CI51D/CI71I
CONTAMINACIÓN DE RECURSOS HIDRÁULICOS

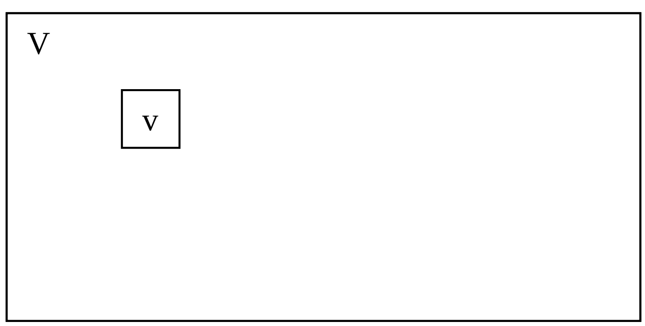
Aspectos Estadísticos del Análisis Microbiológico

Por Jorge Castillo G.

El método del Número Más Probable, inicialmente descrito por McCrady en 1914, se basa en que existe la posibilidad de detectar la presencia o ausencia de microorganismos del tipo coliformes en el agua pero no es posible hacer un recuento directo de éstos. Los coliformes fermentan el caldo Lauril Sulfato Triptosa (el caldo lactosa se usa para alimentos) a 35º C en incubadora entre 24 y 48 horas (se confirma con caldo Bilis al 2% a 35ºC). Los fecales además fermentan el caldo EC a 44,5ºC.

Si se toman varias diluciones diferentes de agua con un cierto contenido de microorganismos, entonces es lógico pensar que la probabilidad de obtener un resultado positivo, es decir presencia de ellos, será mayor cuanto menor es la dilución.

En particular, si de un cierto volumen **V** se toma una muestra de volumen **v**, entonces la probabilidad de que un microorganismo determinado esté en el volumen **v** será **v/V** y la probabilidad de que esté afuera será **1 – v/V.** Si en total existen n bacterias, entonces la probabilidad de que todas las n bacterias estén fuera del volumen **v** es



$$P = (1 - v/V)^n$$

La probabilidad de tener un resultado positivo, es decir la probabilidad de tener por lo menos una bacteria en el volumen **v** es**:**

$$P\,(+) = 1 - (1 - v/V)^n$$

Por otro lado, si **c** es la concentración de microorganismos del agua, entonces

$$P\,(+) = 1 - (1 - c\cdot v/c\cdot V)^n$$

c = n/V, o bien, c·V = n, De donde

$$P\,(+) = 1 - (1 - vc/n)^n$$

Cuando el número de microorganismos es muy grande, lo que normalmente ocurre, la expresión anterior se puede aproximar como

$$\lim_{n \to \infty} P\,(+) = 1 - \lim_{n \to \infty} (1 - vc/n)^n = 1 - e^{-vc}$$

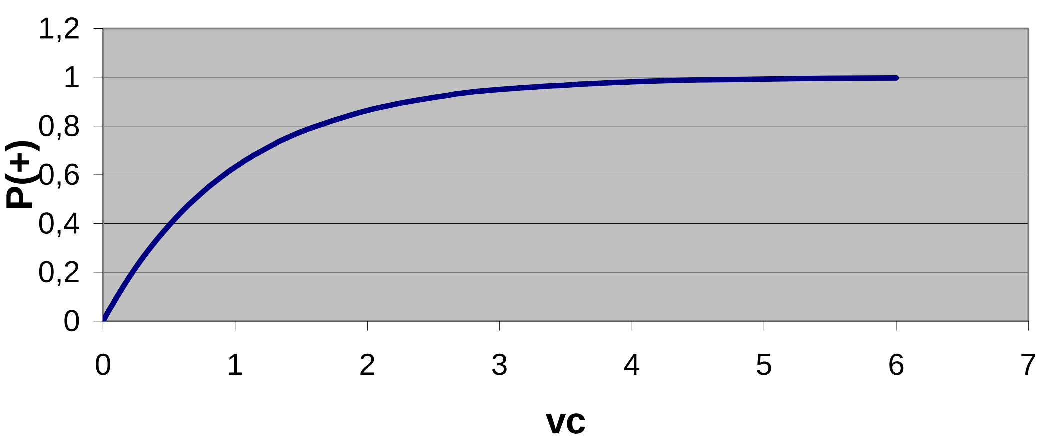
(El límite anterior se puede verificar en forma simple calculando

$$\frac{d\,(1 + x/n)^n}{dx} = n\,(1 + x/n)^{n-1}\left(\frac{1}{n}\right) = (1 + x/n)^{n-1}$$

expresión que tiende a $(1 + x/n)^n$ cuando n tiende a infinito).

En la figura Nº 1 se presenta gráficamente la probabilidad de tener un resultado positivo, en función del producto **vc**.

Fig. Nº1 Probabilidad de resultado positivo



Análogamente la probabilidad de tener un resultado negativo es

$$P(-) = 1 - P(+) = e^{-vc}$$

Si se toman **p+q** porciones de volumen **v1** entonces la probabilidad de tener **p** resultados positivos y **q** resultados negativos es

$$P\binom{p^{+}}{q^{-}} = \binom{p}{p+q} \cdot \left(1 - e^{-v_1 c}\right)^p \left(e^{-v_1 c}\right)^q$$

Siendo

$$\binom{p}{p+q} = \binom{q}{p+q} = \frac{(p+q)!}{p!q!}$$

el número de combinaciones de p (o q) elementos de entre (p+q)

Si se toma porciones de tres tamaños vl v2 v3, entonces la
probabilidad de tener p r t resultados positivos y
q s u resultados negativos es
igual al producto de las probabilidades respectivas, multiplicado por el número de combinaciones posibles con el resultado indicado. En este caso

$$P = \frac{(p+q)!(r+s)!(t+u)!}{p!q!r!s!t!u!}\left(1-e^{-v1c}\right)^p\left(e^{-vlc}\right)^q\left(1-e^{-v2c}\right)^r\left(e^{-v2c}\right)^s\left(1-e^{-v3c}\right)^t\left(e^{-v3c}\right)^u$$

Esta probabilidad es una función sólo de la concentración **c** y es fácil observar que cuando esta concentración es nula la probabilidad también lo es, por los términos correspondientes a los resultados positivos. Cuando la concentración es infinitamente grande, la probabilidad también es nula, por el efecto de los términos correspondientes a los resultados negativos.

Si la concentración es nula, entonces la probabilidad de obtener sólo resultados negativos es 1 y, similarmente, si la concentración es infinitamente grande la probabilidad de obtener sólo resultados positivos es también 1.
En general, se obtiene una combinación de resultados positivos y negativos y existe una concentración **C** que maximiza la probabilidad de obtener dicha

combinación. Esta concentración **C** es la que se denomina Número Más Probable, **NMP,** aunque en estricto rigor no corresponde al concepto expresado por dicha denominación.

A modo de ejemplo, si se tiene un ensayo en que se toman

5 porciones de 10 ml y se obtiene 4 positivos y 1 negativo			
1	1	0	1
1	0,1	1	0

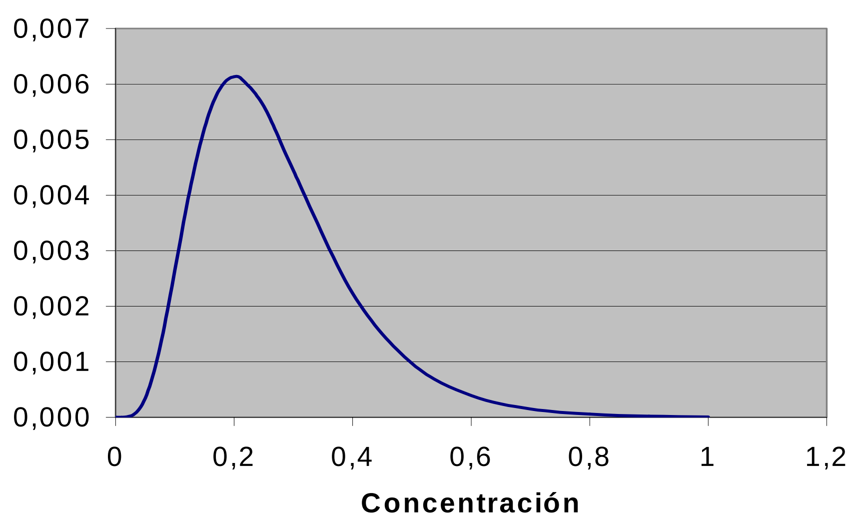
entonces la probabilidad de obtener este resultado es

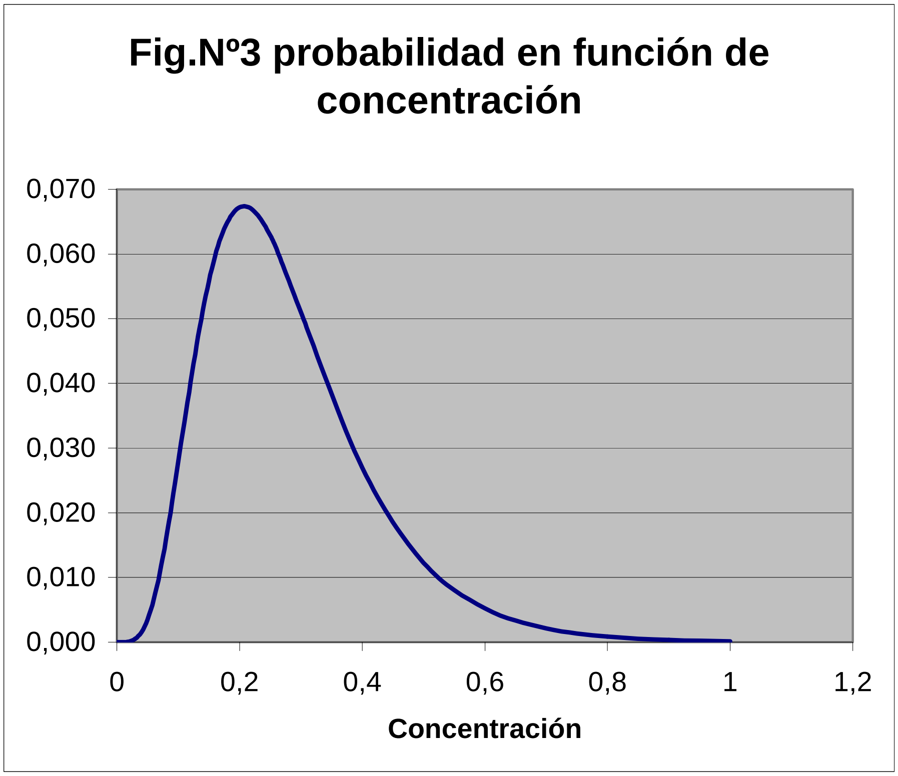
$$P = \frac{5!1!1!}{4!}\left(1-e^{-10c}\right)^4\left(e^{-10c}\right)e^{-c}\left(1-e^{-0.1c}\right)$$

En la figura Nº 2 se representa gráficamente la probabilidad en función de la concentración de microorganismos **c** y se observa que el **"Número Más Probable"** es aproximadamente 0,2. Por otra parte, la máxima probabilidad de obtener el resultado indicado, que corresponde precisamente al **NMP**, es de sólo 0,62%. Este bajo resultado se puede explicar porque es bastante improbable que se obtenga un resultado positivo para el volumen de sólo 0,1 ml y un resultado negativo para el volumen 10 veces mayor de 1 ml.

Si los resultados se invirtieran con respecto a los volúmenes de 1 y 0.1 ml entonces el número más probable sería de 0,21 y la máxima probabilidad sería de 6,8%, como se presenta gráficamente en la figura Nº 3.

Fig. Nº2.Probabilidad en función de concentración





Límites de confianza.

Dada una cierta concentración de microorganismos **c,** si se determina reiteradamente el NMP, se obtiene una distribución probabilística de resultados de **NMP** que es aproximadamente logarítmica-normal, con un valor medio correspondiente a aproximadamente la concentración real. Además, se verifica que la desviación estándar de la distribución es **σ = 0,55/$\sqrt{n}$,** en que n es el número de tubos de cada dilución. Por lo tanto se puede escribir lo siguiente**:**
Siendo y = $\log_{10}$ (C) (NMP). Por ejemplo, para el caso en que la concentración

$$P(y) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(y-\overline{y})^2}{2\cdot(0,55/\sqrt{n})^2}}$$

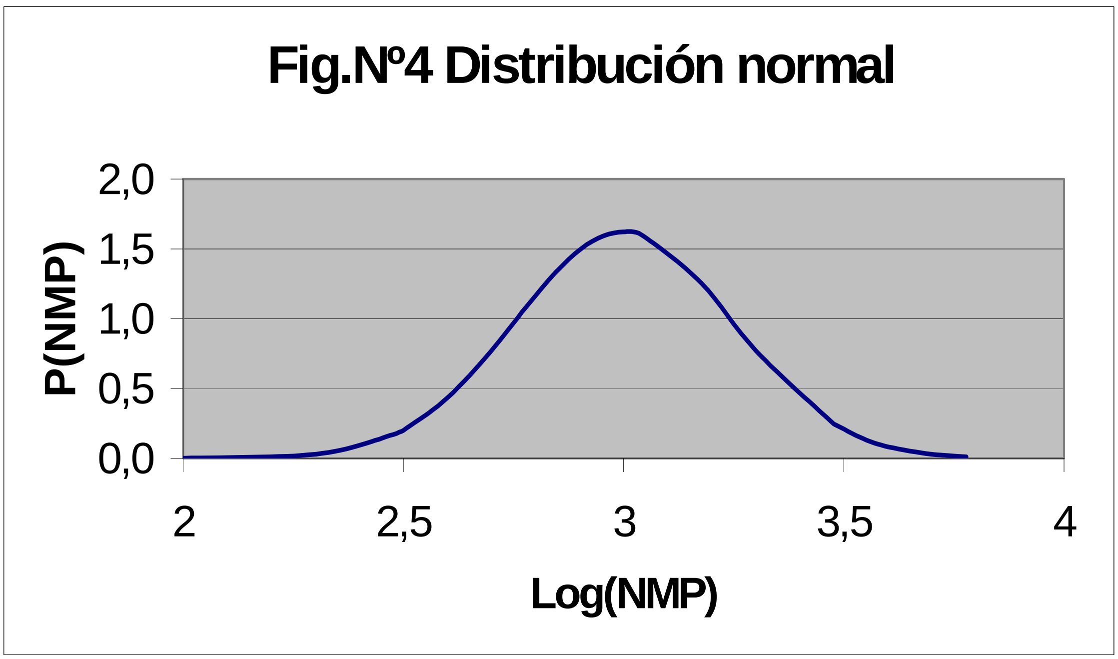
real es de 1.000 coliformes fecales/100 ml, y suponiendo que se usan 5 tubos de cada dilución, lo anterior se puede expresar gráficamente como se muestra en la figura Nº 4.

Además, como en una distribución normal se verifica que el 95 por ciento de los resultados caen entre el valor medio menos 1,96 veces la desviación estándar y el valor medio más 1,96 veces la desviación estándar, entonces, si se acepta como hipótesis que el **NMP** obtenido en una buena aproximación del valor medio y, a su vez, del valor real, los límites entre los cuales debería obtenerse el 95% de los resultados, denominados límites de confianza 95%, se pueden calcular como

$$L = 10^{\,\bar{y} \pm 1,96 \cdot (0,55/\sqrt{n})} = C \cdot 10^{\pm 1.96\left(0.55/\sqrt{n}\right)}$$

$$= 3,03\,C \quad y \quad C \,/\, 3,03 \quad para \quad n = 5$$

Para 3 tubos de cada dilución los límites de confianza 95% resultan ser 4,19C y C/4,19.



RELACIÓN ENTRE DISTRIBUCIÓN LOG NORMAL Y MEDIA GEOMÉTRICA COMO PARÁMETRO DE TENDENCIA CENTRAL.

Estimación de la concentración a partir de una serie de valores del Número Más Probable, C_i.

Una consecuencia del hecho que la distribución de los NMP medidos para una misma muestra es log-normal, es la siguiente:

Si aceptamos que el promedio de varios valores de una muestra de una variable que tiene una distribución normal es una buen estimación de la media, entonces en una distribución log-normal, el promedio de los valores logarítmicos es una buena estimación de la media logarítmica. En el caso de los coliformes, si existe una serie de mediciones C_i, entonces, dado que la distribución de sus logaritmos es normal, entonces el promedio de sus logaritmos es una buena estimación del valor medio, equivalente al logaritmo del valor real.

Log(valor real) $\approx \Sigma \log(C_i)/n$, en que n es el número de mediciones. Por lo tanto, el valor real es aproximadamente:

$$\text{Valor real} \approx 10^{\Sigma \log(C_i)/n} = (10^{\Sigma \log(C_i)})^{1/n} = (10^{\log(C_1) + \log(C_2) + \cdots \log(C_n)})^{1/n}$$

$$= (10^{\log(C_1)} \cdot 10^{\log(C_2)} \cdots 10^{\log(C_n)})^{1/n} = (C_1 \cdot C_2 \cdot \cdots C_n)^{1/n} =$$

$$= \text{media geométrica de los valores } C_i$$

Aproximación de Thomas:

$$NMP \approx \frac{N^o\, de\, tubos\, (+)}{\sqrt{N^o\, de\, ml(-) \cdot N^o\, total\, de\, ml}}$$

Ejemplo:

Para 4+ y 1- de 10 ml,
1- de 1 ml y
1+ de 0,1 ml

$$NMP/ml = 5/\sqrt{11 * 51{,}1} = 0{,}21$$

Conclusiones:

1.- El NMP no es una técnica de medición directa de concentración de microorganismos, sino el resultado del manejo estadístico del análisis de presencia o ausencia en series de tubos con diferentes diluciones.

2.- Normalmente se le atribuye al método una precisión no merecida.

3.- Por la naturaleza del método, una medición puntual entrega una información muy imprecisa acerca de la concentración real de microorganismos.

4.- La imprecisión del método se puede evaluar utilizando los límites de confianza, que aproximan el rango dentro del cual se puede esperar se encuentre la concentración real de microorganismos.

Referencias bibliográficas:

1. McCrady MH (1915). **The numerical interpretation of fermentation tube results**. Journal of Infectious Diseases 17: 183-212

2. Woodward, Richard L. **How probable is the Most Probable Number?.** Journal of AWWA. (Agosto 1957): 1060-1068