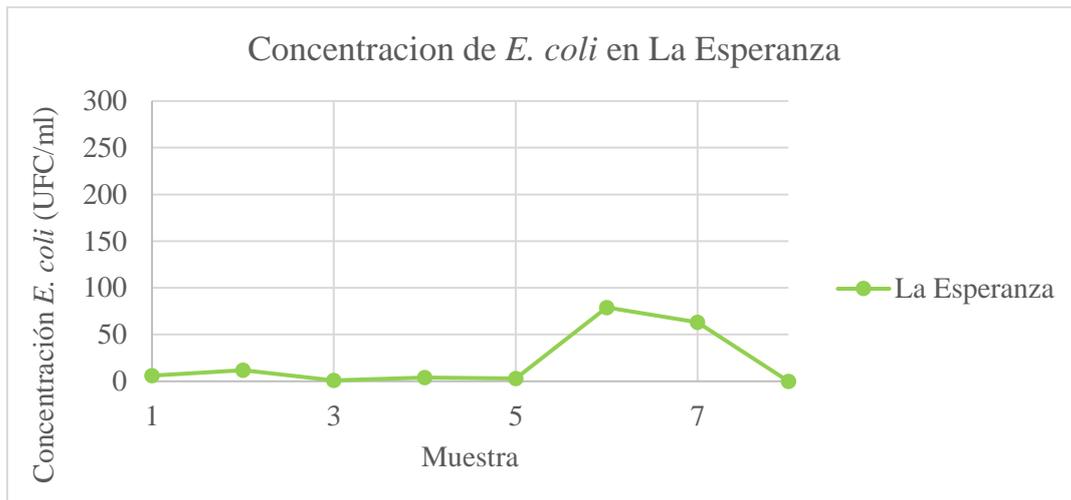
La figura 17 muestra los resultados de las concentraciones de bacterias coliformes totales en UFC/ml para el río La Esperanza (tabla 5).



Figura 17: Concentración de coliformes totales en UFC/ml para las muestras recogidas en la cuenca del río La Esperanza, utilizando como medio MC-Media Pads. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

La Esperanza se mantiene en un rango de concentración entre 331 y 215 UFC/ml desde el nacimiento en el Punto más arriba del cruce del camino con el río (E1, fig. 3) hasta el punto Comunidad de La Esperanza (E5, fig. 3), para después aumentar hasta 443 UFC/ml en el punto Posta policial/puente (E6, fig. 3). Los valores de concentración bajan drásticamente hasta 103 y 9 UFC/ml en los puntos de la desembocadura Laguna Tornabé y Mar, frente a laguna Tornabé (E7 y E8, fig. 3), llegando a ser esta última muestra el valor más bajo de coliformes totales registrado para las tres cuencas (tabla 5).

Los resultados de las concentraciones bacterianas de *E. coli* en UFC/ml obtenidos del río La Esperanza, detallados en la tabla 5, se muestran en la figura 18.



*Figura 18: Concentración de bacterias coliformes fecales *E. coli* en UFC/ml para las muestras recogidas en la cuenca del río La Esperanza, utilizando como medio MC-Media Pads. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.*

En cuanto a las concentraciones de *E. coli*, la figura 18 muestra que el río La Esperanza presenta unos valores entre 1 y 12 UFC/ml hasta el punto Comunidad de la Esperanza (E5, fig. 3). Después, la concentración aumenta hasta 79 UFC/ml en el punto Posta policial/puente (E6, fig. 3) y baja hasta 0 UFC/ml en E8 (coincidiendo con su punto más alto y bajo en cuanto a las coliformes totales, fig. 17).

- Río Highland Creek

La figura 19 muestra los resultados de concentraciones de bacterias coliformes totales en UFC/ml obtenidos para el río Highland Creek, desglosados en la tabla 5.

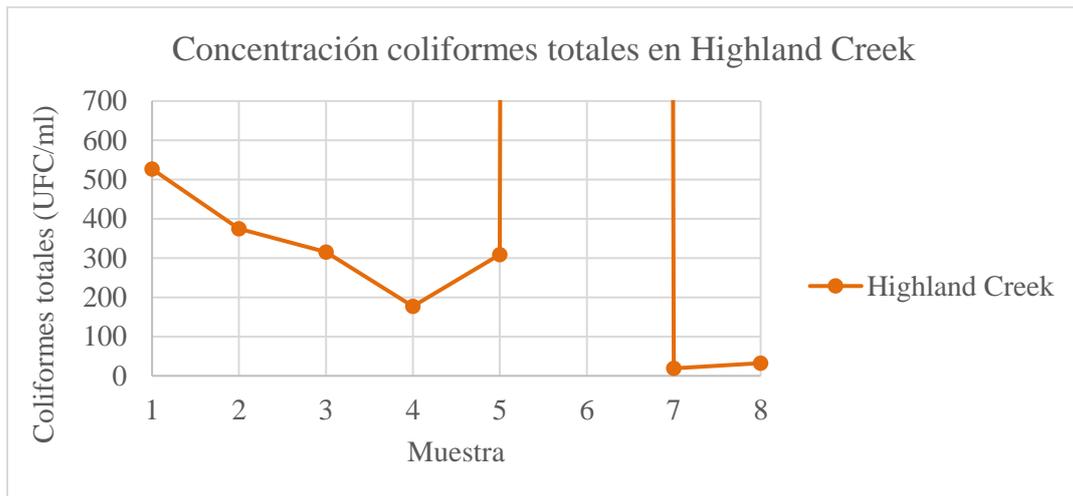


Figura 19: Concentración de coliformes totales en UFC/ml para las muestras recogidas en la cuenca del río Highland Creek, utilizando como medio MC-Media Pads. El punto de muestreo 6 presenta “incontables” colonias. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

Como refleja la figura 19, la cuenca de Highland Creek presenta los valores más altos en el nacimiento, con una concentración de 527 UFC/ml coliformes totales en el punto Vado del río (HC1, fig. 4). Este valor es comprensible dentro del contexto en el que se recoge la muestra, pues corresponde a una zona poblada, donde el agua es utilizada para la higiene personal y del hogar y donde existe una actividad ganadera especialmente extensiva.

A medida que el río se aleja del núcleo de población mencionado y hasta el punto Detrás de la represa de Piedras Gordas (HC4, fig. 4), desciende la cantidad de bacterias (de 527 a 177 UFC/ml). Tras esto, vuelve a aumentar la concentración hasta un nivel incontable en el punto Barrio Lempira (HC6, fig. 4), zona que acoge cuatro hoteles en sus alrededores. En la desembocadura, se obtienen concentraciones notoriamente más bajas, tanto en el punto Hotel Puerto Rico, playa como en el punto Zona del muelle, frente a canchas deportivas Telamar (HC7 y HC8, fig. 4), con valores de 19 y 32 UFC/ml, respectivamente.

La figura 20 representa los resultados de las concentraciones bacterianas de *E. coli* en UFC/ml del río Highland Creek, tal como se presentan en la tabla 5.

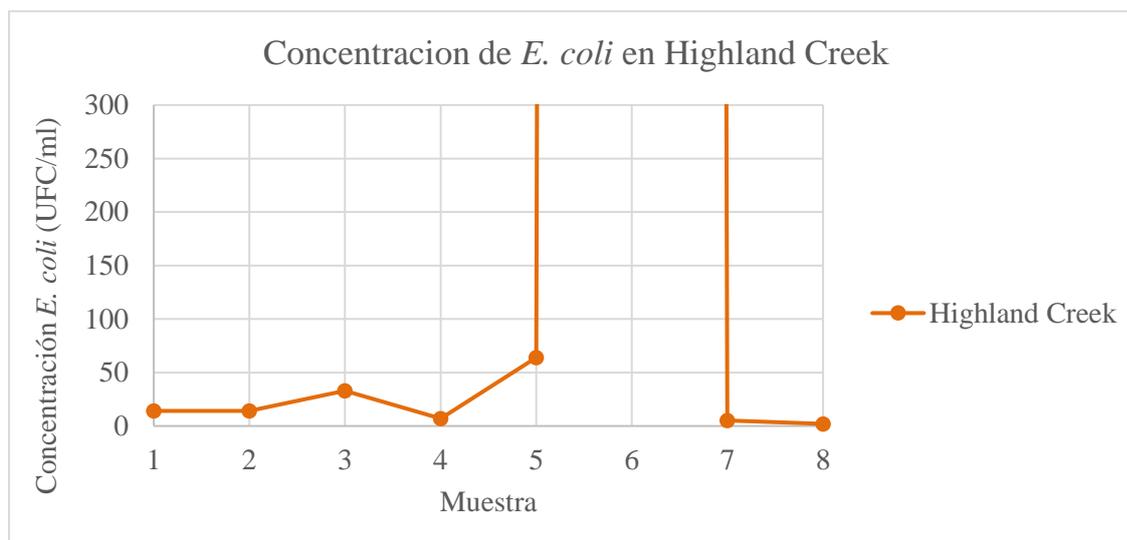


Figura 20: Concentración de bacterias coliformes fecales *E. coli* en UFC/ para las muestras recogidas en la cuenca del río Lancetilla, utilizando como medio MC-Media Pads. El punto de muestreo 6 presenta “incontables” colonias. Elaboración propia con datos obtenidos en Tela, Honduras.

En la figura 20, se observa que el río Highland Creek presenta una vez más las concentraciones de *E. coli* más altas en el nacimiento, comprendidos entre 7 y 64 UFC/ml entre los puntos Vado del río y Vado debajo de la represa Piedras Gordas (HC1-HC5, fig. 4). Pese a esto, también tiene el segundo valor más bajo de las tres cuencas en el punto Zona del muelle, frente a canchas deportivas Telamar (HC8, fig. 4), siendo este 2 UFC/ml. La muestra recogida en el punto Barrio Lempira (HC6, fig. 4), zona en la que se encuentran los cuatro hoteles, presenta nuevamente valores incontables de *E. coli*.

Educación hídrica

Gracias a las clases teórico-prácticas de educación hídrica ofrecidas como parte de este proyecto experimental en Honduras, se logró enseñar de manera exitosa el método de detección de bacterias coliformes utilizando leche. Estas clases beneficiaron a un total de 82 alumnos de las escuelas Josefa Lastiri de Morazán en Lancetilla y Manuel Bonilla en La Esperanza. Además, participaron activamente 21 miembros de las Juntas de Agua del casco urbano Mezapa, quienes también fueron capacitados en el uso de esta metodología. Este enfoque educativo permitió no solo transmitir conocimientos sobre la importancia de garantizar la calidad del agua, sino también involucrar a las comunidades locales en la implementación de prácticas simples de evaluación hídrica.

Discusión

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el laboratorio durante los experimentos realizados desde abril del 2022 hasta mayo del 2023, se observa que el método estudiado en este proyecto es sencillo y viable para realizar una primera evaluación de la calidad microbiana del agua. Su aplicación es rápida (menos de 24h en la mayoría de los casos) y económica, pues como material solo es necesario leche entera, un recipiente cubierto que permita la entrada de aire y una temperatura de de 35-38°C, además de la muestra de agua.

A pesar de haber alcanzado en el laboratorio una concentración mínima detectable de $1,27 \times 10^2$ células/ml utilizando este método, es posible que este permita detectar concentraciones aún más bajas. Este hallazgo destaca la importancia de continuar refinando el método y realizar más pruebas en condiciones de campo para evaluar su precisión. Además, se plantea si la proporción óptima de volumen de leche y agua contaminada a utilizar debe ser modificada de 75%L-25%AC a 50%L-50%AC para lograr un mayor ahorro de recursos, ya que ambas proporciones logran un porcentaje de éxito similar en los experimentos realizados.

La investigación sobre el método de análisis de bacterias utilizando la leche como medio en las cuencas de Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek ha confirmado su utilidad como una herramienta accesible y eficaz para evaluar la calidad del agua, ya que los experimentos han sido validados en todos los muestreos. Además, se instruye su aplicación práctica a 82 alumnos de la Municipalidad de Tela, lo que amplía su alcance y contribuye a aumentar la conciencia sobre la calidad del agua en la comunidad.

Sin embargo, los datos obtenidos muestran una preocupante realidad: a julio de 2022, las tres cuencas estudiadas se encuentran contaminadas, superando la recomendación de la ausencia de coliformes totales en agua de consumo establecido en la normativa europea, estadounidense, hondureña y brasileña (DOUE, 2020; EPA, 2013; OPS y CTNCA, 1995; MS, 2017).

El límite máximo de 3 UFC/100ml permitido por la NTN para la Calidad del Agua Potable hondureña se excede en los 24 puntos (tabla 4) donde se realizaron los muestreos, según los resultados obtenidos gracias a los MC-Media Pads. Teniendo en cuenta estos mismos datos, todos los puntos de muestreo superaron los límites de $<1,1$ UFC/100ml establecidos por Nicaragua y los <5 UFC/100ml establecidos en la normativa peruana. En los puntos Quebrada Las Moncadas y Mar, frente a laguna Tornabé (L2, fig. 2; E8, fig. 3) no se detectó la presencia de *E. coli*. Esto indica que se cumple con todos los estándares normativos establecidos de 0 UFC/100ml. Sin embargo, para el resto de los puntos de muestreo, se superan incluso los límites permitidos por México (<1 UFC/100ml) y por Perú (<2 UFC/100ml) (CNNyCTC, MFIC, 2004; SS, 2022; MA, 2017).

Por otro lado, la normativa española expone en el Real Decreto 314/2016 que cuanto mayor es la concentración de bacterias coliformes, más reciente es el episodio de contaminación. Siguiendo esta premisa y según los resultados, las cuencas que se ven afectadas regularmente son las de Highland Creek

y Lancetilla, especialmente en las zonas de Barrio Lempira (HC6, fig. 4) y Puente Nuevo Boulevard (L7, fig. 2). A pesar de que la dosis infectiva por coliformes fecales *E. coli* para adultos se establece entre 10-100 UFC/ml, se destaca que incluso concentraciones más bajas de coliformes pueden provocar brotes de enfermedades transmitidas por el agua (Sanz López, 2021). Es importante señalar que los niños y ancianos son grupos de riesgo frente a las infecciones producidas por coliformes en agua (Rodríguez-Angeles, 2002; Vidal et al., 2007; Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid y Comunidad de Madrid, 2016; EPA, 2013). Considerando esta dosis infectiva y los resultados obtenidos según los MC-Media Pads (tabla 5), todos los ríos serían susceptibles de provocar un episodio infectivo, pues presentan valores en el rango de concentración 10-100 UFC/ml para *E. coli*, e incluso superiores en los puntos Puente Nuevo Boulevard y Barrio Lempira (L7, fig. 2; HC6, fig. 4).

En la ciudad de Tela, dentro del territorio que abarcan las cuencas estudiadas se encuentran cuatro represas municipales que abastecen al 95 % de la población, mientras que otras cinco represas de carácter comunal atienden la demanda restante. La entidad responsable del suministro de agua, DIMATELA, afirma que todas las fuentes de agua son tratadas para garantizar su potabilidad y seguridad para el consumo humano. Sin embargo, durante los meses de lluvia, el suministro doméstico adquiere un color oscuro debido a la erosión y sedimentación. Además, los análisis realizados muestran la presencia de coliformes totales y fecales en todos los puntos de muestreo, a excepción de los puntos Quebrada las Moncadas y Mar, frente a laguna Tornabé (L2, fig. 2; E8, fig. 3) para los fecales. Estos resultados plantean dudas sobre la seguridad del agua para el consumo humano y sobre la regularidad de las prácticas de potabilización. El suministro de agua potable para consumo humano en la zona, especialmente para beber, ha sido monopolizado por un número de empresas como un servicio privado y ofrecido en forma de agua embotellada (Flores Velásquez et al., 2022).

En virtud de lo expuesto, se desaconseja el uso del agua de los ríos Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek para la higiene bucal y facial, además de para consumo, por presentar las concentraciones de coliformes fecales más elevadas. Asimismo, sería recomendable que el organismo regulador del suministro de agua potable intensificara las medidas de desinfección en las cuencas de estos ríos, en vista de la presencia de coliformes totales y fecales según los análisis realizados. Es importante destacar que el método propuesto en este estudio representa una herramienta valiosa para capacitar a las comunidades rurales, al proporcionar una forma rápida y económica de evaluar la calidad del agua. Esto permite sensibilizar a los habitantes sobre la gravedad de la situación y su impacto en el medio ambiente y la salud, para exigir que las autoridades competentes garanticen la potabilización del agua.

Conclusiones

Tras el análisis de los datos obtenidos en el presente proyecto, se presentan las siguientes conclusiones sobre la viabilidad y los aspectos a considerar en la aplicación del método propuesto:

1. El método propuesto es viable como primera evaluación de la calidad de las aguas, aunque se manifiesta la necesidad de pruebas más refinadas de confirmación posteriores. Es competitivo económicamente frente a otros métodos de detección.
2. El porcentaje seleccionado de 75%L-25%AC puede no ser óptimo en cuanto a la rentabilización de recursos, pues el porcentaje 50%L-50%AC presenta valores de coagulación similares, permitiendo un gasto menor de leche.
3. El método de la leche detecta una concentración de *E. coli* de $1,27 \times 10^4$ células/ml.
4. Todos los análisis realizados en las cuencas hidrográficas de la Municipalidad de Tela con el método de la leche mostraron presencia de bacterias coliformes.
5. Las cuencas de Lancetilla, La Esperanza y Highland Creek muestran contaminación por presencia de coliformes totales y fecales, siendo esta última cuenca la más afectada.

Líneas futuras de investigación

En línea con los ODS de la Agenda 2030, este trabajo experimental introduce un método simple, rápido y económico de detección coliformes en aguas contaminadas hasta un límite de $1,27 \times 10^4$ células/ml. Aunque este proyecto ya está en marcha en el Tela (Honduras), se necesita continuar con la investigación tanto dentro como fuera del país de estudio, para así contribuir a la protección de la salud de los grupos vulnerables. Se propone además explorar otros medios económicos de identificación de coliformes para mantener un enfoque rentable y efectivo en el análisis de la calidad del agua.

Agradecimientos

Quiero agradecer primeramente a mi familia el apoyo que me ha brindado siempre en todos los proyectos en los que he querido embarcarme, incluyendo también las patitas que corretean por mi vida y las que ya se pararon a descansar en mi memoria. Agradezco a mis compañeros de equipo por animarse a participar en un proyecto tan bonito como este, por ayudarme durante meses a realizar los experimentos y compartir conmigo la increíble experiencia de ver en Honduras con otros ojos. Agradezco de corazón a mis profesores de carrera por la pasión que ponen en todo lo que explican, a Pablo Martínez de Anguita, por enseñarnos que dentro de la ciencia también hay literatura y belleza; a Pablo Flores, profesor de la Universidad Autónoma de Honduras, por asegurarse de que estuviésemos como en casa al otro lado del mundo y, en especial, a mi directora de trabajo de fin de grado, Nuria Navarro Andrés, por estar conmigo al pie del cañón y hacer que todo esto haya sido posible.

Bibliografía

- Agencia Estatal Boletín Oficial del Estado (BOE). (2009). *Orden SCO/778/2009, de 17 de marzo, sobre métodos alternativos para el análisis microbiológico del agua de consumo humano*. Recuperado de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2009-5316>
- BOE. (2016). *Real Decreto 314/2016, de 29 de julio, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, se regula la explotación y comercialización de aguas minerales naturales y aguas de manantial envasadas para consumo humano, y se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano*. Recuperado de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2016-7340>
- Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA). (1989). *Drinking Water Requirements for States and Public Water Systems - Total Coliform Rule (TCR) Federal Register Notice*. <https://www.epa.gov/dwreginfo/total-coliform-rule-tcr-federal-register-notice>
- EPA. (2013). *Drinking water requirements for states and public water systems: Revised Total Coliform Rule and Total Coliform Rule*. Recuperado de <https://www.epa.gov/dwreginfo/revised-total-coliform-rule-and-total-coliform-rule>
- Asociación Francesa de Normalización (AFNOR). (1985). *Norme Française homologuée par décision du Directeur Général d'AFNOR T90-413, de 5 de septembre, sur les Essais des eaux - Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants - Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP)*. Recuperado de <https://www.boutique.afnor.org/>
- Cabello, R. (2015). *Microbiología y Parasitología Humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias* (3ª edición). Editorial Médica Panamericana S.A.
- Colegio Oficial de Veterinarios de Madrid y Comunidad de Madrid. (2016). *E. coli Patogénico: Zoonosis Alimentarias - Medidas de Prevención y Control en los Establecimientos Alimentarios*.
- Comisión Nacional de Normalización Técnica y Calidad, Ministerio de Fomento, Industria y Comercio. (2003). *Norma Técnica Nicaragüense de Agua Envasada NTON 03 040-03*. La Gaceta, Diario Oficial, No. 16. Recuperado de <https://www.minsa.gob.ni/sites/default/files/2022-10/NTON%2003%20040%2003%20Norma%20T%C3%A9cnica%20Sanitaria%20de%20Agua%20envasada.pdf>
- Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE). (2020). *Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (versión refundida)*. Diario Oficial de la Unión Europea, número 435, de 23 de diciembre de 2020, páginas 1 a 62. Recuperado de <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2020-81947>

- División Municipal de Aguas de Tela (DIMATELA). (2022). *Análisis calidad del agua potable de prestadores urbanos - 2022*. 0107, Tela, Atlántida. Recuperado de <https://www.ersaps.hn/calagua.html>
- Fleisher, J. M. (1985). Implications of coliform variability in the assessment of the sanitary quality of recreational waters. *Journal of Hygiene*, 94(2), 193–200. <https://doi.org/10.1017/S0022172400061398>
- Flores Velásquez, P. A., Murillo Gutiérrez, E. J. y Alvarado Reyes, A. A. (2022). *Consumo de agua purificada en los hogares del casco urbano de Tela, Atlántida, Honduras*. *Economía y Administración (EyA)*, 13(2), 92-127. <https://doi.org/10.5377/eya.v13i2.15315>
- Galv, L. (2003). “*A Water Pollution crisis in the Americas*”. *Habitat Debate* 9 (3): 10.
- Instituto Nacional de Estadística de Honduras. (2024). Superficie departamental de Honduras. Recuperado de <https://ine.gob.hn/v4/docs/territorio/superficie-departamental-de-honduras/>
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N. M., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24-34.
- Madigan, M., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley D.H. y Stahl, D.A. (2015). *Brock: Biología de los microorganismos* (14ª edición). Madrid, España: Pearson Educación.
- Merck. (2021). MC-Media Pad® Coliform test Interpretation Guide. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/ES/es/products/industrial-microbiology/quality-indicator-testing-devices#culture-media>
- Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (MS, ANVS). (2017). *Consolidação das normas sobre as ações e os serviços de saúde do Sistema Único de Saúde (Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017)*. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília. Recuperado en 26 de enero de 2023, de https://www.normasbrasil.com.br/norma/portaria-de-consolidacao-5-2017_356387.html
- Ministerio del Ambiente (MA). (2017). Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM. Recuperado de <https://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-supremo-n-004-2017-minam/>
- Ministerio de Derechos Sociales y Agenda 2030. (2022). *Agenda 2030*. Recuperado de <https://www.mdsocialesa2030.gob.es/agenda2030/index.htm>
- Ministerio de Salud, Organización Panamericana de la Salud y Comité Técnico Nacional de Calidad del Agua (MS, OPS, CTNCA). (1995). *Norma Técnica Nacional para la Calidad del Agua Potable: Normas Técnicas de las Descargas de Agua Residuales a Cuerpos Receptores y Alcantarillado Sanitario* (Acuerdo No. 084 del 31 de julio de 1995). Tegucigalpa, Honduras. Recuperado de <https://www.ersaps.hn/normativa-u.html>

- Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico. (2020). *El Gobierno declara la emergencia climática*. Recuperado de <https://www.miteco.gob.es/es/prensa/ultimas-noticias/el-gobierno-declara-la-emergencia-clim%C3%A1tica-/tcm:30-506550>
- Montville, T. J. y Matthews, K. R. (2009). *Microbiología de los Alimentos* (2ª ed.). Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Naciones Unidas. (2020). *The Sustainable Development Goals Report*. <https://unstats.un.org/sdgs/report/2020/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018a). *E. coli*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- OMS. (2018b). *WHO's first ever global estimates of foodborne diseases find children under 5 account for almost one third of deaths*. <https://www.who.int/news/item/03-12-2015-who-s-first-ever-global-estimates-of-foodborne-diseases-find-children-under-5-account-for-almost-one-third-of-deaths>
- Pan American Health Organization (PAHO) (2003). *Promoting the Healthy, safe use of recreational waters*. Rev. Panam. Salud Pública. 14(5): 364-9.
- Ponce Salgado, J. A. (2011). *Gobernanza para la gestión forestal en las microcuencas de los ríos La Esperanza y Lancetilla, del Bosque Modelo Atlántida, Honduras* [Tesis de maestría, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Escuela de Posgrado]. Turrialba, Costa Rica. Recuperado de <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/2248>
- Pruss, A. (1998). "Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water". Int. Epidemiol. Assoc. 27: 1-9.
- Rodríguez-Angeles, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., & Laurent, P. (2002). *Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches*. Journal of Microbiological Methods, Volume 49, Issue 1. Pages 31-54. ISSN 0167-7012. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00351-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00351-7)
- Sanz López, L. (2021). *Estudio de factores de virulencia en Escherichia coli*. Trabajo de Fin de Grado, Nutrición Humana y Dietética. Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.
- Schirra, R. y Zhang, P. (2014). Current Protocols in Cytometry. Current protocols in cytometry / editorial board, J. Paul Robinson, managing editor ... [et al.]. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy1236s70>
- Secretaría de Recursos Naturales y Ambiente (SERNA), Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y Municipalidad de Tela. (2005). *Plan de manejo integrado subcuencas de los ríos La Esperanza (Bañaderos), Lancetilla, Hilland Creek y la Quebrada de Arena, Municipio de Tela, Atlántida, Honduras. integrado subcuencas de los ríos La Esperanza*



- (Bañaderos), Lancetilla, Hilland Creek y la Quebrada de Arena, Municipio de Tela, Atlántida, Honduras. Recuperado de <https://fdocuments.ec/document/plan-de-manejo-integrado-cepunep-istac-iii-plan-de-manejo-integrado-de.html>
- Secretaría de Salud (SS). (2015). Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. *Diario Oficial de la Federación*. Recuperado de https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0
- SS. (2022). NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-2021, Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de la calidad del agua. Estados Unidos Mexicanos. https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5650705&fecha=02/05/2022#gsc.tab=0
- Teramura, H., Ogura, A., Everis, L., & Betts, G. (2019). MC-Media Pad CC for Enumeration of Total Coliforms in a Variety of Foods. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1492–1501. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1492>
- United Nations Children's Fund (UNICEF) (2016). *Ahora lo urgente: impacto de la sequía en las niñas, niños y adolescentes del corredor seco de Honduras*. Disponible en: <https://www.unicef.org/honduras/>
- Universidad Nacional de Ciencias Forestales (UNACIFOR) (2023). Jardín Botánico Lancetilla. Recuperado de <https://unacifor.edu.hn/jardinbotanicolancetilla/>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5).
- VWR International, LLC. (2024). CytoFLEX Flow Cytometer, Beckman Coulter. Recuperado el 4 de enero de 2024, de <https://us.vwr.com/store/product/22962436/cytoflex-flow-cytometer-beckman-coulter#order>

Anexo

Tabla 6: Experimentos realizados con el método de la leche para evaluar la presencia de *E. coli* en muestras de agua, siguiendo tratamientos con diversa proporción de leche (50%L-50%AC, 75%L-25%AC, 25%L-75%AC). L es “leche”, AC es agua contaminada. Elaboración propia con datos del laboratorio.

Experimento	Fecha	Tratamiento	Resultados 24h
1	26/04/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
2	27/04/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
4	28/04/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
5	28/04/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
18	09/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
19	09/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
20	10/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
21	10/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
22	17/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
23	17/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
24	17/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
25	17/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
26	18/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
27	18/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
28	19/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
29	19/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
30	24/05/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
31	24/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
34	26/05/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
35	26/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
36	26/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
38	30/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
39	31/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
40	31/05/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
43	02/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
44	02/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA

45	06/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
46	06/06/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
47	08/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
48	08/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
50	20/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
51	20/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
52	21/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
53	22/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
54	22/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
56	27/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
57	27/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
58	28/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
59	28/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
60	29/06/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
61	29/06/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA

62	13/10/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
64	10/11/2022	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
66	29/11/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
67	29/11/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
68	01/12/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
69	01/12/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
70	15/12/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
71	15/12/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
72	15/12/2022	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
73	17/01/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
74	17/01/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
75	02/02/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
76	02/02/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
77	02/02/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA

80	28/02/2023	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
81	28/02/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
82	28/02/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	PRESENCIA
83	23/03/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
84	23/03/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	AUSENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
85	04/05/2023	50% L-50% AC	PRESENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA
86	04/05/2023	50% L-50% AC	AUSENCIA
		75% L-25% AC	PRESENCIA
		25% L-75% AC	AUSENCIA

Tabla 7: Muestra los resultados obtenidos mediante citometría de flujo de *E. coli* en muestras de agua, según experimento y fecha. Cel/ml es célula/ml. Elaboración propia con datos de citometría de flujo.

Experimento	Fecha	cel/ml
30	24/05/2022	5,89E+04
31	24/05/2022	4,31E+04
34	26/05/2022	4,71E+04
35	26/05/2022	3,56E+04
36	26/05/2022	6,54E+04
38	30/05/2022	5,85E+04
39	31/05/2022	4,02E+04
40	31/05/2022	5,10E+04
43	02/06/2022	7,91E+04
44	02/06/2022	4,47E+04
45	06/06/2022	4,91E+04
46	06/06/2022	4,39E+04
51	20/06/2022	5,31E+04
56	27/06/2022	1,16E+05
57	27/06/2022	1,15E+05
58	28/06/2022	1,59E+05
59	28/06/2022	8,14E+04
60	29/06/2022	1,19E+05
61	29/06/2022	8,77E+04
62	13/10/2022	1,93E+04
64	10/11/2022	1,57E+04
66	29/11/2022	1,61E+04
67	29/11/2022	2,52E+04
68	01/12/2022	2,10E+04
69	01/12/2022	2,27E+04
70	15/12/2022	4,08E+04
71	15/12/2022	2,57E+04
72	15/12/2022	2,18E+04
73	17/01/2023	2,39E+04
74	17/01/2023	3,90E+04
75	02/02/2023	2,62E+04
76	02/02/2023	2,23E+04
77	02/02/2023	3,44E+04
80	28/02/2023	3,44E+04
81	28/02/2023	2,30E+04
82	28/02/2023	2,30E+04
83	23/03/2023	2,38E+04
84	23/03/2023	1,89E+04
85	04/05/2023	1,27E+04
86	04/05/2023	3,72E+04