



*Universidad Nacional del Nordeste*



*Facultad de Ciencias Agrarias*

# **TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN**

**Modalidad Pasantía**

## **ADiestRAMIENTO EN TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO DE AGUAS**

**Alumna: María Eugenia Bernardy**

**Director: Ing. Agr. Miguel Michellod**

**AÑO: 2016**

## INTRODUCCIÓN

Los agentes patógenos implicados en la transmisión hídrica de enfermedades son las bacterias, virus, protozoos, helmintos y cianobacterias. Estos microorganismos pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea. La transmisión hídrica es solo una de las vías, pues estos agentes patógenos también pueden ser transmitidos a través de alimentos, de persona a persona debido a malos hábitos higiénicos, de animales al hombre, entre otras rutas (Prescott *et al.*, 1996).

Los microorganismos que conforman el grupo de los coliformes totales, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter*, viven como saprófitos independientes o como bacterias intestinales; los coliformes fecales son de origen intestinal. Todos pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no esporulantes, fermentadores de lactosa con producción de gas (Canosa, 1995).

Las coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en las plantas, el suelo y los animales, incluyendo los humanos. La presencia de bacterias coliformes es un indicio de que el agua puede estar contaminada con aguas negras u otro tipo de desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos del fondo (Munn, 2004).

La evaluación de la calidad bacteriológica del agua se basa tradicionalmente en grupos de bacterias considerados como indicadores de contaminación, dentro de los cuales están los coliformes fecales y totales. De acuerdo a la norma mexicana los coliformes totales, deben estar ausentes o no ser detectables y *Escherichia coli* o coliformes fecales y organismos termotolerantes deben también, estar ausentes o no detectables (Jimenez, 2002).

*Pseudomonas aeruginosa* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae* y es un bacilo Gram negativo aerobio con un flagelo polar. Cuando se cultiva en medios adecuados produce piocianina, un pigmento azulado no fluorescente. Muchas cepas producen también el pigmento verde fluorescente pioverdina. *Pseudomonas aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas* fluorescentes, produce catalasa y oxidasa, así como amoníaco a partir de la arginina, y puede utilizar citrato como única fuente de carbono. *Pseudomonas aeruginosa* puede causar diversos tipos de infecciones pero rara vez

causa enfermedades graves en personas sanas sin algún factor predisponente. Coloniza predominantemente partes dañadas del organismo, como quemaduras y heridas quirúrgicas, el aparato respiratorio de personas con enfermedades subyacentes o las lesiones físicas en los ojos. Desde estos lugares puede invadir el organismo y causar lesiones destructivas o septicemia y meningitis. Las personas con fibrosis quística o inmunodeprimidas son propensas a la colonización por *P. aeruginosa*, que puede conducir a infecciones pulmonares progresivas graves. Las foliculitis y las otitis relacionadas con el agua se asocian con ambientes húmedos y cálidos como las piscinas y bañeras de hidromasaje. Muchas cepas son resistentes a diversos antibióticos, lo que puede aumentar su relevancia en el ámbito hospitalario (De Victorica y Galván, 2001).

El recuento total aerobio es una técnica general ampliamente utilizada para estimar el número de microorganismos en muestras de alimentos. Se utiliza como un indicador de la población bacteriana en las muestras y resulta útil para evaluar su calidad. El procedimiento general para realizar un recuento total aerobio incluye la preparación de la muestra, diluciones decimales, montaje de las diluciones en placas en un medio apropiado, incubación de las placas y recuento (Maturin y Peeler, 1998).

Para el control de la potabilidad del agua se incluyen, en el análisis de laboratorio, pruebas de cuenta de bacterias mesófilas aerobias y la estimación del número más probable (NMP) de organismos coliformes totales y fecales. Los coliformes son organismos capaces de crecer en un medio aeróbico a  $37\pm 1$  °C en un medio de cultivo líquido lactosado con producción de ácido y gas dentro de un periodo de 48h (SECOFI, 1987). Este grupo comprende a todos los bacilos Gram negativos que fermentan lactosa; está conformado por los géneros: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Edwardsiella* y *Citrobacter* (COFEPRIS, 2006).

## **OBJETIVOS**

- 1- Adquirir destreza en el análisis bacteriológico de muestras de agua.
- 2- Determinar concentración de bacterias coliformes totales, coliformes fecales, bacterias aeróbicas totales y *Pseudomona sp.*
- 3- Realizar interpretación de los datos obtenidos y comparar con parámetros sanitarios establecidos de calidad de agua por el Código Alimentario Argentino para consumo humano.

## **METODOLOGÍA**

Se llevó a cabo el análisis de muestras de agua procedentes de diversos puntos geográfico de la Provincia de Corrientes. Todas las muestras fueron de origen subterráneo, con fines de utilización para riego y para consumo humano. Las mismas fueron suministradas por el Plan Aguas dependiente del Ministerio de Producción.

Los parámetros a determinar son 4 los cuales se detallan a continuación, sus metodologías y sus unidades de expresión:

- 1- Coliformes totales; método del número más probable a 37 °C expresado en NMP 100 ml<sup>-1</sup> (Rice *et al.*, 2012).
- 2- Coliformes fecales; método del número más probable a 44.5 °C expresado en NMP 100 ml<sup>-1</sup> (Rice *et al.*, 2012).
- 3- *Pseudomonas*; método de caldo asparagina y confirmación agar cetrimida expresado en positivo o negativo a 37 °C (Rice *et al.*, 2012).
- 4- Aeróbicas Totales; método de recuento en placa a 37 °C expreso en UFC 100 ml<sup>-1</sup> (Rice *et al.*, 2012).

## **LUGAR DE TRABAJO**

Las tareas se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis de calidad de agua, suelo y tejido foliar que se encuentra ubicado en el Centro Tecnológico de Producción dependiente del Ministerio de Producción ubicado en Ruta Nacional N° 12, Km 1031, Corrientes Argentina. C.P. 3400.

## DESARROLLO DE ACTIVIDADES Y RESULTADOS

### Coliformes Totales.

Para el análisis de coliformes totales se preparó caldo MacConkey según prescribe el fabricante, del cual se colocó en un tubo 20 ml de capacidad, 10 ml del caldo más una campanita de Durham invertida del cual se eliminó todo el aire en el interior, esta misma sirve para indicar positividad ante la presencia de gas como consecuencia del crecimiento bacteriano.

En el medio de cultivo, la peptona es la fuente de aminoácidos y de otros factores de crecimiento, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la bilis de buey estimula el crecimiento de las bacterias coliformes e inhibe a gran parte de la flora Gram positiva, y el púrpura de bromocresol es el indicador de pH. Los coliformes, son microorganismos que fermentan la lactosa, con producción de ácido y gas. Al acidificar el medio, se produce un viraje del indicador de pH del color púrpura al amarillo.

El mismo debe ser confirmado con caldo verde brillante bilis en la fase confirmativa. Para que un tubo sea considerado positivo tiene que haber cambio de color y además existencia de gas capturado en la campanita de Durham lo que indica que la bacteria metabolizó los productos del caldo de cultivo y produce dióxido de carbono que es retenido por dicha campana como se observa en la Fig. 1 y 2.



**Figura 1: Tubo Negativo, sin cambio de color y sin gas.**



**Figura 2: Tubo positivo, presencia de gas y cambio de color.**

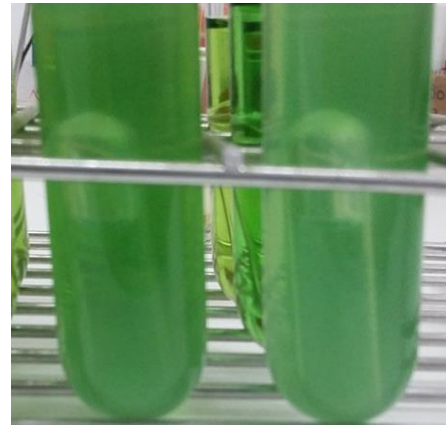
Para ser considerado positivo un tubo, la campana tiene que tener al menos el 10 % de la misma con gas.

Para confirmar los resultados de los tubos positivos, se procedió a repicar el caldo con las características anteriormente mencionadas, a otro medio de cultivo que se llama, caldo verde brillante bilis. Cabe destacar que en ambos caldos utilizados existe la presencia de bilis, compuesto agregado al medio de cultivo para inhibir la flora Gram positiva dado que esta misma no pertenece al grupo de coliformes por no reunir dichas características de ser Gram negativa.

Para el repique se procede a pasar cada tubo por un Vortex que es un instrumento que se utiliza para agitación del tubo por vibraciones y de este mismo modo que el caldo sea homogéneo en la distribución de las bacterias en el mismo, dado que el caldo es una suspensión y no una solución y por ende se corre el riesgo de que todas las bacterias queden en el interior del mismo como producto de acción de la gravedad y que al momento del repique no se llevan las mismas al caldo donde va a repicar.



**Figura 3: Tubo negativo, límpido y ausencia de gas**



**Figura 4: Tubo positivo, turbio y presencia de gas**

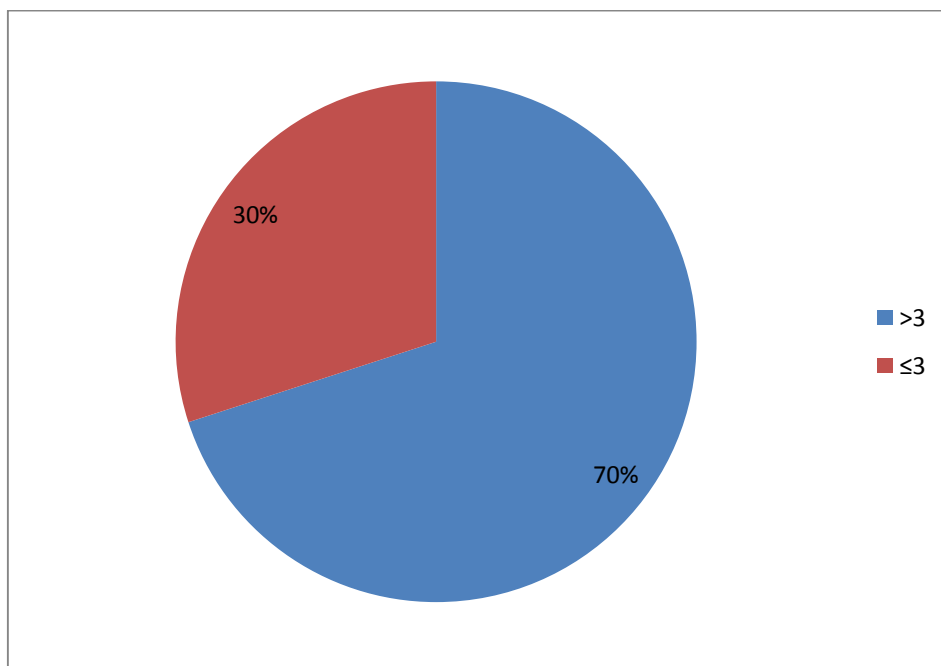
El caldo verde brillante bilis tiene la característica de no producir viraje del indicador (verde brillante) sino que en el mismo, cuando existe la presencia de bacterias, se observa gas y se vuelve turbio como se observa en la Fig. 3 y 4.

**Tabla 1:** Números de tubos positivos para el análisis de coliformes totales, en los que se inocularon 10, 1 y 0,1 ml de muestra de agua y sus respectivos valores de NMP.100 ml<sup>-1</sup> de muestra de agua.

<b>Muestra</b>	<b>10 ml</b>	<b>1 ml</b>	<b>0,1 ml</b>	<b>NMP/ 100ml</b>
1	0	0	0	≤ 3
2	0	0	0	≤ 3
3	0	0	0	≤ 3
4	1	0	0	4
5	1	1	0	7
6	1	1	1	11
7	0	0	1	3
8	0	1	1	3
9	0	0	0	≤ 3
10	0	0	0	≤ 3
11	2	1	0	15
12	0	0	0	≤ 3
13	2	1	0	15
14	1	2	0	11
15	0	0	0	≤ 3
16	2	0	0	9
17	1	1	0	7
18	0	0	0	≤ 3
19	1	2	1	11
20	2	0	0	9
21	0	0	0	≤ 3
22	0	0	0	≤ 3
23	2	2	2	28
24	3	3	3	>2.400
25	1	0	3	7
26	1	1	0	7
27	1	1	1	11
28	2	2	2	28
29	3	3	3	>2.400
30	3	3	3	>2.400
31	3	3	3	>2.400
32	1	1	1	11
33	2	2	2	28
34	3	2	1	28
35	3	3	3	>2.400
36	1	1	0	7
37	3	0	3	64
38	3	0	2	64
39	1	2	1	11
40	1	2	1	15

El capítulo XII del Código Alimentario Argentino para agua potable en su Artículo 982 establece lo siguiente para Bacterias coliformes:

NMP a 37 °C- 48 hs. (Caldo McConkey o Lauril Sulfato), en 100 ml: igual o menor de 3.



**Figura 5:** Porcentaje de muestras con valores de coliformes totales superiores e inferiores a los establecido como límite para consumo humano por el código alimentario argentino.

Como vemos en la figura 5 el 70 % de las muestras extraídas de aguas subterráneas presentan contaminación bacteriana, lo que es inadecuado para el consumo humano directo sin antes previo realizar una desinfección del agua con hipoclorito de sodio.

### Coliformes Fecales.

Para el análisis de coliformes fecales se tomó una azada de los tubos positivos en la fase confirmativa de coliformes totales a caldo verde brillante bilis y se incubó en un baño maría a 44.5 ° C por 24 horas. Los resultados de este proceso se encuentran en la tabla 2.



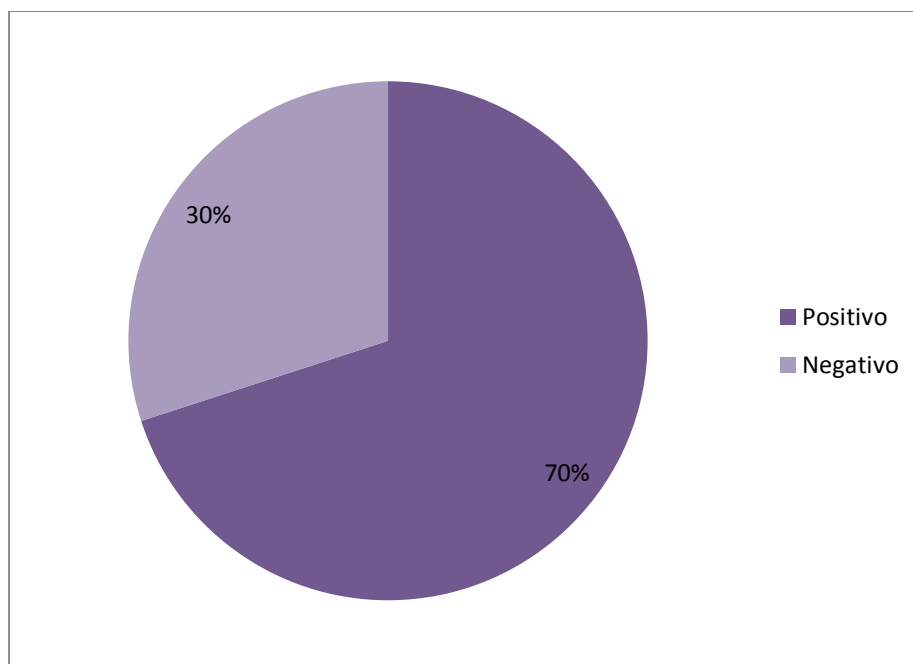
**Tabla 2:** Tabla de tubos positivo para el análisis de coliformes fecales a 44.5 °C y sus valores de NMP 100ml<sup>-1</sup>

Muestra	10 ml	1 ml	0,1 ml	NMP/ 100 ml
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	1	0	3
6	1	1	0	7.3
7	0	0	1	3
8	0	0	1	3
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	1	1	0	7.3
12	0	0	0	0
13	1	1	0	7.3
14	1	0	0	3.6
15	0	0	0	0
16	1	0	0	3.6
17	1	0	0	3.6
18	0	0	0	0
19	1	0	1	7.2
20	1	0	0	3.6
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	1	0	1	7.2
24	3	3	1	460
25	0	0	3	9
26	1	1	0	7.3
27	1	0	1	7.2
28	2	1	1	20
29	0	0	0	0
30	2	2	2	35
31	3	3	3	> 1100
32	0	0	1	3
33	2	0	0	9.1
34	3	1	1	75
35	3	1	2	120
36	1	1	0	7.3
37	3	0	3	95
38	3	0	1	39
39	1	1	1	11
40	1	0	0	3.6

Como vemos en la tabla 2 de las 40 muestras analizadas gran parte de ellas dieron positivo para coliformes fecales. El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 horas de incubación a  $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli*.

El capítulo XII del Código Alimentario Argentino para agua potable Artículo 982, establece lo siguiente:

*Escherichia coli*: ausencia en 100 ml.



**Figura 6:** Porcentaje de muestras positivas y negativas para coliformes fecales.

#### Determinación de *Pseudomonas aeruginosa*.

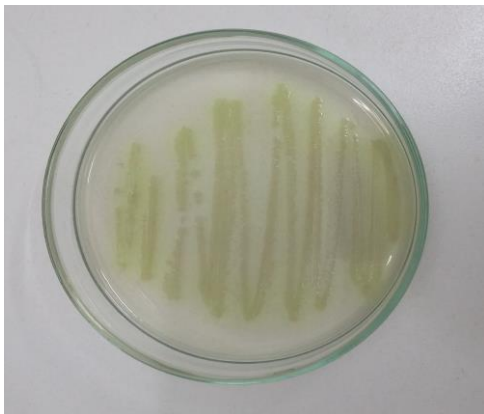
Para el estudio del *Pseudomonas aeruginosa*, se procedió a cultivar las muestras de agua en un caldo selectivo para dicha especie denominado caldo asparagina, en el cual el mismo contiene el aminoácido asparagina que la bacteria hidroliza a ácido aspártico y produce una turbidez fluorescente.



**Figura 7:** Típico color verde esmeralda claro de caldo asparagina positivo para *Pseudomonas sp.* y tubo negativo incoloro.



**Figura 8:** Fluorescencia positiva para caldo asparagina bajo lámpara UV de onda larga.



**Figura 9:** Crecimiento de *Pseudomonas sp.* en agar cetrimida.



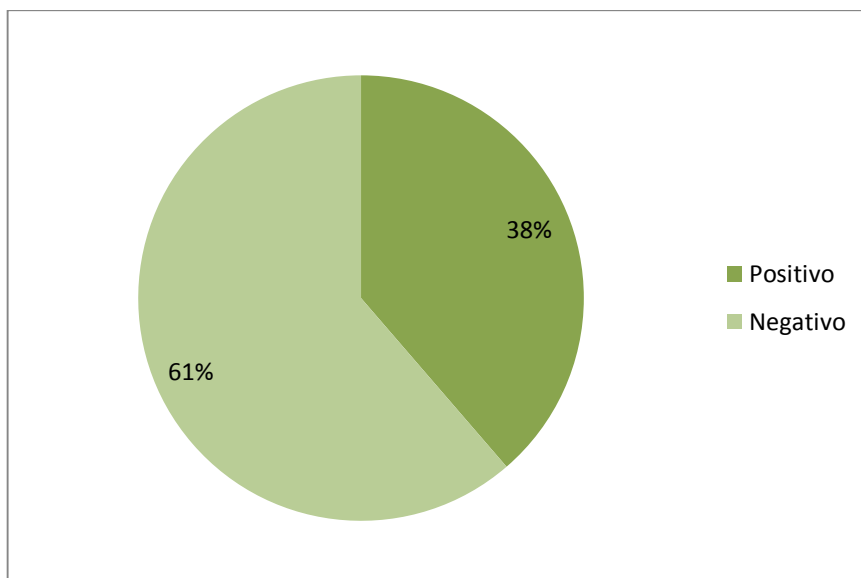
**Figura 10:** Fluorescencia típica de *Pseudomonas sp.* en agar cetrimida.

**Tabla 3:** Muestras positivas y negativas para el análisis de *Pseudomonas aeruginosa*.

Muestra	<i>Pseudomonas</i>	Muestra	<i>Pseudomonas</i>
1	-	21	-
2	-	22	-
3	-	23	-
4	-	24	+
5	-	25	-
6	+	26	+
7	+	27	+
8	+	28	+
9	-	29	+
10	-	30	+
11	-	31	+
12	-	32	-
13	-	33	-
14	-	34	-
15	-	35	-
16	-	36	+
17	+	37	-
18	-	38	+
19	+	39	+
20	-	40	+

El Código Alimentario Argentino para agua potable Artículo 982 para *Pseudomonas aeruginosa* establece:

***Pseudomonas aeruginosa***: ausencia en 100 ml.



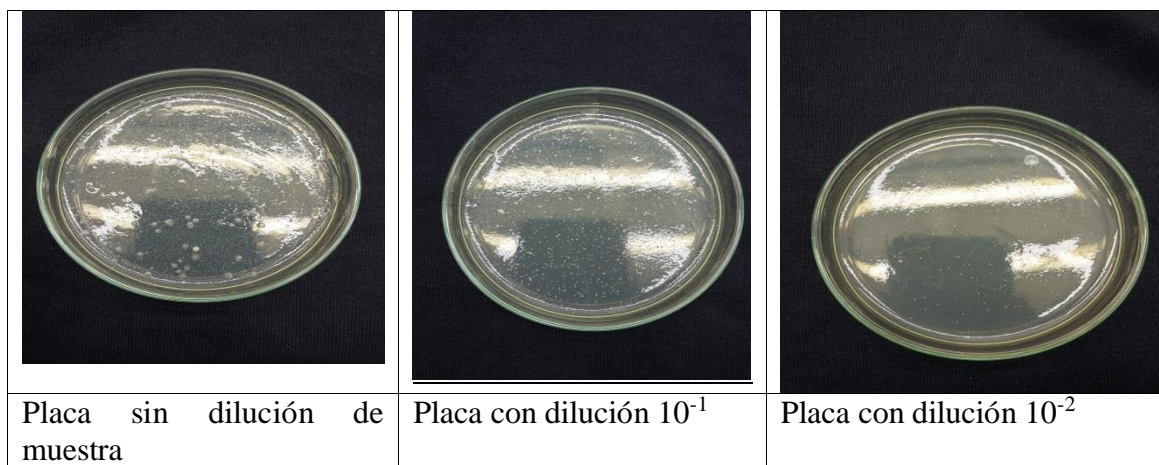
**Figura 11:** Porcentaje de muestras positivas y negativas para *Pseudomonas aeruginosa* según lo establecido por el Código Alimentario Argentino.

La figura 11 muestra que un 38 % de la muestras es positivo para *Pseudomonas aeruginosa* indicando de esta manera una alta contaminación de las napas de aguas con dicha bacteria por lo cual presentan una mala calidad microbiológica, no apta para consumo sin previa desinfección.

## Aeróbicas Mesófilas Totales

Para el análisis de bacterias aeróbicas mesófilas totales, se procedió conforme a las siguientes cuatro etapas: Dilución, siembra, incubación, recuento y expresión del resultado final.

1. Etapa de dilución: partimos de una muestra de agua a la cual le realizamos diluciones decimales para simplificar el cálculo de los resultados. Las mismas se realizaron utilizando como diluyente agua peptonada, para ello tomamos 9 tubos de ensayo de manera que podamos hacer 3 diluciones con 3 repeticiones cada una. Cada tubo de ensayo contenía 9 ml de agua peptonada, se procedió a rotularlos con marcador indeleble para poder identificar los tipos de dilución que realizamos, las cuales son  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ . Paso siguiente, con una pipeta esterilizada se tomó 1ml de la muestra a analizar y se colocó en un tubo, se tuvo así la muestra diluida 10 veces, es decir,  $10^{-1}$ . A continuación se tapó dicho tubo y se agitó repetidas veces, luego se tomó otra pipeta estéril, se quitó el tapón de dicho tubo, se tomó 1ml y depositó en otro tubo con solución diluyente, de esta forma se obtuvo una dilución de  $10^{-2}$ . Se procedió de manera similar para realizar la dilución  $10^{-3}$  y luego sus respectivas repeticiones.
2. Etapa de siembra: Se tomaron cajas de Petri previamente esterilizadas y se rotularon las mismas con un marcador con las siguientes leyendas: S/D (sin dilución),  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , también se rotuló las repeticiones que hicimos. Se tiene en cuenta en este paso que no se deben destapar las cajas de Petri ya que se puede contaminar su interior y al igual que la etapa de dilución, se trabajó bajo la campana de flujo laminar. Paso siguiente fundimos en microondas el agar para recuento en placa (Agar plate count) y luego bajamos su temperatura en baño maría a 44 °C. El proceso de siembra propiamente dicho consiste en tomar una pipeta estéril y depositar 1ml de muestra o dilución en cada caja de Petri y luego verter aproximadamente 20 ml de agar, homogeneizar y dejar solidificar.
3. Etapa de incubación: Una vez sembradas y solidificadas las placas se procedió a incubar a 37°C en estufa durante 48 hs para el recuento.
4. Recuento y expresión del resultado final: Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se contaron todas las colonias crecidas en las placas. Se elige aquella dilución en la que el número de colonias por placa se encuentre entre 30 y 300 de esta manera se obtienen resultados confiables y descartamos las otras diluciones para el recuento. Una vez efectuado el recuento de colonias, si hubiere 2 o más placas de la misma dilución, se realiza un promedio de las mismas, luego se multiplica dicho resultado por el factor de dilución y por ultimo lo expresamos en su unidad correspondiente, es decir, en UFC ml<sup>-1</sup> (Unidades Formadoras de colonias por mililitros de muestra).



**Figura 12:** Colonias de bacterias aeróbicas mesófilas creciendo en cajas de Petri sin dilución y con diluciones  $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ .

**Tabla 4:** Valores encontrados de bacterias aeróbicas mesófilas totales por muestra en análisis.

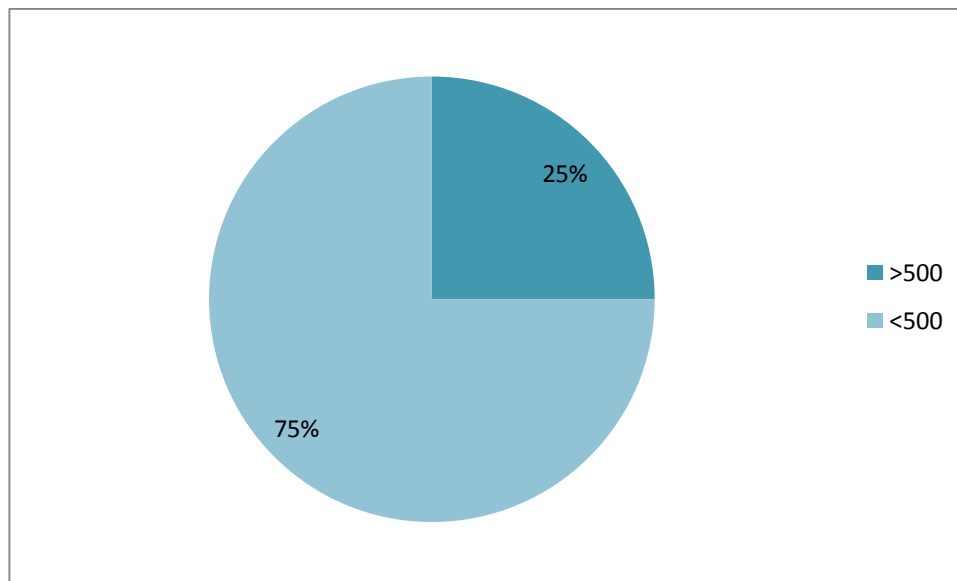
Muestra	Aeróbicas Mesófilas Totales UFC ml <sup>-1</sup>	Muestra	Aeróbicas Mesófilas Totales UFC ml <sup>-1</sup>
1	100	21	100
2	120	22	152
3	53	23	325
4	400	24	160
5	853	25	235
6	900	26	300
7	100	27	560
8	400	28	700
9	23	29	800
10	50	30	1200
11	100	31	1500
12	200	32	356
13	100	33	300
14	125	34	200
15	30	35	269
16	25	36	300
17	56	37	452
18	20	38	300
19	500	39	800
20	300	40	560

Como se puede observar en la Tabla 4, la mayoría de las muestras que han sido analizadas para el recuento de bacterias aeróbicas mesófilas no han superado las 500 UFC ml<sup>-1</sup>. El grupo de las bacterias mesófitas aeróbicas es el más abundante y el que se desarrolla en diversos ambientes, debido a sus requerimientos de oxígeno y temperatura media (37 °C) por tal razón se usan como indicadores de contaminación.

En el recuento de microorganismos aerobios mesófilos se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes. Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados. (Pascual Anderson & Calderon Pascual, 2000)

El Código Alimentario Argentino para agua potable Artículo 982 para bacterias mesófilas, establece lo siguiente:

En el caso de que el recuento supere las 500 UFC ml<sup>-1</sup> y se cumplan el resto de los parámetros indicados, sólo se deberá exigir la higienización del reservorio y un nuevo recuento.



**Figura 13:** Porcentaje de muestras con valores de bacterias aeróbicas mesófilas totales superiores e inferiores a lo establecido como límite por el código alimentario argentino.

En la figura 13, se observa que el 25% de las muestras de agua analizadas presentaron más de 500 UFC ml<sup>-1</sup> lo cual es un indicador del número de bacterias viables y nos puede estar indicando posibilidad de que existan patógenos.



## **Conclusiones y consideraciones finales**

A lo largo del transcurso como pasante adquirí experiencia es el trabajo de laboratorio, específicamente a lo que concierne al análisis bacteriológico en muestras de agua. Aprendí cuales son los principales parámetros a determinar y sus respectivas metodologías. A su vez comprendí la importancia de respetar las normas de seguridad e higiene en la materia.

En lo que respecta a las muestras analizadas, del 100% de ellas, solo el 25% cumplieron con los 4 parámetros que las hacen aptas para consumo directo sin tratamiento previo, por eso se destaca el hecho de recurrir a un análisis microbiológico para las perforaciones en las cuales el agua será destinada para consumo humano porque como se vio a lo largo del trabajo un gran número de ellas se encontraron contaminadas y por lo tanto deben ser sometidas a un tratamiento químico adecuado.

Es importante conocer como profesional cuales son las bacterias indicadoras de contaminación y cuáles son sus límites tolerables, ya que de esta manera, recurriendo a al análisis de las mismas obtengo una información certera de la calidad sanitaria de una fuente de agua. Al identificar y conocer qué tipo de bacteria o grupo de bacterias se encuentran presente, se puede decidir qué tipo de tratamiento y/o proceso de saneamiento será necesario aplicar ,que usos se puede dar al agua y además evitar transmisión de enfermedades o futuras complicaciones por desconocimiento de la calidad sanitaria de una fuente hídrica determinada.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Canosa A. (1995). Indicadores bacteriológicos de eutrofización en los embalses de Chuza, Neusa y Tominé, y en la laguna de Chingaza. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano. Centro de Investigaciones Científicas.
- CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. (1969). Bebidas hídricas, agua y agua gasificada. Capítulo XII. In: [www.anmat.gov.ar](http://www.anmat.gov.ar)
- COFEPRIS (2006). CCAYAC-M-004-2006. Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable. Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. México, D.F. 33 pp.
- De Victorica J., Galván M. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* as an indicator of health risk in water for human consumption. *Water Science and Technology*, 43:49–52.
- Jiménez B. E. (2002). *La Contaminación Ambiental en México*. México D.F. Ed. Limusa.
- Maturin, LJ; Peeler, JT. (1998). Aerobic plate count. In: *Bacteriological analytical manual* (capítulo 3). 8 ed. FDA, Maryland.
- MUNN, CB. (2004). *Marine Microbiology: ecology and applications*. New York: BIOS Scientific Publisher.
- Pascual Anderson, M., & Calderón Pascual, V. (2000). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Madrid: Díaz de Santos, S.A.
- Prescott L; Harley J; Klein D. (1996). *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill. Madrid, España.
- Rice, E.W.; R.B. Baird; A.D. Eaton; L.S. Clesceri. (2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22da ed. APHA, AWWA y WEF. Washington, EUA. 1496 p.
- SECOFI (1987). Norma Mexicana NMX-AA-42-1987. Calidad del agua: determinación del número más probable (NMP) de coliformes totales,

coliformes fecales (termotolerantes) y *Escherichia coli* presuntiva. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Diario Oficial de la Federación. 3 de Junio de 1987.