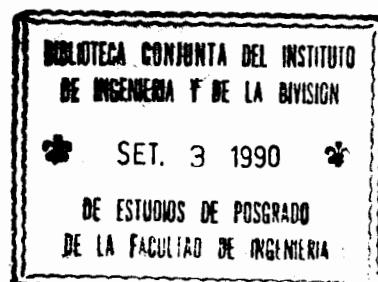


# **MICROBIOLOGIA SANITARIA**

## **(Manual de Prácticas)**

**Gabriela Moeller Chávez**  
**Catalina Ferat Toscano**



**D-85**

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Y ENSEÑANZA DE LA FÍSICA

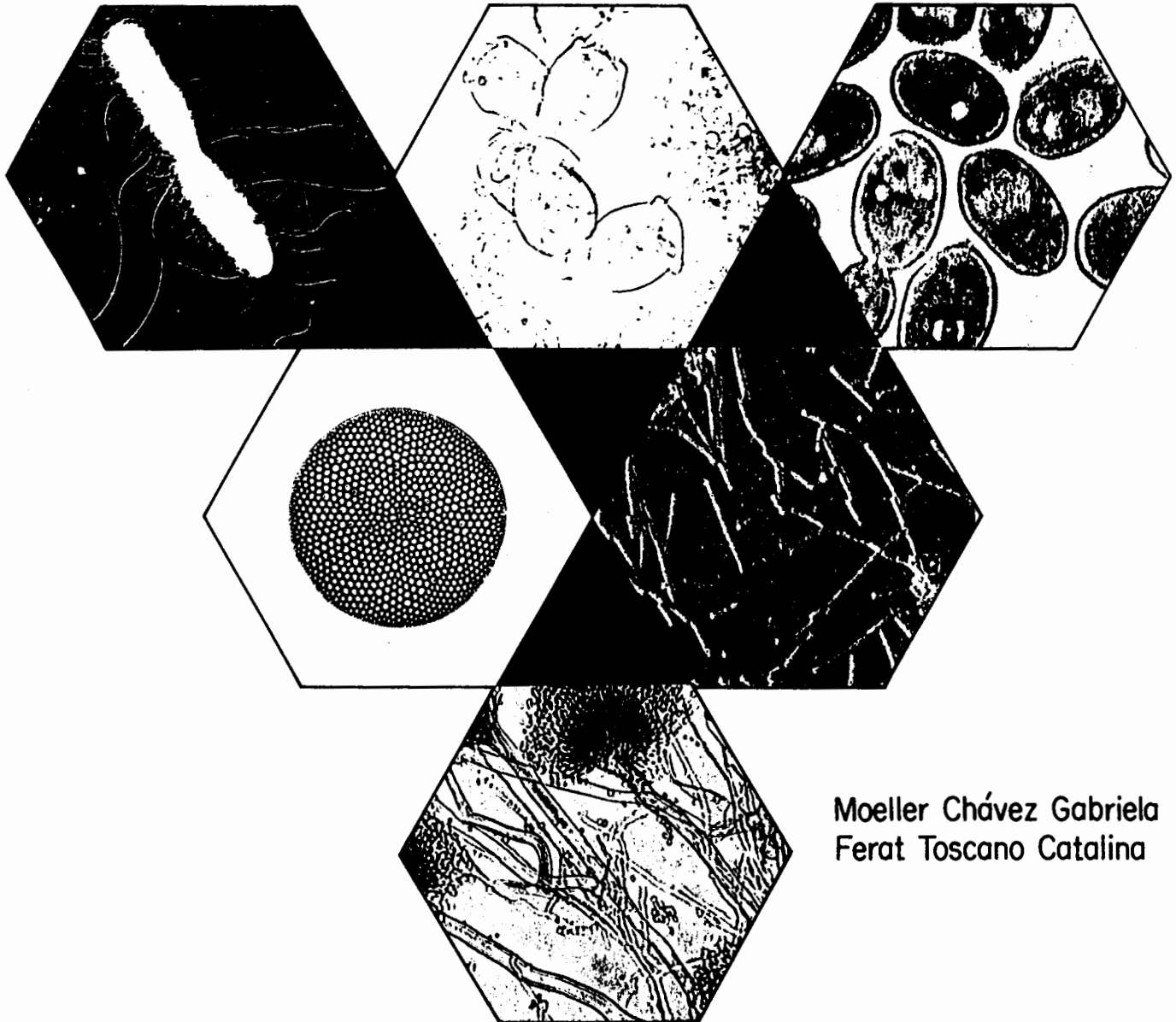


DEPFI

F  
DEPFI  
D-85  
1990  
E2.2

DEPFI

# MANUAL DE PRACTICAS MICROBIOLOGIA SANITARIA

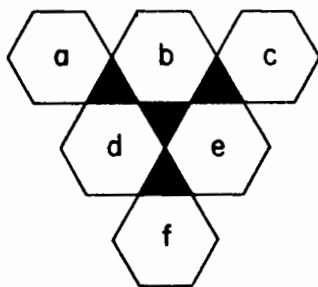


Moeller Chávez Gabriela  
Ferat Toscano Catalina

FACULTAD DE INGENIERIA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

G(2)- 3043





- a) Bacterias capsuladas : *Klebsiella pneumoniae*
- b) Protozooario : ciliado : *Vorticella* sp
- c) Levadura : *Candida utilis*
- d) Alga diatomea : *Coscinodiscus* sp
- e) Virus del mosaico del tabaco
- f) Hongos : *Aspergillus* sp



## INTRODUCCION

El objetivo de la elaboración del presente manual de prácticas de microbiología sanitaria obedece a la necesidad que han manifestado los estudiantes de la materia, debido a que el material que debe cubrirse va desde los conceptos fundamentales de la microbiología hasta las técnicas específicas de aplicación en el área de la Ingeniería Ambiental y dado, que la población de estudiantes que se inscriben en la Maestría en Ingeniería (Ambiental) es heterogénea y que en su mayoría provienen de carreras de Ingeniería, tienen poca o nula experiencia en el trabajo de laboratorio.

El temario del laboratorio comprende:

15 prácticas que se desarrollan durante un semestre según lo aprobado por el Consejo Universitario en el plan de estudios para la obtención del grado de Maestro en Ingeniería (Ambiental) y que complementan los conceptos teóricos de la asignatura del mismo nombre.

El manual lo constituyen 4 partes:

La primera, de indicaciones generales sobre el trabajo de laboratorio, la segunda, sobre las técnicas básicas de Microbiología, la tercera, sobre las técnicas específicas aplicadas a la Ingeniería Ambiental y la cuarta, un apéndice con las técnicas para la preparación de los reactivos y medios de cultivo utilizados.

Cada práctica se ha tratado de ilustrar, ya sea con tablas o esquemas, según el caso, con objeto de que las técnicas resulten mas comprensibles para el alumno.

Los microorganismos, no sólo proveen las bases para el entendimiento de todos los procesos biológicos que suceden en el ambiente, sino que son las herramientas para el control de los mismos.

Se espera que este manual cumpla con los objetivos propuestos y encienda en los estudiantes la chispa para el estudio de los microorganismos que son los personajes más importantes en el estudio de la Ingeniería Ambiental.

# CONTENIDO

## PARTE 1

Págs.

|                                                |   |
|------------------------------------------------|---|
| Instrucciones generales en el laboratorio..... | 6 |
|------------------------------------------------|---|

## PARTE 2

### Técnicas básicas en microbiología.

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.- Lavado y esterilización de material de laboratorio.....                                                     | 11 |
| 2.- Preparación de medios de cultivo.....                                                                       | 17 |
| 3.- Presencia de microorganismos en el medio ambiente.....                                                      | 22 |
| 4.- Microorganismos en cultivo puros. Siembra en medios líquidos y sólidos. Aislamiento de microorganismos..... | 26 |
| 5.- Microscopio.....                                                                                            | 37 |
| 6.- Técnicas de tinción. Observación microscópica de bacterias, levaduras, hongos y protozoarios.....           | 45 |
| 7.- Actividad bioquímica de las bacterias. Enzimas.....                                                         | 57 |

## PARTE 3

### Técnicas específicas aplicadas a la Ingeniería Ambiental.

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 8.- Análisis de aire.....                                                                                                 | 66  |
| 9.- Análisis bacteriológico del agua. Muestreo.....                                                                       | 69  |
| 10.- Análisis bacteriológico del agua. Cuenta en placa.....                                                               | 76  |
| 11.- Análisis bacteriológico del agua. Determinación de coliformes. Técnica de los tubos múltiples de fermentación.....   | 80  |
| 12.- Análisis bacteriológico del agua. Determinación de coliformes fecales. Pruebas diferenciales. Reacciones IMViC ..... | 93  |
| 13.- Determinación de otros índices de contaminación. Streptococos fecales. Determinación del número más probable.....    | 101 |
| 14.- Colimetría por el Método de Filtro de Membrana.....                                                                  | 108 |
| 15.- Análisis de lixiviados y comportamiento de microorganismos en diferentes tipos de suelos.....                        | 113 |

## PARTE 4

|                                                   |     |
|---------------------------------------------------|-----|
| Preparación de reactivos y medios de cultivo..... | 120 |
|---------------------------------------------------|-----|

Es de suma importancia que el alumno previo a la realización de la práctica comprenda en su totalidad lo que se hará, como se efectuará y porqué.

**PARTE 1**

**INSTRUCCIONES GENERALES EN**

**EL LABORATORIO**

## **REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE INGENIERIA AMBIENTAL DE LA DEPTI**

Toda persona que haga uso del laboratorio, deberá sujetarse al presente reglamento.

- 1.- En el área de trabajo del laboratorio es indispensable el uso de bata.
- 2.- No se permite fumar, comer o beber dentro del laboratorio.
- 3.- No se debe hacer uso inadecuado del equipo, cristalería o reactivos.
- 4.- No sustraer equipo, cristalería o reactivos, si no se cuenta con la autorización correspondiente.
- 5.- Abstenerse de reparar o intentar reparar equipo por iniciativa propia.
- 6.- Durante el período de prácticas las mesas deben mantenerse lo más limpias posibles, por lo que hay que secar inmediatamente cualquier salpicadura o mancha que se produzca. Cuando la práctica termine cada estudiante deberá limpiar su lugar antes de abandonar el laboratorio.
- 7.- No deben dejarse mecheros encendidos si no se está trabajando con ellos. Así mismo debe evitarse la proximidad del mechero a sustancias inflamables tales como alcohol, éter, parafina, etc.
- 8.- El material de vidrio que se vaya a utilizar deberá ser requerido mediante un vale de salida, y a su entrega deberá estar perfectamente limpio y en estado semejante al que fue entregado.
- 9.- Evitar manipular equipo del cual se desconoce su operación, así como también equipo que no se esté usando.
- 10.- Observar las medidas de seguridad correspondientes a los diferentes laboratorios.

## **INFORMACION GENERAL ACERCA DEL LABORATORIO**

**Durante la práctica, se deberá usar bata blanca. No se permitirá realizar la práctica a la persona que no la use.**

**No tendrá derecho a examen final, la persona que reuna durante el semestre más de 4 faltas de asistencia.**

**Los reportes de cada práctica deberán contener en forma breve la siguiente información:**

- OBJETIVO**
- GENERALIDADES**
- PROCEDIMIENTO**
- RESULTADOS**
- CONCLUSIONES**
- BIBLIOGRAFIA**

**Cada reporte deberá entregarse a más tardar dos sesiones después de concluida la práctica.**

**A cada alumno se le entregará mediante un vale el equipo y material de laboratorio necesario para realizar las prácticas.**

**Una vez concluidas éstas, se deberá regresar éste equipo en las mismas condiciones en las que se recibió.**

**El material roto o dañado deberá ser repuesto por el alumno responsable.**

## **MEDIDAS PREVENTIVAS EN CASO DE QUEMADURAS CON ACIDOS, ALCALIS O CALOR.**

### **QUEMADURAS PRODUCIDAS POR ACIDOS:**

#### **ACIDO SULFURICO:**

- 1.- Inmediatamente absorber con un trapo o toalla de papel el ácido que haya quedado sobre la piel.
- 2.- Sumergir o bañar con agua la región dañada durante el tiempo suficiente para que se diluya el ácido.
- 3.- Aplicar una cataplasma de bicarbonato de sodio, con el fin de neutralizar la acción del ácido.

#### **EN LOS OJOS:**

- 1.- No lavar con agua simple, sino directamente con agua carbonatada.

#### **ACIDOS EN GENERAL:**

- 1.- Absorber el ácido que haya en la piel con un trapo.
- 2.- Lavar perfectamente con agua para diluir el ácido.
- 3.- Aplicar una cataplasma de bicarbonato de sodio.

### **QUEMADURAS PRODUCIDAS POR ALCALIS:**

- 1.- Rápidamente secar el álcali que quedó en la piel.
- 2.- Lavar con agua abundantemente.
- 3.- Aplicar compresas de ácido pícrico diluido, o bien, aplicar pomada del mismo o picrato de butesín o Hipoglos.

#### **EN LOS OJOS:**

- 1.- Lavar con agua simple
- 2.- Después lavarles con agua boricada.

### **QUEMADURAS PRODUCIDAS POR CALOR:**

- 1.- Aplicar cualquier grasa, vaselina, picrato de butesín o Hipoglos.

Después de aplicar los tratamientos anotados, acudir al médico.

**RECUERDE ADEMAS, QUE EL TRABAJAR CON MICROORGANISMOS IMPLICA UN RIESGO PARA LA SALUD POR LO QUE HAY QUE TENER ESTRUCTAS MEDIDAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD, ADEMAS DE SEGUIR LAS INSTRUCCIONES E INDICACIONES DEL PROFESOR DE PRACTICAS.**

**PARTE 2**

**TECNICAS BASICAS EN MICROBIOLOGIA**

## **PRACTICA 1**

### **LAVADO Y ESTERILIZACION DE MATERIAL DE LABORATORIO**

#### **INTRODUCCION**

La esterilización es la eliminación completa de cualquier forma de vida y existen varios métodos para llevarla a cabo.

La elección del método depende de la naturaleza física del material que se va a esterilizar y del uso que se le piensa dar. Entre los métodos utilizados tenemos:

#### **Calor al rojo:**

Se utiliza para las asas de platino empleadas en la siembra o inoculación, para las bocas de los tubos de cultivo y frascos, portaobjetos y cubreobjetos. Se esteriliza suspendiéndolos en la flama de un mechero.

#### **Ebullición:**

El agua en ebullición mata a las formas vegetativas por coagulación de las proteínas, pero no mata a las esporas. Este método raramente se usa en el trabajo de laboratorio.

#### **Esterilización por vapor:**

El vapor esteriliza por coagulación de las proteínas. El vapor a presión es un agente esterilizante debido a que se alcanzan temperaturas superiores a las alcanzadas por ebullición.

El aparato de laboratorio diseñado para esterilizar por este método se llama autoclave.

Consiste en una doble cámara que puede saturarse de vapor y mantenerse a una determinada presión y temperatura durante un tiempo largo. Es importante que el aire de la cámara sea reemplazado por completo por vapor saturado. Si hay aire presente, se alcanzará una temperatura inferior.

Este método es empleado para esterilizar medios de cultivo, soluciones, cantidades medidas de agua en tubos o botellas, material de cristalería, etc.

Generalmente se opera a una presión de 15 lb/pulg.<sup>2</sup> (121°C). El tiempo de operación depende de la naturaleza del material por esterilizar, del tipo de recipiente y del volumen.

## **Esterilización por calor seco:**

El calor seco, a diferencia del calor húmedo, deshidrata las células y oxida sus proteínas.

Se precisan exposiciones de por lo menos una hora a temperaturas de 160 - 180° C que se controlan por medio de un termostato.

Este método de esterilización se emplea para material de vidrio.

## **Radiaciones:**

La luz solar tiene un poderoso efecto germicida. Esta propiedad se debe a los rayos de luz muy cortos de alta frecuencia llamados ultravioleta, que matan a las bacterias cuando su intensidad es fuerte.

## **OBJETIVOS:**

Conocer el tipo de material requerido para llevar a cabo las prácticas del laboratorio, así como las diversas técnicas y aparatos utilizados para la esterilización del mismo.

## **MATERIAL:**

- Horno de esterilización
- Autoclave
- Mechero Bunsen
- Tubos de ensaye
- Cajas Petri
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas graduadas de 1 y 5 ml.
- Algodón
- Papel de envoltura
- Agua destilada

## **PROCEDIMIENTO, LIMPIEZA Y ESTERILIZACION DE MATERIAL DE VIDRIO.**

### **I.- LIMPIEZA.**

- a) Lavar el material con agua y jabón, enjuagar con agua de la llave.
- b) Enjuagar con agua acidulada y escurrir.
- c) Lavar el material con mezcla crómica y enjuagar perfectamente con agua destilada.

Al efectuar el procedimiento, tenga precaución debido a la corrosividad de la mezcla crómica.

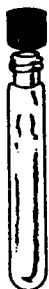
## **II.- ESTERILIZACION.**

- a) Proceda a tapar las bocas de los tubos, matraces y pipetas con tapones fabricados de algodón y gasa.
- b) Envuelva el material con papel de estrasa de acuerdo con las instrucciones dadas y acomódelo cuidadosamente en el interior del aparato de esterilización.
- c) Mantenga el material durante el tiempo adecuado a las condiciones de esterilización ( 1 hora a  $160 - 180^{\circ}\text{C}$  si se emplea horno, y si se utiliza autoclave, 15 minutos después de alcanzada la presión de 15 lb. / pulg<sup>2</sup> ).
- d) Apague el aparato de esterilización, deje enfriar el material y guarde el material envuelto hasta que lo desee utilizar.

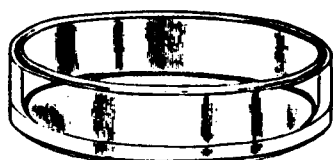
### **PROCEDIMIENTO SIMPLIFICADO PARA EL USO DEL AUTOCLAVE:**

- 1.- Comprobar el nivel del agua.
- 2.- Colocar en su interior el material a esterilizar.
- 3.- Atornillar la tapa, apretar las tuercas por parejas diametralmente opuestas de forma que la tapa encaje perfectamente sobre la arandela.
- 4.- Abrir la válvula de vapor y encender la fuente de calor.
- 5.- Una vez que salga el vapor por la válvula de seguridad, se espera al menos 5 minutos para expulsar todo el aire y cerrar la válvula.
- 6.- Vigilar el manómetro y la válvula de seguridad. Cuando se alcanza la presión requerida, disminuir la intensidad del calor.
- 7.- Dejar que transcurra el tiempo necesario. Apagar la fuente de calor.
- 8.- Esperar a que el manómetro descienda a cero, abrir la llave de vapor.
- 9.- Esperar 5 minutos y abrir la tapa.

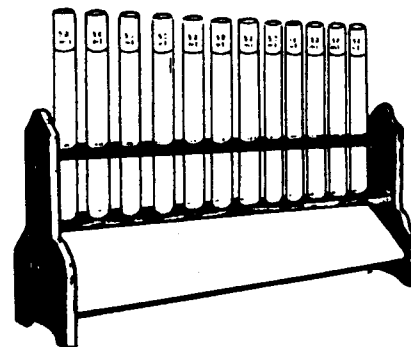
La figura 1 presenta el equipo de laboratorio mas comunmente utilizado en microbiologia.



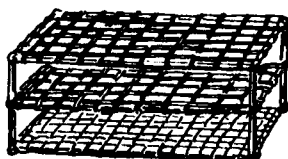
**TUBO DE ENSAYE CON  
TAPON DE ROSCA**



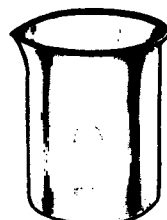
**CAJA DE PETRI**



**TUBOS DE ENSAYE Y GRADILLA**



**GRADILLA PARA TUBOS  
DE ENSAYE**



**VASO DE  
PRECIPITADO**



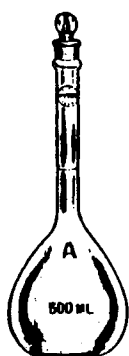
**MATRAZ  
ERLENMEYER**



**ASA DE INOCULACION**



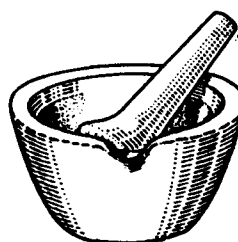
**CAPSULA DE EVAPORACION  
O DE PORCELANA**



**MATRAZ  
AFORADO**



**PROBETA  
GRADUADA**



**MORTERO Y MANO  
O PISTILO**



**VIDRIO DE RELOJ**



**AGITADOR**

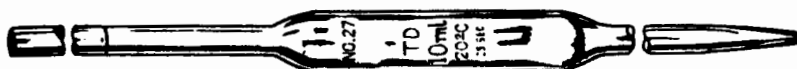


**LUPA**

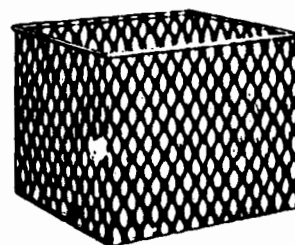
**Fig 1 EQUIPO MAS UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**



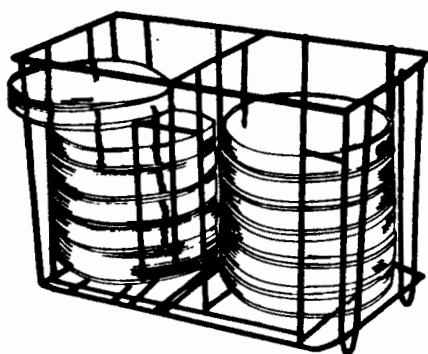
PIPETA GRADUADA O DE MOHR



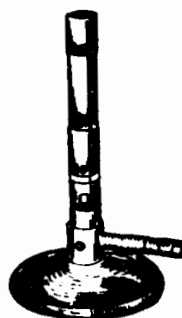
PIPETA VOLUMETRICA



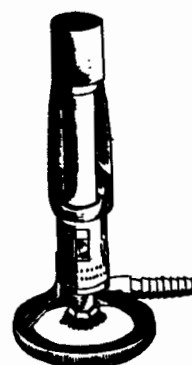
CANASTILLA PARA  
TUBOS DE ENSAYE



CANASTILLA PARA CAJAS DE PETRI



MECHERO  
DE BUNSEN



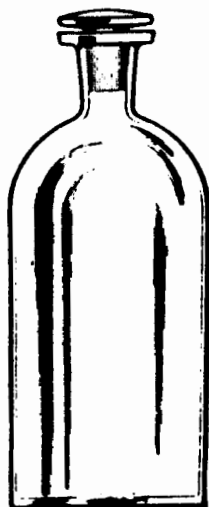
MECHERO FISHER  
( Para alta temperatura )



FRASCO  
GOTERO



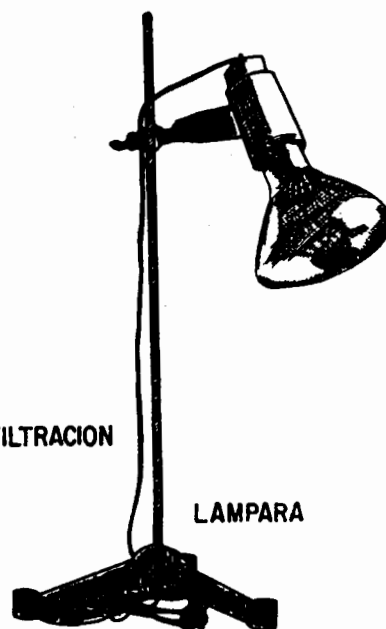
PIPETERO



FRASCO PARA MUESTRA  
DE AGUA

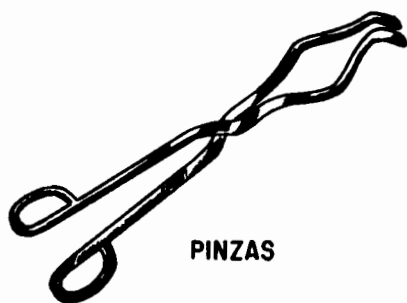


EMBUDO PARA FILTRACION  
Y SOPORTE

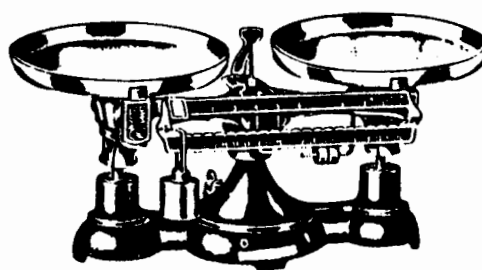


LAMPARA

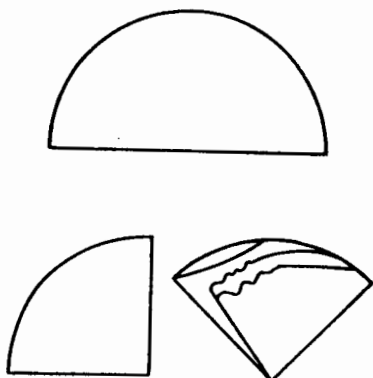
Fig 1 CONTINUACION



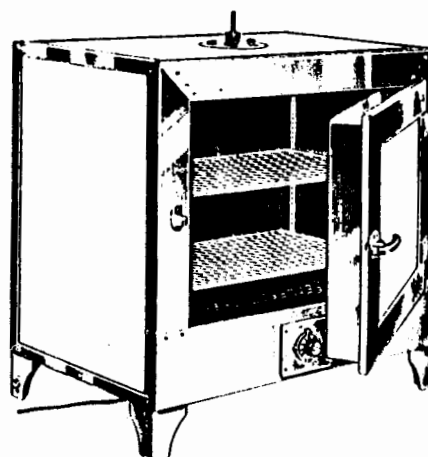
**PINZAS**



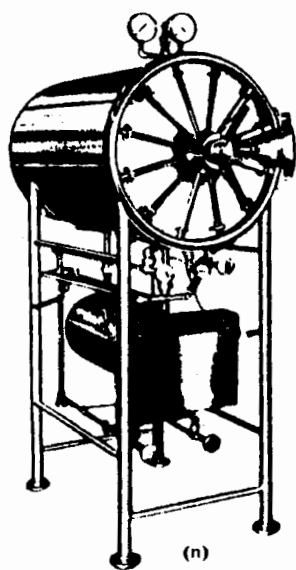
**BALANZA GRANATARIA**



**PAPEL FILTRO**

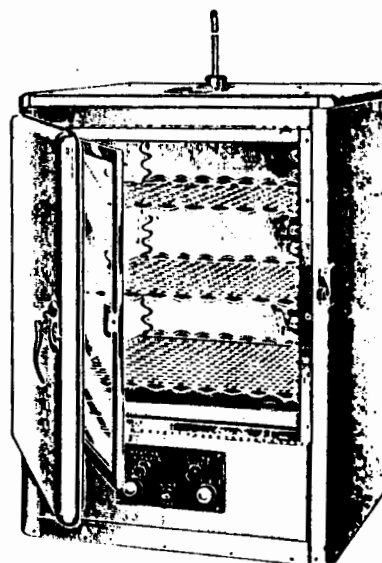


**ESTERILIZADOR DE AIRE CALIENTE**



(n)

**AUTOCLAVE**



**INCUBADORA**

**Fig 1 CONTINUACION**

## PRACTICA 2

### PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

#### INTRODUCCION

El estudio de algunos procesos bioquímicos fundamentales de las células se han realizado en microorganismos debido a que son fáciles de cultivar en el laboratorio bajo condiciones controladas que permiten verificar sus características en generaciones sucesivas en tiempos relativamente cortos.

Para cultivar los microorganismos en el laboratorio, es necesario conocer los requerimientos nutricionales de cada cepa en particular y controlar factores físicos como temperatura y pH (la mayoría de las bacterias pueden crecer en una temperatura de 30 °C o más, aunque algunas cepas se alejan mucho de este rango); el rango normal de pH tolerado es de 5 a 8.

Para controlar el pH se usan generalmente medios de cultivo regulados.

Todas las células requieren para su crecimiento normal de:

- agua
- una fuente de carbono
- una fuente de nitrógeno
- azufre
- fósforo
- una fuente de energía
- y sales minerales (sodio, potasio, calcio, magnesio) en cantidades pequeñas.

Tantos los microorganismos como las plantas requieren que éstos nutrientes estén en solución para poderlos asimilar. Por ello se debe seleccionar el medio de cultivo de tal manera que contenga los elementos necesarios para el adecuado crecimiento de la cepa que se desea.

Los medios de cultivo se han clasificado de acuerdo con su composición química y el uso a que estén destinados en:

- enriquecidos
- selectivos
- diferenciales
- de prueba
- de conteo
- de mantenimiento

o bien, considerando su consistencia, se clasifican en:

- sólidos
- semisólidos y
- líquidos.

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Existen algunos materiales de uso muy común en la preparación de medios de cultivo como son las peptonas, el extracto de carne, extracto de levadura y el agar. Estos materiales, nutrientes para la célula, hacen posible el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos.

El caldo nutritivo y el agar nutritivo son ejemplos de medios líquidos y sólidos que permiten el desarrollo de muchos tipos de microorganismos heterótrofos.

La tabla 2.1 resume las características de los materiales mencionados anteriormente.

**TABLA 2.1**

**CARACTERISTICAS DE LOS MATERIALES QUE SE USAN COMO  
INGREDIENTES EN LOS MEDIOS DE CULTIVO**

| MATERIAL             | CARACTERISTICAS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | VALOR NUTRITIVO                                                                                                                                                                                    |
|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Extracto de carne    | Extracto acuoso de carne magra de res concentrado en pasta.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Contiene las sustancias solubles en agua de tejidos animales, entre ellos carbohidratos, compuestos orgánicos nitrogenados, vitaminas solubles en agua y sales.                                    |
| Peptona              | Producto que resulta de la digestión de materiales proteínicos, ejemplo: carne, gelatina y caseína. La digestión del material proteínico se efectúa con ácidos o enzimas; sirven para hacer medios de cultivo bacteriológicos, diferentes tipos de peptonas (dependiendo de la proteína usada y el método de digestión). Existen diferencias entre las peptonas en cuanto a su propiedad para permitir el crecimiento bacteriano | Fuente principal de nitrógeno orgánico; puede contener también algunas vitaminas y algunas veces carbohidratos, esto en relación al material protéico digerido.                                    |
| Agar                 | Carbohidratos complejos obtenidos de ciertas algas marinas, procesadas para eliminar sustancias extrañas.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | Se usa como agente solidificante de los medios de cultivo. Se disuelve en solución acuosa, gelifica cuando la temperatura baja de 45°C. No se considera al agar como nutriente para las bacterias. |
| Extracto de levadura | Es un extracto en solución acuosa de levaduras, se obtiene comercialmente en polvo.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Es una fuente muy rica en vitamina B, contiene N orgánico y compuestos de carbono.                                                                                                                 |

## **OBJETIVO**

Conocer los medios de cultivo que frecuentemente se utilizan para el crecimiento de microorganismos, así como su composición y forma de preparación.

## **MATERIAL**

- Matraces Erlenmeyer
- Tubos de ensaye
- Cajas de Petri
- Mechero
- Balanza
- Algodón
- Autoclave
- Espátula.

## **MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo

## **PROCEDIMIENTO**

### **A) AGAR NUTRITIVO.**

#### **Componentes:**

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Extracto de carne | 3.0 g      |
| Peptona           | 5.0 g      |
| Agar-agar         | 15.0 g     |
| Agua destilada    | 1000.0 ml. |

Pesar los ingredientes de acuerdo a lo señalado y disolverlos en una parte de agua, se ajusta el pH entre 6.8 y 7.2. El ajuste se puede efectuar con ácido acético muy diluido o hidróxido de amonio diluido.

Para que se mezclen perfectamente los componentes del medio de cultivo, se calientan en un matraz, agitando hasta lograr una buena disolución. después de lo cual se completan al volumen total, se tapa el matraz y tubos con tapones de algodón doblados a la mitad y envueltos en gasas procurando que embonen bien con la boca del matraz. Posteriormente se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 lb./pulgada<sup>2</sup> de presión.

## **B) CALDO NUTRITIVO.**

### **Componentes**

|                   |            |
|-------------------|------------|
| Extracto de carne | 3.0 g      |
| Peptona           | 5.0 g      |
| Agua destilada    | 1000.0 ml. |

Se agrega el extracto de carne y la peptona al agua destilada. Se calienta lentamente y se agita hasta disolución. Se ajusta la reacción para que la lectura de pH, después de la esterilización, se encuentre entre 6.8 y 7.0 Se lleva a ebullición, se enfría a 25°C. Se completa el volumen original con agua destilada y se esteriliza como en el caso anterior.

## **RESULTADOS**

Los medios preparados en esta práctica se utilizarán en las prácticas # 3 y 4.

## **PRACTICA 3**

### **PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN EL MEDIO AMBIENTE**

#### **FLORA MICROBIANA MIXTA**

#### **INTRODUCCION**

Los microorganismos existen en todos y cada uno de los ambientes. El poner en exposición una caja Petri en cualquier ambiente, demostrará la presencia de una gran variedad de microorganismos en el aire, una prueba de ello es el laboratorio, lugar en que se desarrollarán las prácticas y donde existen infinidad de ellos, los cuales se podrán observar después de incubar la caja. Lo mismo sucede si se cultiva una gota de agua de un charco.

La variación que existe entre todos éstos microorganismos puede ser tanto en forma como en estructura celular, movilidad, tamaño, etc.

#### **OBJETIVO**

Demostrar la presencia de microorganismos en cualquier tipo de ambiente.

#### **MATERIAL:**

- 100 mL de agar nutritivo
- 5 cajas de petri estériles
- 1 hisopo de algodón estéril

#### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Fundir el agar nutritivo previamente preparado. Mantener su temperatura aproximadamente a 45°C.
- 2.- Vaciar de 15 a 20 mL de agar nutritivo a cada una de las cajas. Dejar solidificar.
- 3.- Proceder con las cajas de la siguiente manera:

- 3.1.- Destapar una caja y dejarla expuesta al ambiente del laboratorio durante treinta minutos.
  - 3.2.- Tomar el hisopo y tallar los dientes o garganta, depositar la muestra sobre la caja petri.
  - 3.3.- Sacudirse vigorosamente el pelo sobre la superficie de una de las cajas de petri.
- 4.- Con las dos cajas restantes proceder de la siguiente manera:
- 4.1.- Pesar 1.0 g de tierra y depositarlo en una caja de Petri. Vaciar sobre esta el agar líquido y mezclar perfectamente con movimientos rotatorios de la caja. Dejar solidificar.
  - 4.2.- Tomar 1 ml de agua residual y depositarlo en una caja Petri. Vaciar sobre esta el agar líquido y mezclar perfectamente con movimientos rotatorios. Dejar solidificar.
- 5.- Incubar todas las cajas de Petri a temperatura ambiente hasta la siguiente sesión.

**NOTA:**

Las cajas de Petri siempre deben ser incubadas en forma invertida.

**RESULTADOS**

- 1.- Examinar las placas y de ser posible contar el número de colonias.
- 2.- Hacer una descripción minuciosa de las características y apariencia de las colonias presentes, describiendo principalmente las siguientes:
  - superficie
  - consistencia
  - color
  - forma
  - elevación
  - márgenes

Si el crecimiento de colonias en las cajas sembradas es demasiado, seleccionar una muestra de 10 de ellas.

La figura 3.1 presenta algunos ejemplos de formas, elevaciones y márgenes de algunas colonias.

### FORMA



Circular



Irregular



Alargada



Filamentosa



Rizoide

### ELEVACION



Elevada

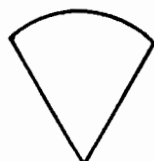


Convexa



Umbonada

### MARGEN



Entera



Ondulada



Lobulada



Filamentosa



Rizada

Fig 3.1 FORMAS , ELEVACIONES Y MARGENES DE COLONIAS BACTERIANAS

3.-Anotar la descripción y características de las colonias seleccionadas en la siguiente tabla:

| MUESTRA | NUMERO DE COLONIAS EN LAS PLACAS | REPRESENTACION DE LAS COLONIAS PREDOMINANTES | OBSERVACIONES |
|---------|----------------------------------|----------------------------------------------|---------------|
| 1       |                                  |                                              |               |
| 2       |                                  |                                              |               |
| 3       |                                  |                                              |               |

4.- COMENTARIOS Y OBSERVACIONES ADICIONALES.

## **PRACTICA 4**

### **MICROORGANISMOS EN CULTIVOS PUROS. SIEMBRA EN MEDIOS LIQUIDOS Y SOLIDOS. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.**

#### **INTRODUCCION**

Los microorganismos en su estado y habitat natural no existen en forma pura, sino en comunidades o poblaciones microbianas mezcladas. Sin embargo, la mayoría de los estudios microbiológicos se realizan aislando a los organismos y estudiando su comportamiento en cultivos puros (cultivo conteniendo solamente un sólo tipo de microorganismo).

#### **OBJETIVOS**

Conocer los diferentes tipos de siembra utilizados en microbiología, así como, aprender a hacer siembra de microorganismos y el modo de obtener cultivos puros.

#### **MATERIAL**

- Cajas de Petri estériles
- Tubos de dilución
- Pipetas estériles
- Asa de siembra

#### **MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo.

#### **CEPAS UTILIZADAS**

- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*
- *Sarcina lutea*
- *Serratia marcescens*

## **ATIPOS DE SIEMBRAS EN MEDIO SOLIDO.**

Para obtener un resultado lo más cercano posible a la realidad de un análisis microbiológico, es necesario hacer diluciones de la muestra problema, para lo cual la mesa de trabajo debe de limpiarse perfectamente (agua y jabón ). Se colocan dos mecheros encendidos, los cuales den un radio de protección estéril de aproximadamente un metro.

### **PREPARACION DE LAS DILUCIONES**

1.- Colocar en una gradilla los tubos con agua destilada estéril y rotularlos como 1/10 , 1/100 , y 1/1000, etc..

2.- Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml. de la muestra problema al tubo rotulado como 1/10. Esta operación se realiza quitando el tapón del tubo con los dedos meñique y anular de la mano derecha, se toma 1 ml de muestra, se vierte en el tubo de dilución y se tapa nuevamente agitando la dilución. No olvidar que cada vez que se quita el tubo se debe flamear el labio del mismo.

3.- Para hacer la dilución 1/100 se transfiere 1 ml del tubo 1/10 al de 1/100 manipulando como en el anterior.

4.- Por último, para preparar la dilución 1/1000 se pasa 1 ml de la de 1/100 a la de 1/1000, y así sucesivamente para las diluciones subsecuentes.

En cada transferencia se debe de emplear una pipeta estéril.

La figura 4.1 muestra el esquema del procedimiento utilizado para realizar las diluciones.

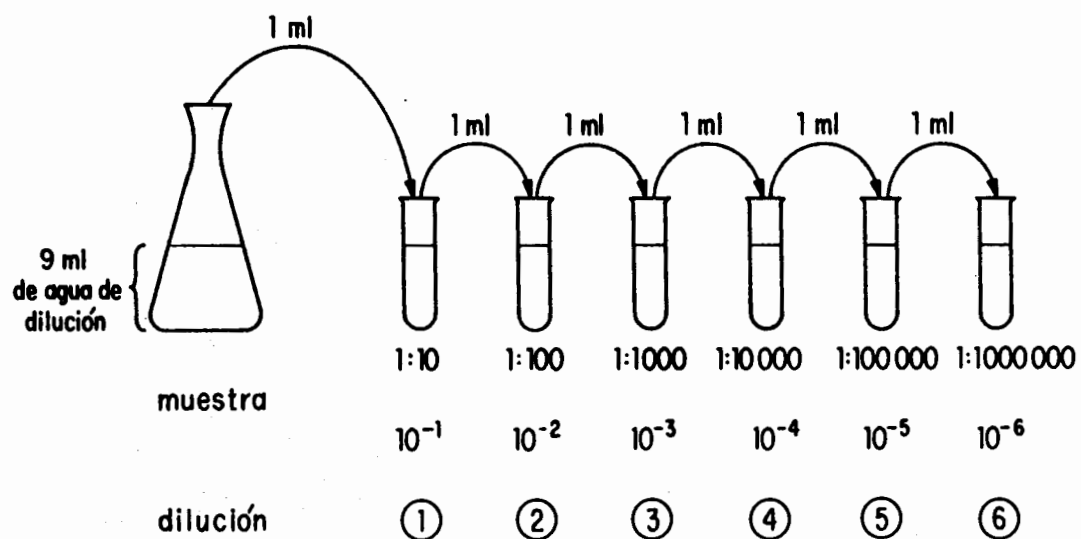


Fig 4.1 Preparación de diluciones de la muestra

## **SIEMBRAS**

Para hacer las siembras bacteriológicas, el medio de cultivo de los matraces (sólido) se funde, colocando éste en Baño María y posteriormente se procede al llenado de las cajas de Petri. Esta operación se trabaja bajo las mismas condiciones de esterilidad que en la preparación de diluciones.

Se toma la caja de Petri estéril y se destapa con los dedos índice y pulgar, y se sostiene la base con los demás ; se flamea el labio de la caja. Con la otra mano se destapa el matraz que contiene el medio de cultivo, sosteniendo el tapón con los dedos meñique y anular. También se flamea la boca del matraz y se vierte en la caja de Petri a 3/4 partes de su capacidad, se deposita ésta sobre la mesa de trabajo y se deja solidificar el medio.

El llenado de los tubos de cultivo se realiza en forma semejante al de las cajas de Petri. Para solidificar el medio es necesario conocer si la siembra en ellos va a ser por picadura o por estrias.

Para el primero, el medio se deja enfriar con el tubo en posición vertical, para el segundo se inclina el tubo en posición a 45°.

Existen varios tipos de siembra:

- en placa y
- en tubo de cultivo.

El primero se recomienda para cuando se utilizan medios de cultivo generales y el segundo para resiembra y aislamiento de microorganismos.

### **SIEMBRA EN PLACA**

Se conocen como siembra en placa a las que se hacen en una caja de Petri con el medio de cultivo solidificado. Siempre debe de trabajarse en condiciones de esterilidad.

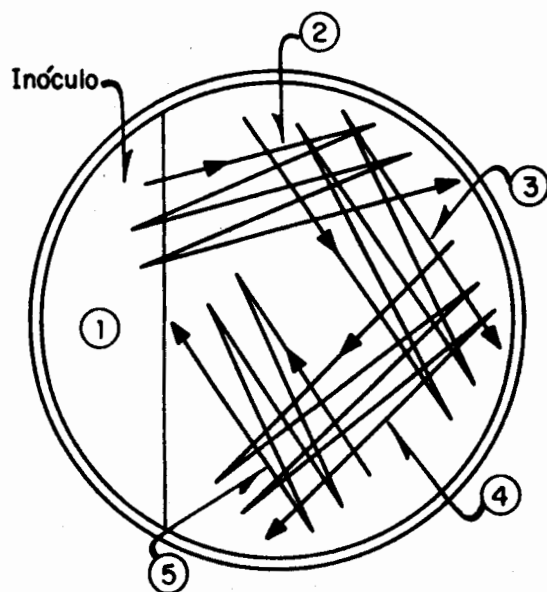
Dentro de este tipo de siembras se trabajan dos variedades:

- por estrias y
- por vaciado.

#### **A) SIEMBRA EN PLACA POR ESTRIAS:**

Se esteriliza un asa de siembra recta en la región de mayor calor del mechero hasta el rojo vivo. La caja de Petri se abre de igual manera de como cuando se llenó, se flamea el labio y el asa se desliza sobre el medio de cultivo, sin perforar el agar formando estrias.

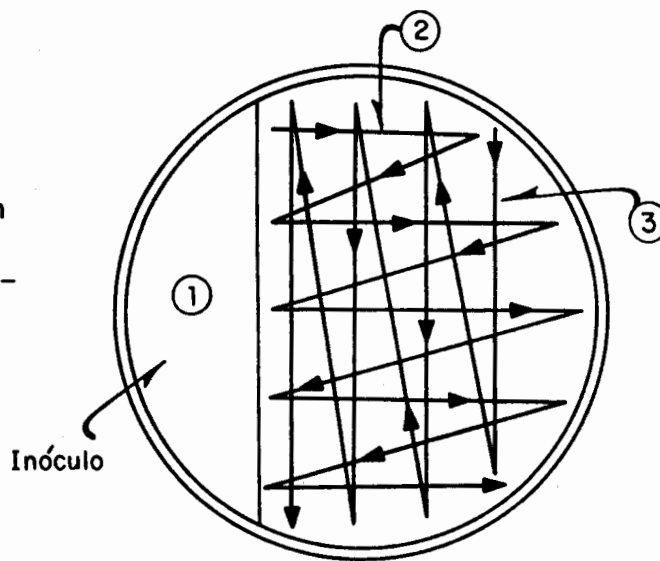
La figura 4.2 muestra un esquema de como se realiza esta operación.



Técnica estandar para siembra. Una pequeña cantidad de inóculo que se toma del área de descarga, se distribuye en la caja por medio de estrías.

TECNICA NORMAL DE SIEMBRA

Siembra en medio selectivo. En estos medios el inóculo es más abundante y no se requiere esterilizar el asa entre cada serie de estrías.



METODO DE SIEMBRA EN UN MEDIO SELECTIVO

Fig 4.2 Siembra en placa por estrías

#### **B) SIEMBRA EN PLACA POR VACIADO:**

Se coloca en una caja de Petri estéril 1 ml de dilución y se cubre con medio de cultivo que no esté caliente pero que se encuentre licuado (en forma de suspensión). Se llena la caja en la misma forma como se indicó con anterioridad. Finalmente se invierten las cajas, cuando hayan solidificado, no sin antes haber agitado en forma de 8. (Ver figura 4.3)

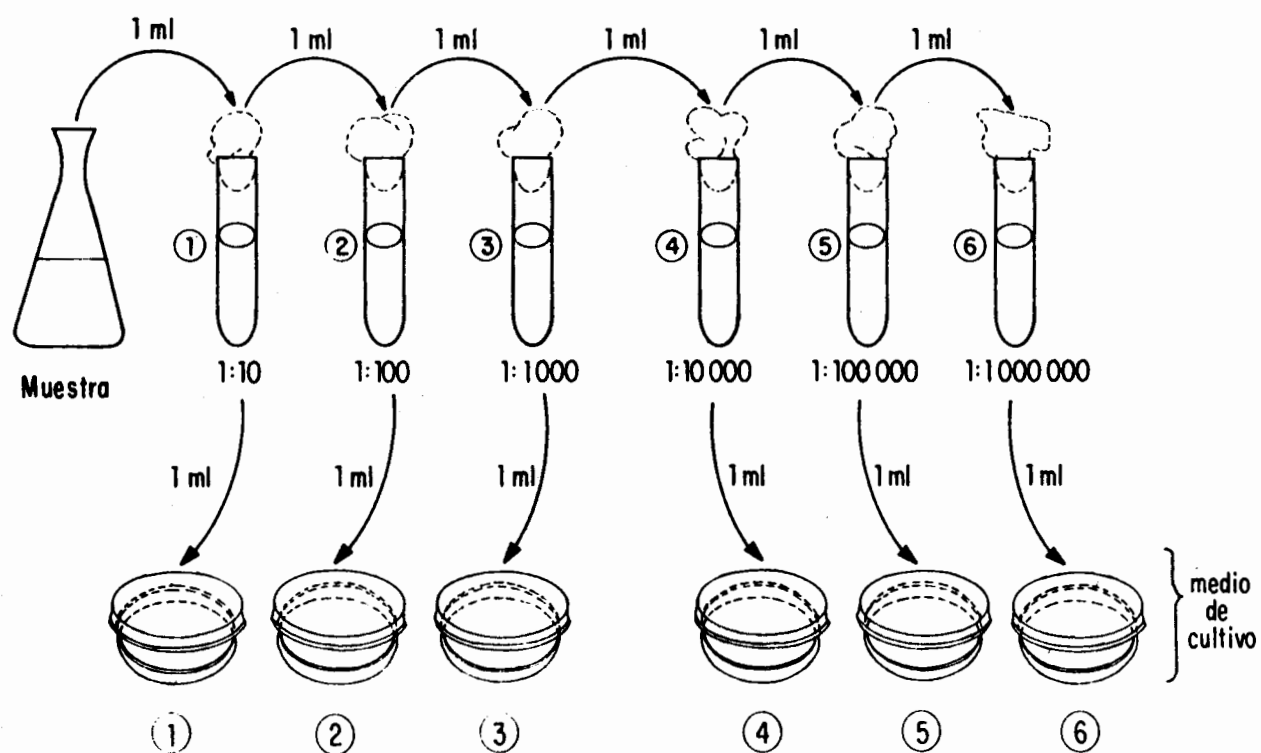


Fig 4.3 Siembra en placa por vaciado

## **SIEMBRA EN TUBOS DE CULTIVO**

Las siembras en tubos de cultivo en medio sólido por lo general se emplean para la purificación de un cultivo proveniente de una placa y se presentan dos variedades:

### **A) POR PICADURA:**

En éste se emplean los medios de cultivo solidificados en forma recta. Se esteriliza un asa de siembra recta y se colecta la colonia que se desea aislar de la placa de cultivo; se introduce en el medio picando longitudinalmente el medio.

### **B) POR ESTRIAS:**

En éste se emplean los medios de cultivo inclinados. Se toma una muestra de colonia con el asa de la siembra estéril y sobre la superficie del medio se desliza ésta en forma de estrías.

Con respecto a los medios de cultivo líquidos o semilíquidos, su preparación depende de agregar o no determinada cantidad de agar, según la viscosidad con la que se requiera trabajar el medio. La siembra en tubos de cultivo en medio líquido se utiliza generalmente para proliferación de la cepa en cuestión y se hace por suspensión.

La figura 4.4 presenta un esquema de cómo se realiza la siembra en tubo en medio sólido.

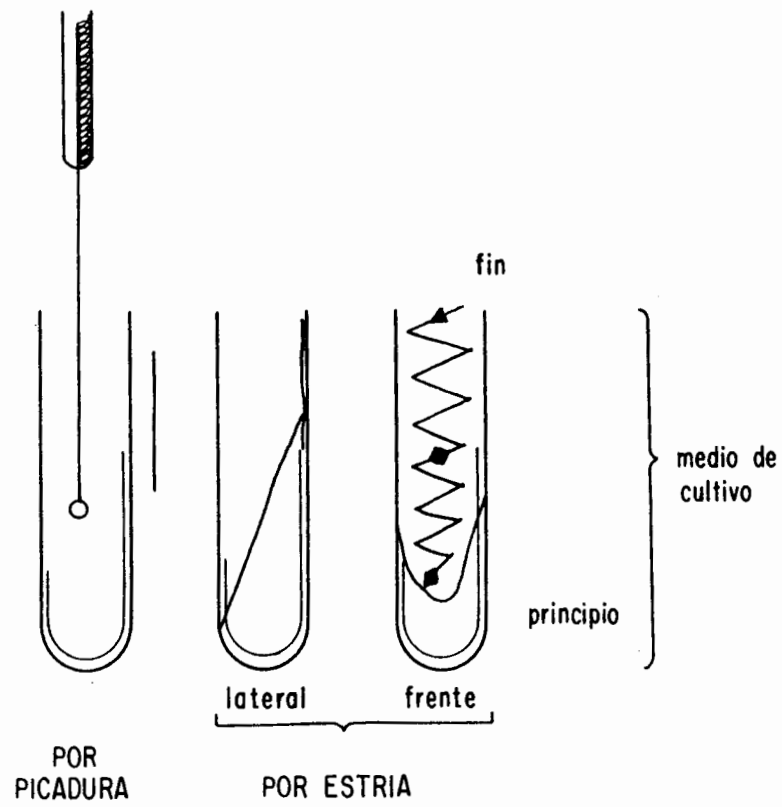


Fig 4.4 Siembra en tubos de cultivo por picadura y por estrías, en medios sólidos

## **PROCEDIMIENTO**

### **1.- SIEMBRA EN TUBO**

#### **1.1.- EN MEDIO SOLIDO**

##### **1.1.1.- POR PICADURA**

Sembrar, de acuerdo con las instrucciones del profesor, cada uno de los tubos con agar nutritivo en recto las cepas proporcionadas. Incubar a 35°C por 24 hrs.

##### **1.1.2.-POR ESTRIA**

Sembrar en cada uno de los tubos con agar nutritivo inclinado las cepas proporcionadas, de acuerdo con las instrucciones dadas por el profesor. Incubar a 35°C por 24 hrs.

#### **1.2- EN MEDIO LIQUIDO**

Sembrar en cada uno de los tubos con caldo nutritivo las cepas proporcionadas, de acuerdo con las instrucciones dadas por el profesor. Incubar a 35 °C por 24 hrs.

### **2.- SIEMBRA EN PLACA**

#### **2.1.-POR VACIADO**

Hacer las diluciones correspondientes a la muestra como se indicó y verter 1 mL. en sendas cajas Petri. Agregar el agar nutritivo a las cajas y mezclar. Incubar a 35 °C por 24 hrs.

#### **2.2.-POR ESTRIAS**

Sembrar en cada una de las cajas las cepas proporcionadas, de acuerdo como se indicó en la sección anterior e incubar a 35 °C por 24 hrs.

## RESULTADOS

1.- Examinar y observar el tipo y características de crecimiento de cada una de las cepas en los diferentes modos de siembra en las placas y tubos.

2.- Hacer una descripción minuciosa de las características y apariencia de las colonias presentes, como se procedió en la primera parte de esta práctica.

3.- Consignar sus observaciones en forma tabular.

| CEPA | CARACTERISTICAS MACROSCOPICAS |           |          |              |
|------|-------------------------------|-----------|----------|--------------|
|      | forma                         | elevación | márgenes | consistencia |
| A    |                               |           |          |              |
| B    |                               |           |          |              |
| C    |                               |           |          |              |

4.- COMENTARIOS Y OBSERVACIONES ADICIONALES.

## **PRACTICA 5**

### **MICROSCOPIO**

#### **INTRODUCCION**

El microscopio es una de las herramientas mas utilizadas en el estudio de los microorganismos, ya que nos proporciona la amplificación necesaria para poder observar a los organismos que no son posibles de ser observados a simple vista. El conocer y entender como funciona este instrumento es de vital importancia para todo trabajo en el laboratorio de microbiología.

Como ya se mencionó, el microscopio es un aparato que aumenta considerablemente las imágenes.

Los microscopios son de dos tipos diferentes: el óptico y el electrónico, según sea el principio en el cuál se basa la amplificación.

En el microscopio óptico se obtiene la amplificación por medio de un sistema de lentes, mientras que en el microscopio electrónico se usa un haz de electrones en lugar de ondas luminosas para obtener la imagen amplificada.

Dentro del microscopio óptico, el mas sencillo es conocido como microscopio simple y consta de una sola lente convergente, también conocida como lupa, de capacidad amplificadora muy reducida.

El aparato más utilizado es el microscopio compuesto o microscopio óptico de campo claro que supera extraordinariamente al anterior ya que básicamente consta de dos sistemas de lentes, una de ellas amplía la imagen del objeto observado, que es captada y nuevamente amplificada por el segundo sistema, consiguiéndose con esto un mayor poder de resolución.

El poder de resolución puede describirse como la capacidad para distinguir dos puntos muy próximos, de modo que puedan verse separados.

Además del microscopio de campo claro, existen los siguientes tipos: de campo oscuro, luz ultravioleta, fluorescencia, y contraste de fases.

La tabla 5.1 resume las características principales de los diferentes tipos de microscopía.

**TABLA 5.1**

**COMPARACION DE DIFERENTES TIPOS DE MICROSCOPIA**

| <b>TIPO DE MICROSCOPIA</b> | <b>AMPLIACION MAXIMA UTIL</b> | <b>ASPECTO DE LA MUESTRA</b>                                                                           | <b>APLICACIONES UTILES</b>                                                                                                             |
|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Campo claro</b>         | 1000-2000                     | Especímenes teñidos o sin teñir, las bacterias generalmente teñidas, aparecen del color del colorante. | Para aspectos morfológicos de bacterias, levaduras, mohos, algas y protozoos                                                           |
| <b>Campo oscuro</b>        | 1000-2000                     | Generalmente sin teñir aparecen brillantes "iluminadas" sobre un fondo oscuro.                         | Para microorganismos que exhiban algún aspecto morfológico característico en vivo y en suspensión en un líquido ejemplo, espiroquetas. |
| <b>Ultravioleta</b>        | 1000-2000                     | No se ve directamente.                                                                                 | Diferenciación de componentes celulares sobre la base de la mayor o menor facultad de absorber la luz ultravioleta.                    |
| <b>Fluorescente</b>        | 1000-2000                     | Brillante y coloreado color del colorante fluorescente.                                                | Técnicas de diagnóstico en las que el colorante fluorescente fijado al organismo revela su identidad                                   |
| <b>Fase de contraste</b>   | 1000-2000                     | Grados variables de "obscuramiento"                                                                    | Para examen de estructuras celulares en células vivas de organismos más grandes como levaduras, algas, protozoos y algunas bacterias   |
| <b>Electrónico</b>         | 200 000-400 000               | Se ve en pantalla fluorescente.                                                                        | Examen de virus y de la ultraestructura de las células microbianas.                                                                    |

## MICROSCOPIA DE CAMPO LUMINOSO.

En este tipo de microscopía el campo observado está iluminado por una fuente de luz.

La figura 5.1 presenta las partes principales del microscopio óptico, así como la trayectoria que siguen los rayos luminosos.

Para facilitar el estudio del microscopio compuesto se han clasificado las diferentes partes que lo forman, en dos sistemas conocidos como:

sistema mecánico y  
sistema óptico.

a) El Sistema Mecánico: está formado por el pie, columna, brazo, tubo del microscopio, revólver, tornillo micrométrico, tornillo macrométrico y platina.

El pie es también conocido como la base y se construye de un metal pesado que unido a su forma de "Y", "U" o circular, le proporciona suficiente estabilidad al aparato.

La columna es una pieza vertical, colocada en la parte posterior del pie y que sostiene las demás piezas.

El brazo, por lo general, es curvo y en la parte superior sostiene el tubo del microscopio, que se une al brazo por medio de un sistema de cremallera, mediante el cual se desliza el tubo verticalmente. Este posee en su parte inferior una pieza giratoria llamada revólver, a la que se adaptan los sistemas oculares.

El movimiento vertical del tubo se realiza por medio de dos tornillos: el de cremallera o tornillo macrométrico, que mueve el tubo con amplitud; y el tornillo micrométrico que mueve el tubo lentamente permitiendo efectuar un enfoque más preciso.

La platina se encuentra en la parte inferior del tubo del microscopio unida horizontalmente a la base del brazo; es una plataforma rectangular o circular, que lleva en el centro una perforación por donde penetra la luz que envía el sistema de iluminación. Tiene, además, dos pinzas desmontables que sirven para sujetar la preparación.

b) Sistema Óptico: comprende dos sistemas de lentes:

el ocular y  
el objetivo.

Los objetivos se fijan al revólver generalmente en número de tres a cinco (dependiendo de la calidad del aparato). Las lentes que forman cada uno de ellas, están montadas dentro de una pieza cilíndrica.

Tanto los oculares como los objetivos llevan un número seguido de una X que indica el aumento que se consigue con dicha lente. El aumento total se calcula multiplicando el aumento del objetivo por el del ocular.

Existen dos tipos de objetivos: el seco y el de inmersión. En los primeros es el aire el medio que se interpone entre el cubreobjetos y la lente frontal del objetivo; con estos objetivos no se pueden obtener aumentos muy grandes porque muchos rayos luminosos se pierden por refracción al pasar de la preparación al aire, por lo que no se puede obtener suficiente luz para hacer una observación con gran aumento.

Los objetivos de inmersión son aquellos en los que se coloca, entre la lente frontal y el cubreobjetos un líquido que comúnmente es aceite de cedro, con índice de refracción parecido al del vidrio, propiedad que permite que penetre mayor número de rayos luminosos al objetivo, obteniéndose luz suficiente para aumentos mayores.

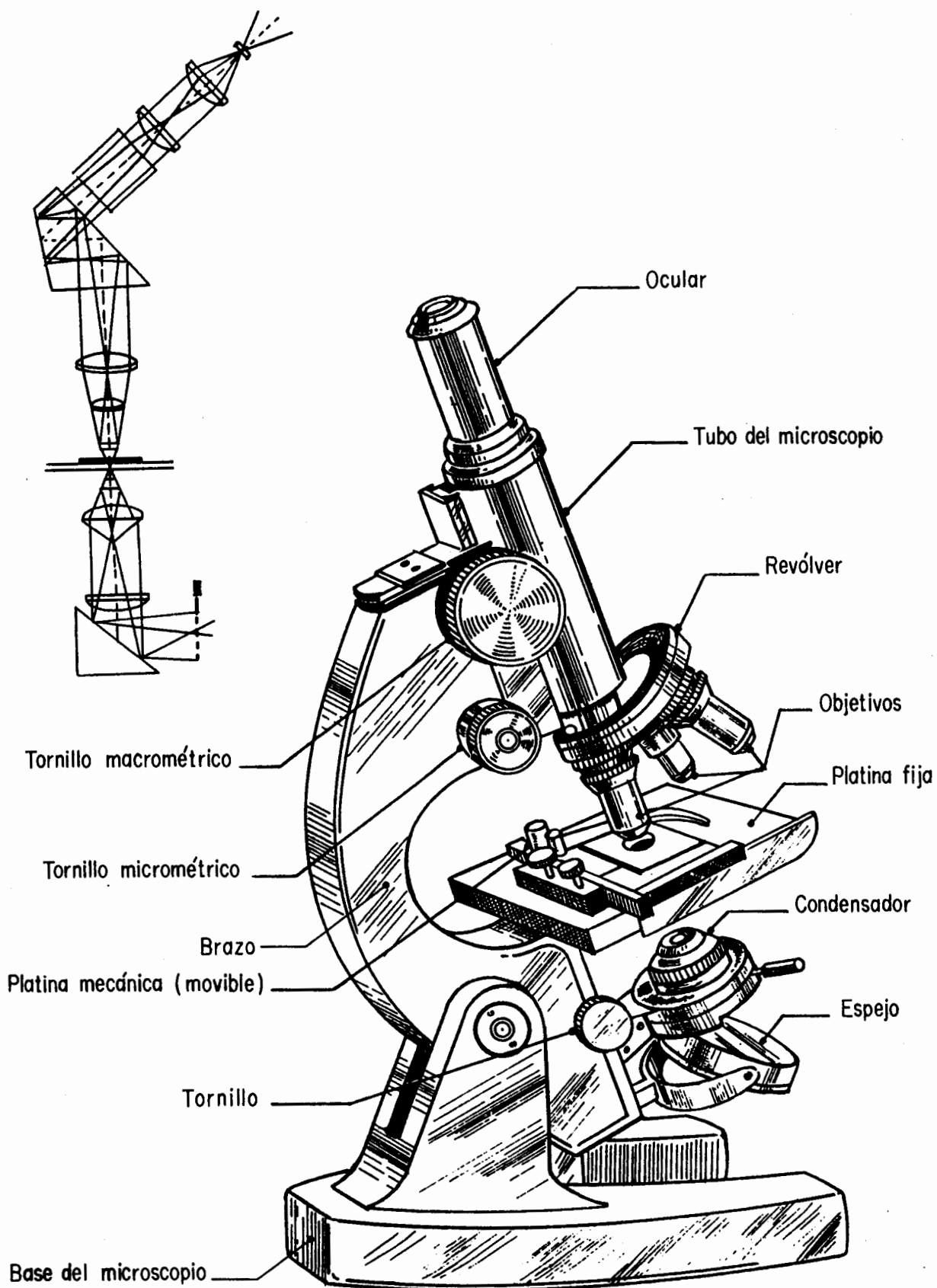
La iluminación: se encuentra debajo de la platina y comprende el espejo, el condensador y el diafragma.

El espejo tiene dos caras, una plana y otra cóncava, las que pueden utilizarse de acuerdo con las necesidades. Cuando no se dispone de condensador de luz, el propio espejo cóncavo hace converger los rayos de la lámpara en la preparación, pero cuando se emplea condensador debe usarse sólo la cara plana del espejo.

El condensador es un sistema de lentes que aumentan poderosamente el cono de iluminación. Su montaje está dispuesto de modo que pueda subir o bajar, aunque en algunos modelos es fijo. El condensador es muy útil cuando se emplean lentes de mayor aumento que exigen una gran cantidad de luz y que no podrían usarse sin su ayuda.

El diafragma: se encuentra unido al condensador y con él se regula la cantidad de luz que pasa al objeto.

Fig 5.1 Microscopio óptico o compuesto



## **OBJETIVO:**

Conocer las partes que forman el microscopio óptico, los principios sobre los que se basa su aplicación, así como saber los cuidados que se deben tener para poderlo utilizar correctamente.

## **MATERIAL:**

- Microscopio
- Lámpara
- Aceite de inmersión
- Papel seda para lentes

## **PROCEDIMIENTO**

### **PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL OBJETIVO DE ACEITE O INMERSION.**

Ya que en la mayoría de las observaciones que se realizarán, el objetivo mas frecuentemente usado es el de aceite o inmersión, se menciona el procedimiento para su uso:

- 1.- Cuando la apertura numérica del objetivo sea mayor de 1.00 debe también utilizarse aceite en el condensador, poniendo una gota en la parte superior del lente.
- 2.- Ponga otra gota de aceite en la parte inferior de la preparación.
- 3.- Ponga la preparación en la platina.
- 4.- Suba el condensador lentamente, hasta que el aceite del condensador toque el aceite de la preparación.
- 5.- Encuentre un campo de la preparación con el objetivo seco débil.
- 6.- Suba el tubo principal con el tornillo macrométrico y ponga el objetivo de inmersión en su posición.
- 7.- Ponga una gota de aceite sobre la preparación.
- 8.- Usando el tornillo macrométrico, mueva el objetivo de inmersión lentamente hacia abajo hasta que el lente toque el aceite de la preparación, en ese momento brillará la luz distinguiéndose el espécimen.
- 9.- Usando el tornillo micrométrico, haga el ajuste fino para observar nítidamente el espécimen.

## **ESTEREOMICROSCOPIA**

El microscopio estereoscópico es frecuentemente utilizado en microbiología, especialmente para el examen de las características macroscópicas de colonias bacterianas o para el examen de hongos.

Ofrece una imagen tridimensional, sin embargo, el aumento es solamente entre 5 y 100 veces.

Se usa de la siguiente manera:

- 1.- Encienda la fuente de luz.
- 2.- Ajuste los oculares al ancho de sus ojos.
- 3.- Ponga el espécimen en la platina (generalmente un cultivo en una caja de Petri).
- 4.- Enfoque con el tornillo, utilizando un solo ojo (de preferencia el izquierdo).
- 5.- Usando el otro ojo solamente (en este caso el derecho) observe, si requiere de ajuste, use para enfocar el anillo de ajuste ubicado en el ocular.
- 6.- Examine su espécimen.

## **CUIDADO DEL MICROSCOPIO**

1.- Para transportar el microscopio fuera de su estuche, debe tomarse con una mano del brazo del microscopio, y con la otra por la base o pie.

2.- Asegurarse de que las piezas ópticas estén limpias. Es necesario evitar que los objetivos estén en contacto con líquidos, grasas, colorantes, bálsamo de Canadá, etc., que dañan las lentes; si esto llega a suceder, deben limpiarse inmediatamente con papel seda y con un poco de xilol o éter. Debe evitarse el uso de alcohol porque disuelve el cemento utilizado en el montaje de las lentes.

3.- Cuando se hagan observaciones con los objetivos secos, utilizar el espejo cóncavo y bajar el condensador.

4.- Cuando se hagan observaciones con los objetivos de inmersión, asegurarse de que el objetivo sea el correcto. Si se emplea otro, recuerde que el aceite puede desprender la lente. En las observaciones por inmersión utilizar el espejo plano y subir el condensador hasta tocar la parte inferior del portaobjetos.

5.- Proceder siempre a bajar al máximo permisible el objetivo de inmersión, asegurándose de que el tornillo micrométrico está más o menos a la mitad de su recorrido, puesto que de otro modo, si está cerca del tope, no permitirá hacer un enfoque adecuado.

6.- Si hay filtros, retirarlos para obtener una iluminación clara. Quitar el ocular para ver que el campo esté iluminado uniformemente.

7.- Una vez enfocado el objetivo, ajustar el diafragma para lograr la máxima nitidez.

8.- Al observar con microscopio monocular, mantenga ambos ojos abiertos. Cerrar un ojo por periodos largos resulta muy cansado.

9.- Al terminar de hacer las observaciones, limpiar escrupulosamente el ocular con papel seda especial para lentes, al igual que el objetivo.

10.- Guardar el microscopio en su caja, pero antes, revisar que las piezas estén en su lugar y hacer girar el revólver, de manera que el objetivo de menor aumento quede en posición de observación y bajarlo hasta el tope.

#### **NOTA:**

Los conocimientos adquiridos en esta práctica serán aplicados en la observación de los frotis preparados en la siguiente.

## **PRACTICA 6**

### **TECNICAS DE TINCION. OBSERVACION MICROSCOPICA DE BACTERIAS, LEVADURAS, HONGOS Y PROTOZOARIOS**

#### **INTRODUCCION**

Tres características básicas de los microorganismos hacen necesario el empleo de técnicas especiales en la investigación microbiológica, a saber:

- a) Su tamaño diminuto
- b) La aparente ausencia de diferencias individuales
- c) Su amplia distribución en la naturaleza

Por sus dimensiones sumamente reducidas es necesario emplear para su estudio microscopios de alto poder de amplificación. Se comprende fácilmente que dadas las características que acabamos de enumerar, la dificultad prácticamente insuperable de manipular un solo microorganismo, hace necesario estimular su desarrollo en grandes números, y es en éstos cultivos, compuestos de millones de células, donde se procede a su estudio, en lugar de hacerlo sobre un solo germen.

Para diferenciar un microorganismo de otro, el microbiólogo observa su aspecto, en primer lugar; ahora bien, una célula de levadura es casi idéntica a otra, y cabe deducir de lo expuesto, que la pequeña variedad en la morfología de las bacterias, no es sin duda, dato suficiente para identificar los miles de especies que sabemos existen. Salta pues a la vista la necesidad de cultivar los gérmenes problema, y proceder al estudio de sus funciones, es decir, de sus características fisiológicas y de su estructura. En realidad, el microbiólogo recurre a múltiples fuentes de información en su esfuerzo por identificar los microorganismos desconocidos.

Como los microorganismos se encuentran en cualquier tipo de medio ambiente y son inaccesibles a la inspección directa, fácil es comprender la dificultad que entraña diferenciar unos tipos de otros; además, existe siempre el peligro de que al estudiar microorganismos nocivos puedan diseminarse y contaminar el medio. Con el fin de hacer frente a éstos problemas, el microbiólogo usa siempre técnicas asépticas (ausencia de microorganismos), éstos métodos son adecuados para prevenir la contaminación del medio por los microorganismos.

El procedimiento mas corriente para estudiar la morfología bacteriana, consiste en el examen de un frotis, que previa fijación, se tiñe con algún colorante y que se examina después microscópicamente con el objetivo de inmersión.

Debe "extenderse" el material con objeto de formar una película delgada, y obtener así una sola capa de bacterias, perfectamente separadas sobre el portaobjetos. Con ésta preparación previa, pueden observarse perfectamente células aisladas, ya que de otra forma, los microorganismos se aglomeran en masas sólidas impenetrables a la luz.

Es necesaria la tinción, ya que la diminuta célula bacteriana en su estado natural permitirá el paso de cantidad excesiva de luz, y apenas se distinguiría en un campo brillantemente iluminado y si se redujera la luz, se apreciaría como una espícula grisácea sobre fondo gris.

Las células "toman" la tinción total o parcialmente, de acuerdo con una reacción química, entre alguna sustancia celular y el colorante o bien, su superficie queda teñida por un mecanismo de atracción.

En otras palabras, las propiedades tintoriales de una célula dependen de su composición química y las diferencias en sus reacciones de coloración, constituyen índices importantes para distinguir unas bacterias de otras.

Para preparar y fijar un frotis se coloca una pequeña cantidad de la muestra problema sobre un portaobjetos limpio y se extiende cuidadosamente sobre el mismo, hasta formar una película delgada.

Se lleva a cabo la transferencia mediante un asa que se calienta previamente al rojo en la llama de un mechero Bunsen, dejándola enfriar antes de tomar con la misma una pequeña porción de la muestra a examinar. Si es muy espesa la consistencia del material a examinar debe mezclarse sobre el portaobjetos, usando para ello una gota de agua destilada. Las extensiones delgadas se fijan (aseguran) por desecación en el aire, y las gruesas, haciéndolas pasar rápidamente el portaobjetos, unas cuantas veces por la llama de mechero Bunsen.

La coloración simple de un frotis o técnica de tinción simple nos revela la forma, tamaño y arreglo de las células teñidas por la aplicación directa de un sólo colorante. Sin embargo, es posible obtener mayor información acerca de la morfología y composición química de las bacterias a través del uso de técnicas de tinción diferenciales.

Estas técnicas llevan consigo el tratamiento del frotis con una serie de reactivos. La apariencia de las células después de éste tratamiento nos permite distinguir entre dos diferentes tipos de bacterias con base en el colorante que retienen.

Existen dos métodos fundamentales de tinción por este medio, uno el de GRAM, que separa las bacterias en dos grupos y, otro, el ZIEHL-NEELSEN o de ácido-resistencia, que se emplea para identificar algunos grupos de bacterias superiores.

En ambos casos, el colorante inicial, tinte las bacterias por igual. Sin embargo, en algunos casos la combinación con el colorante es más permanente que en otros.

Para establecer netamente la diferenciación en dos grupos, se aplica una sustancia que disuelve el colorante, la cual no ejercerá efecto alguno sobre el grupo de microorganismos que lo retienen firmemente, pero lo eliminará de los otros. Sabemos también que la estructura de la pared celular es diferente en los tipos Gram-positivos y Gram-negativos.

Así pues, mediante el empleo de los métodos de tinción es fácil identificar los tipos morfológicos mas corrientes y hacer accesibles a la vista gránulos y vacuolas, endosporas, esporas, etc.

El examen minucioso de un frotis teñido nos provee de información invaluable para la caracterización morfológica e identificación del espécimen.

Los reactivos para las tinciones están hechos de colorantes, que pueden ser naturales o sintéticos. Generalmente los colorantes usados en microbiología son sintéticos y del grupo de las anilinas.

Hay tres grupos de colorantes: ácidos, básicos y neutros. Los colorantes del tipo de las sales son mas usados. Cuando la parte colorida de la molécula del colorante se encuentra en el ión cargado positivamente, es un colorante básico.

En los colorantes ácidos el color se encuentra en el ión cargado negativamente.

## **OBJETIVOS**

-Conocer y aplicar algunas técnicas utilizadas en la tinción de microorganismos, observar las diferencias según la técnica utilizada.

-Conocer las características morfológicas de bacterias, levaduras, hongos y protozoarios.

## **MATERIAL**

- |                    |                                     |
|--------------------|-------------------------------------|
| - Portaobjetos     | - Colorantes para tinciones simples |
| - Mechero          | - Colorantes para Gram              |
| - Asa para siembra | - Cultivos de bacterias, hongos,    |
| - Microscopio      | - Pulque y lodos activados.         |
| - Papel seda       |                                     |

## **PROCEDIMIENTO**

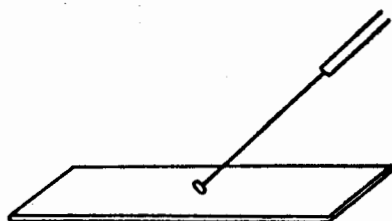
### **A) PREPARACION DE FROTIS:**

- 1.-Con el asa previamente esterilizada y enfriada de manera conveniente, tomar una pequeña gota de cultivo en caldo y colocarla sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.
- 2.-Extender con el asa la emulsión sobre el portaobjetos a fin de tener una película muy delgada.
- 3.-Dejar secar la película al aire o dentro de una estufa.
- 4.-Una vez seco el frotis, fijarlo haciéndolo pasar lentamente tres veces sobre la flama.
- 5.-Dejar enfriar el portaobjetos antes de teñir.

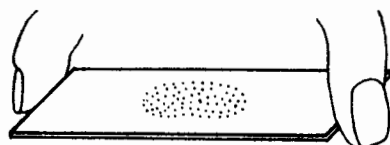
Para una mayor comprensión la fig. 6.1 describe gráficamente este procedimiento.



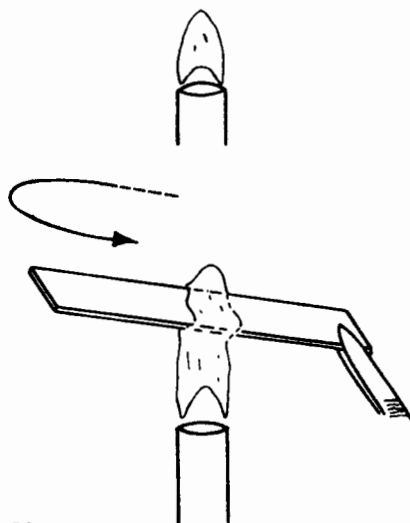
1.- Esterilice el asa y deje que se enfríe



2.- Tome con el asa el cultivo y descárguelo sobre el portaobjetos en la parte media (evite las orillas)

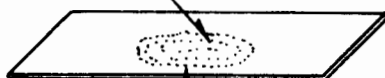


3.- Deje secar el frotis al aire o páselo ligeramente por la flama



4.- Fije el frotis en el portaobjetos, pasándolo lentamente unas 3 veces sobre la flama. Deje enfriar el portaobjetos antes de teñir

Zona donde se -  
depositó el cultivo



Marcar por la parte inferior

5.- Marcar con un lápiz graso y por la parte inferior el área donde se extendió el cultivo

Fig 6.1 PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACION DE UN FROTIS

## **B) TECNICAS DE TINCION Y OBSERVACION MICROSCOPICA DE BACTERIAS Y LEVADURAS**

### **B.1) TINCION SIMPLE**

Para poner en práctica este método basta aplicar una o dos gotas de solución de azul de metileno u otro colorante sobre el frotis recién preparado. Al cabo de un tiempo se lava el frotis cuidadosamente con un chorro de agua suave o se agita en el interior de un recipiente que contenga agua limpia. Después, se seca la superficie inferior del portaobjetos con un paño o al aire, y la parte superior con papel filtro, absorbente.

Se coloca luego una gota de aceite sobre el frotis seco y teñido y se examina con el objetivo de inmersión.

Otros colorantes usados en la tinción simple son: fucsina fenicada, safranina o violeta de genciana diluidas.

### **TINCION DEL FROTIS**

1.-Teñir el frotis con alguno de los colorantes que se proporcionen, dejándolos actuar; si se trata de cristal violeta o fucsina fenicada, 30 segundos; si es azul de metileno, 5 minutos.

2.-Lavar con agua de la llave.

3.- Escurrir.

4.-Dejar secar perfectamente al aire.

5.- Una vez perfectamente seco, colocar una pequeña gota de aceite de inmersión y observar.

### **B.2) TINCION DE GRAM**

1.-Cubrir el frotis con solución colorante de cristal violeta. Dejar actuar durante un minuto.

2.-Al minuto, lavar la preparación con agua de la llave o con una solución de yodo.

3.-Cubra posteriormente la preparación con la solución de lugol durante un minuto.

4.-Lave la preparación con agua de la llave.

5.- Decolorar con alcohol-acetona (o con alcohol al 70%) durante 10 segundos o gota a gota hasta que la última salga clara, sin colorante.

6.-Lavar el frotis inmediatamente con agua de la llave.

7.-Cubra la preparación con la solución de safranina (colorante de contraste) durante 30 segundos.

8.-Lave con agua de la llave, incline el portaobjetos contra la pared y déjelo escurrir hasta que seque.

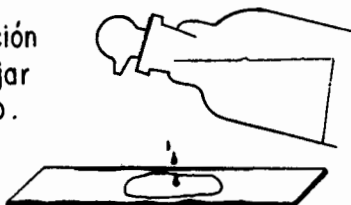
9.- Observar.

La figura 6.2 describe gráficamente este procedimiento, y la tabla 6.1 y 6.2 la reacción, apariencia y algunas características de las bacterias en los pasos de la técnica de tinción de Gram.

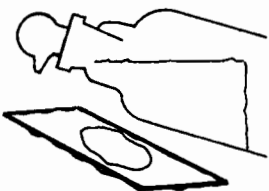
#### **NOTA:**

Los microorganismos positivos al Gram toman el primer colorante y aparecen teñidos de color violeta o azul oscuro. Los que aparecen en rojo toman la safranina y son negativos al Gram. Existen microorganismos variables al Gram, conviene, por tanto, hacer los frotis de cultivos jóvenes. Si aparecieran dentro de la célula una parte sin teñir, puede tratarse de endosporas que no toman fácilmente los colores.

1.\_ Cubrir el frotis con solución colorante cristal-violeta, dejar actuar durante un minuto.



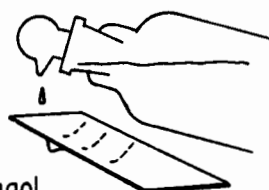
2.\_ Enjuagar el frotis con solución de yodo o agua corriente



3.\_ Cubrir el frotis con lugol (solución yodó-yodurada) dejar actuar 1 minuto



4.\_ Sacudir el exceso de lugol y decolorar con alcohol-acetona



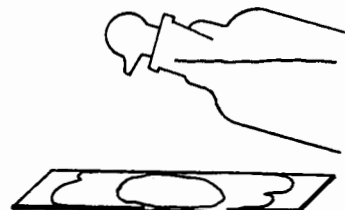
A

5.\_ Enjuagar el frotis inmediatamente con agua de la llave.

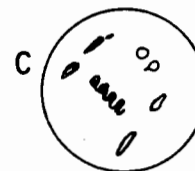


B

6.\_ Cubrir el frotis con un colorante de contraste (safranina) durante 30 segundos



7.\_ Enjuagar con agua de la llave, Sacudir exceso del agua y dejar secar al aire.



C

A) Antes de la decoloración con alcohol-acetona, todos los micro-organismos parecen ser Gram (+) (morado)

B) La decoloración con alcohol-acetona hace que los micro-organismos Gram (-), no sean visibles (incolores)

C) Los organismos Gram (-), se harán visibles mediante la aplicación de un colorante de contraste (rojos)

Fig 6.2 TINCION DE GRAM

**TABLA 6.1**  
**COLORACIONES DE GRAM**

| Soluciones aplicadas por su orden | Reacción y apariencia de las bacterias                                                                                                                            |                                                                                                 |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | Grampositivas                                                                                                                                                     | Gramnegativas                                                                                   |
| Cristal violeta                   | Las bacterias se tiñen en violeta.                                                                                                                                | Las bacterias se tiñen en violeta                                                               |
| Solución yodo-yodurada (Lugol)    | Complejo CV-L se forma dentro de las bacterias; las bacterias permanecen violeta.                                                                                 | Complejo CV-L se forma dentro de las bacterias, las bacterias permanecen violeta                |
| Alcohol                           | Las paredes celulares se deshidratan, hay retracción de los poros, la permeabilidad disminuye, el complejo CV-L no puede salir de la bacteria, permanece violeta. | Extracción de lípidos de las paredes celulares, aumento de porosidad, CV-L sale de la bacteria. |
| Safranina                         | Las bacterias no afectadas permanecen violeta.                                                                                                                    | Las bacterias toman este colorante y se tiñen de rojo.                                          |

**TABLA 6.2**  
**ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS**  
**GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

| Características                                                 | Diferencias Grampositivas                | Relativas Gramnegativas    |
|-----------------------------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------|
| Composición de la pared celular.                                | Baja en lípidos ( 1-4 %)                 | Alta en lípidos ( 11-22 %) |
| Susceptibilidad a la Penicilina                                 | Más susceptible                          | Menos susceptible          |
| Inhibición por colorantes básicos; por ejemplo cristal violeta. | Inhibición notable                       | Menor inhibición           |
| Necesidades nutritivas.                                         | Muchas especies relativamente complejas. | Relativamente simples.     |
| Resistencia a la desinteracción por métodos físicos.            | Más resistentes                          | Menos resistentes          |

### **C) OBSERVACION DE PULQUE.**

- 1.- Con el asa previamente esterilizada y enfriada tomar varias porciones del pulque haciendo un frotis como se indicó en la sección anterior.
- 2.- Teñir usando la Técnica de Gram.
- 3.- Observar la preparación con el objetivo de inmersión, tratando de identificar la morfología de los organismos presentes.

### **D).- OBSERVACION DE PROTOZOARIOS.**

- 1.- Con el asa previamente esterilizada y enfriada tomar varias porciones del sedimento de lodos activados y colocarlos sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.
- 2.- Observar la preparación con los objetivos seco débil y seco fuerte identificando los tipos de organismos presentes.

### **E).- OBSERVACION DE HONGOS.**

- 1.- Con el asa previamente esterilizada y enfriada tomar de un cultivo de hongos que se le proporcione, una pequeña cantidad de micelio.
- 2.- Colocarlo en un portaobjetos limpio y desengrasado al cual previamente se le ha puesto una gota de solución de potasa al 30%.
- 3.- Observar la preparación con los objetivos seco débil y seco fuerte, tratando de identificar el tipo de estructuras presentes.

## RESULTADOS

Describir las características morfológicas de los frotis observados durante la práctica.

|                                                                                     | Levadura | Lodos | Hongos | Cepa |   |   |   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|-------|--------|------|---|---|---|
|                                                                                     |          |       |        | 1    | 2 | 3 | 4 |
| Frotis (dibuje)                                                                     |          |       |        |      |   |   |   |
| Técnica de tinción                                                                  |          |       |        |      |   |   |   |
| Aumento                                                                             |          |       |        |      |   |   |   |
| Descripción de la morfología de los microorganismos (características macroscópicas) |          |       |        |      |   |   |   |
| Características microscópicas                                                       |          |       |        |      |   |   |   |

## **PRACTICA 7**

### **ACTIVIDAD BIOQUIMICA DE LAS BACTERIAS**

#### **ENZIMAS**

##### **INTRODUCCION**

Para que una célula viva se desarrolle y reproduzca, debe ser capaz de efectuar gran número de cambios químicos, poder modificar los nutrientes del medio en que vive antes de que entren a la célula, y hacer cambios adicionales una vez que éstos penetren a la misma.

Algunos de los materiales son luego asimilados y pasan a formar parte de la célula, mientras que otros son descompuestos para obtener la energía que se requiere para la síntesis.

Estos cambios tan complicados son efectuados por las enzimas, sustancias de origen protéico que se encuentran en las células en cantidades pequeñísimas y que pueden efectuar todos los cambios que se asocian al proceso de la vida. Se les considera la parte activa de la célula.

Existen algunas sustancias, tanto orgánicas como inorgánicas, que en pequeñas cantidades, tienen la capacidad de acelerar las reacciones químicas sin que se alteren ellas mismas después de la reacción; simplemente aceleran la velocidad de éstas sin que necesariamente la inicien hasta alcanzar el equilibrio.

Las sustancias que se comportan así se llaman catalizadores o agentes catalíticos. Las enzimas pertenecen a esta categoría de sustancias ya que funcionan como catalizadores del tipo orgánico y son producidas por los organismos vivos.

De ésta manera se puede definir a la enzima como el agente catalítico orgánico producido por las células vivas. Todas las enzimas se producen dentro de la célula, pero existen básicamente dos tipos:

- Las exoenzimas o enzimas extracelulares: enzimas que son excretadas por la célula a través de la pared celular, cuya función es realizar todos los cambios necesarios en los nutrientes del medio para permitir que entren a la célula como alimento; y
- Las endoenzimas o enzimas intracelulares: que sintetizan el material celular y efectúan reacciones catabólicas de las cuáles se desprende la energía que aprovecha la célula.

Las enzimas son proteínas simples o conjugadas constituidas de una parte denominada apoenzima y de uno o más cofactores.

El cofactor puede ser un ión metálico (llamado activador) u otra molécula orgánica (llamada coenzima).

Cuando las enzimas catalizan las reacciones, el sustrato se une a la superficie de la enzima en un lugar llamado sitio activo. Esto activa al sustrato causando la formación de productos que después son liberados de la superficie de la enzima.

Las enzimas catalizan solamente reacciones muy específicas debido a que sólo el sustrato preciso se ajusta en el sitio activo de la enzima; como una llave embona en su cerradura específica.

La actividad de una enzima puede ser afectada por todos aquellos factores que pueden alterar la estructura de una proteína. Cada enzima tiene un pH óptimo en el cual su actividad es máxima.

El conocimiento de las actividades bioquímicas o de las actividades bioquímicas potenciales de un cultivo microbiano, tiene muchas aplicaciones en biología, la presencia de enzimas es una de las pruebas bioquímicas que se emplea para la clasificación y diferenciación de los microorganismos, más allá de caracterizar a las especies.

El papel de los microorganismos en el ambiente humano se atribuye a la habilidad de éstos para degradar varios sustratos y de sintetizar nuevos productos.

Algunos microorganismos producen enzimas capaces de romper grandes y complejas moléculas de polisacáridos, proteínas o lípidos. Estas enzimas son extracelulares y su función es la de romper sus respectivos sustratos por medios hidrolíticos.

Las carbohidrasas hidrolizan los polisacáridos a azúcares; las proteasas hidrolizan las proteínas a péptidos y aminoácidos; y las lipasas hidrolizan las grasas a glicerina y ácidos grasos. Cuando los organismos crecen en medios los cuales contienen uno de éstos sustratos, puede ponerse de manifiesto su degradación debida a la presencia de enzimas.

## **OBJETIVO:**

Observar la acción de diversas enzimas microbianas sobre diferentes sustratos.

## MATERIAL

- Portaobjetos
- Lugol
- Solución de Cloruro mercúrico
- Agua oxigenada al 3%
- 2 cajas de Petri con agar-almidón
- 2 cajas de Petri con agar-leche descremada
- 2 tubos de gelatina nutritiva
- 2 cajas de Petri con agar-gelatina
- 2 tubos de ensaye con caldo lactosado o caldo lauril triptosa
- 2 tubos de hemólisis.

## CEPAS EMPLEADAS

*Escherichia coli*  
*Bacillus subtilis*  
*Serratia marcescens*  
*Sarcina lutea*

## PROCEDIMIENTO

### 1.-ENZIMAS SACAROLITICAS O CARBOHIDRASAS.

#### 1.1.- HIDRÓLISIS DE UN DISACÁRIDO

a) Sembrar los tubos de ensaye que contienen caldo con las cepas proporcionadas . Dejar uno como testigo. Incubar los tres tubos a 35° C y observar a las 24 y 48 horas.

b) Si el disacárido es fermentado, se puede observar un cambio en la coloración del indicador presente en el medio. Si esa fermentación va aunada a producción de gas, el gas se concentra en la parte superior del tubo invertido. La aparición de cualquier cantidad de gas constituye una prueba positiva.

#### 1.2.- HIDRÓLISIS DE UN POLISACARIDO

El almidón es un hidrato de carbono que se clasifica entre los polisacáridos. Una prueba cualitativa para el almidón es la aparición de color azul por la adición de una solución de yodo.

Quando se hidroliza el almidón, los productos son dextrinas, maltosa y glucosa, productos de menor complejidad, que no dan esta reacción azul. Ciertas dextrinas, como la eritrodextrina, se tiñen con el yodo de color rojizo o pardo, mientras que otras, como la acrodextrina, la maltosa y la glucosa, no dan ninguna coloración.

Este principio se usa para probar la hidrólisis del almidón en esta práctica.

a) Siembre en sus cajas de agar almidón las cepas que se le proporcionen, inoculando por picadura central y estrias cortas en los extremos de la caja en zonas limitadas, para que el resto quede como zona de contraste.

b) Incube durante 48 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

c) Pruebe la actividad diastásica de los microorganismos cubriendo las placas de agar-almidón con una solución de lugol; alrededor del lugar de crecimiento una zona clara indicará la hidrólisis del almidón.

La figura 7.1 representa esquemáticamente los dos procedimientos anteriores.

## 2.- ENZIMAS PROTEOLÍTICAS O PROTEASAS.

### 2.1.- HIDRÓLISIS DE CASEINA

a) Observación en placa.

1)- Inocule sus cajas de agar-leche descremada con las cepas que se le proporcionen. Siembre por picadura central y estrias cortas, como en el caso del almidón.

2) Incube 48 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

Las colonias de bacterias proteolíticas aparecerán rodeadas de una zona clara, mientras que las áreas en las que la caseína no ha sido atacada, permanece el aspecto opaco del medio.

### 2.2.- HIDRÓLISIS DE LA GELATINA.

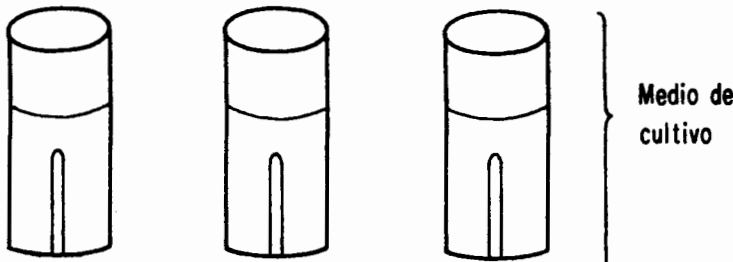
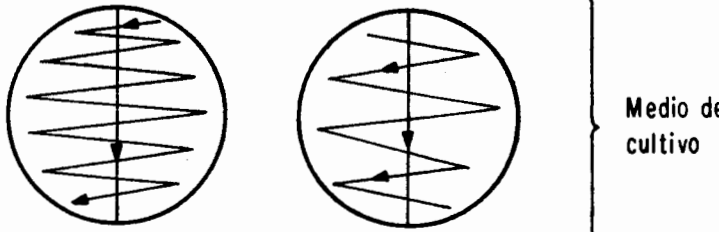
a) Técnica de hidrólisis en tubos.

1) Inocule por picadura tres tubos que contengan gelatina nutritiva con las cepas que se les suministran.

2) Incube a  $35^{\circ}\text{C}$  incluyendo un tubo no inoculado, como patrón de comparación. Espere de 2 a 7 días hasta obtener reacción positiva.

3) Para observar sus resultados sumerja sus tubos en agua helada. El tubo sin inocular y los tubos con reacción negativa solidificarán, en tanto que la gelatina hidrolizada permanecerá líquida.

Fig 7.1 Procedimientos de siembra de medios de cultivo para detección de enzimas sacarolíticas

| 1.1 Hidrólisis de un disacárido                                                                                                                                                                                             |  | Medio de cultivo + enzimas (en el M.O.) → Resultados                                                                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <div><div><div></div><div><div>Siembra de un microorganismo (M. O.) {</div><div>Gram(+)      Gram(-)      Testigo</div></div></div></div> |  | <div>caldo lactosado + M.O. → producción de gas (↑) por hidrólisis de la lactosa</div> <div>incubar a 35°C (24 a 48 hrs)</div> |
| 1.2 Hidrólisis de un polisacárido                                                                                                                                                                                           |  |                                                                                                                                |
| <div><div><div></div><div><div>Siembra de un M. O. {</div><div>Gram(+)      Gram(-)</div></div></div></div>                             |  | <div>agar almidón + M.O. → + Lugol → coloración azul (presencia de almidón)</div> <div>incubar a (35° C) (48 hr)</div>         |

## **PRECAUCION:**

No agite los tubos mientras estén líquidos, pues puede provocar errores al mezclarse la gelatina hidrolizada con la intacta, y solidificar.

### **b) Técnica de las placas de gelatina- agar.**

1) Siembre dos placas de agar-gelatina con las cepas que se le proporcionen por la técnica antes descrita.

2) Incube a 35°C durante 48 horas.

3) Vierta sobre el cultivo 10 ml. de solución de cloruro mercúrico. El reactivo forma un precipitado blanco con la gelatina, en tanto que la gelatina hidrolizada no precipita, y se verá como una zona clara.

La figura 7.2 esquematiza los dos procedimientos anteriores.

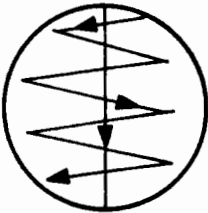
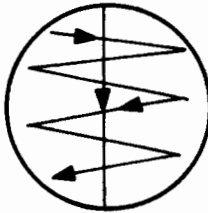
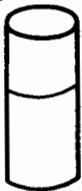
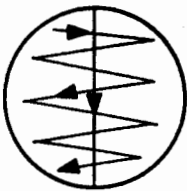
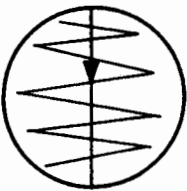
## **3.-CATALASA**

La catalasa es una enzima que cataliza la descomposición de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. En general los microorganismos aerobios la poseen y los anaerobios no.

1) Tome un poco de cultivo de cada uno de los siguientes cultivos: *E. coli*, *B. subtilis*, y aplique cada uno de ellos a sendos portaobjetos limpios y desengrasados.

2) Añada unas cuantas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% a cada portaobjetos y luego observe al microscopio, con el objetivo seco débil, para ver si hay desprendimiento de burbujas o no.

Fig 7.2 Procedimientos de siembra de medios de cultivo para detección de enzimas proteolíticas

| 2.1 Hidrólisis de caseína  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | Medio de cultivo + enzimas (en el M.O.) → Resultados                                                                          |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Siembra de un M.O. {       | <br>Gram (+) <br>Gram (-)         } Medio de cultivo                                                                                                  | agar leche descremada + M.O. $\xrightarrow{\text{incubar 48h } 35^{\circ}\text{C}}$ zona clara                                |
| 2.2 Hidrólisis de gelatina |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                               |
| a) Hidrólisis en tubo      | <br>Gram (+) <br>Gram (-) <br>Testigo         } Medio de cultivo | gelatina nutritiva (sólida) + M.O. $\xrightarrow{\text{incubar 2-7 días}}$ llicuación (hidrólisis de gelatina)                |
| b) Hidrólisis en caja      | <br>Gram (+) <br>Gram (-)         } Medio de cultivo                                                                                              | agar gelatina + M.O. $\xrightarrow{\text{incubar 48h } 35^{\circ}\text{C}}$ + Hg Cl <sub>2</sub> → ↓ blanco (sí hay gelatina) |
| Siembra de un M.O. {       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                               |

## RESULTADOS:

Registre los resultados de sus observaciones en la siguiente tabla.

| CEPA | MEDIO DE CULTIVO | SUSTRATO | ENZIMA PRESENTE |    | CATALASA | OBSERVACIONES |
|------|------------------|----------|-----------------|----|----------|---------------|
|      |                  |          | SI              | NO |          |               |
| 1    |                  |          |                 |    |          |               |
| 2    |                  |          |                 |    |          |               |
| 3    |                  |          |                 |    |          |               |
| 4    |                  |          |                 |    |          |               |

### **PARTE 3**

## **TECNICAS APLICADAS A LA INGENIERIA AMBIENTAL**

## **PRACTICA 8**

### **ANALISIS DE AIRE**

#### **INTRODUCCION**

La microbiología de la atmósfera, comprende el estudio de los organismos vivos en el aire, tales como el polen, esporas de hongos, levaduras, algas, bacterias, etc.

La Aerobiología estudia el comportamiento de estos organismos en la atmósfera. Las partículas biológicas se pueden encontrar suspendidas, como organismos aislados, o bien organismos principalmente adheridos a material particulado.

La flora microbiana del aire es transitoria y variable. El aire no es un medio en el que los microorganismos puedan desarrollarse, pero es portador de materia particulada, polvo y gotas, que pueden estar cargados de microbios.

El número y tipo de microbios en el aire están determinados por las fuentes de contaminación del ambiente, como los organismos que son expelidos del aparato respiratorio al toser o estornudar, y las partículas de polvo que circulan al ser levantadas de la tierra por el viento.

Los microorganismos transmitidos por el aire son transportados en las partículas de polvo, en las gotas grandes que quedan suspendidas brevemente y en el núcleo de las gotas, que se forma cuando las pequeñas gotas se evaporan. Así son llevados unos cuantos metros o muchos kilómetros; algunos mueren en unos cuantos segundos, otros sobreviven durante semanas, meses o más tiempo. Su destino final depende de un sistema de complejas circunstancias que incluye las condiciones atmosféricas como humedad, luz solar, temperatura, trayectoria y velocidad del viento; el tamaño de las partículas que los transportan, y su propia naturaleza, es decir, el grado de susceptibilidad o resistencia de cada especie en particular al nuevo ambiente, o su capacidad para formar esporas resistentes y quistes.

El muestreo del aire para determinar su contenido microbiano necesita de aparatos especiales. Los denominados dispositivos de trampa sólida o dispositivos de trampa líquida han sido diseñados para este propósito.

En los filtros de trampa sólida, los microorganismos son colectados, o "atrapados", directamente sobre la superficie sólida por un medio de agar o disco filtrante. La subsecuente incubación de la muestra da como resultado el desarrollo de colonias donde quedaron atrapados los microorganismos.

En los aparatos de muestreo con líquidos, la muestra de aire se hace pasar en forma de pequeñas burbujas a través de caldo de cultivo u otro líquido donde los microorganismos quedan atrapados.

Después se siembran muestras del líquido en placas que se cultivan para determinar su contenido microbiano.

Entre las técnicas que se emplean en el análisis microbiológico del aire tenemos:

- técnica de sedimentación en placa
- técnica del cedazo y ranura
- filtros de membrana

En esta práctica, será utilizada la técnica de sedimentación en placa.

## **OBJETIVO**

Determinar cuáles son los microorganismos que más comunmente se encuentran en el aire y en qué tipos de ambientes hay un mayor número de ellos.

## **MATERIAL:**

- Asa de siembra
- 2 Cajas de Petri
- Colorantes para tinción de Gram
- Microscopio
- Portaobjetos

## **MEDIOS DE CULTIVO**

- Agar Nutritivo
- Agar Sabouraud

## **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Verter en una caja de Petri esterilizada medio de agar nutritivo fundido, y en otra el medio de agar Sabouraud. Dejar solidificar.
- 2.- Muestrear abriendo la caja en el laboratorio o en algún otro ambiente y dejarla así durante 30 minutos.
- 3.- Incubar la caja durante 48 horas a 35° C.

## RESULTADOS:

1.- Observar las características macroscópicas y predominantes de las colonias desarrolladas.

2.- Hacer frotis de las colonias predominantes o que presenten alguna característica especial.

3.-Según sea el tipo de microorganismo presente, hacer tinción de Gram y observar con el objetivo de inmersión sus características microscópicas si se tratan de bacterias; observar las preparaciones con KOH al 30% con el objetivo seco fuerte si es el caso de hongos.

4.- Consignar sus observaciones en la siguiente tabla:

| MEDIO DE CULTIVO | NUMERO DE COLONIAS | TIPO PREDOMINANTE CARACTERISTICAS |               |
|------------------|--------------------|-----------------------------------|---------------|
|                  |                    | MACROSCOPICA                      | MICROSCOPICAS |
|                  |                    |                                   |               |

## **PRACTICA 9**

### **ANALISIS BACTERIOLOGICO DE AGUA**

#### **MUESTREO**

#### **INTRODUCCION**

La determinación de la calidad de un agua es de vital importancia para el bienestar de la comunidad, ya que un agua contaminada puede provocar epidemias en una población.

El primer paso en el análisis o examen de un abastecimiento de agua es la recolección y manejo cuidadoso de las muestras.

Aspectos importantes a considerar para un adecuado muestreo son:

- una selección adecuada del sitio de muestreo
- frecuencia
- número
- tamaño de muestra
- frascos adecuados
- técnica de muestreo
- descripción adecuada de la muestra y,
- transporte en condiciones adecuadas.

#### **a) Selección del sitio de muestreo.**

Una adecuada localización del sitio de muestreo asegura la toma de muestras representativas.

- a.1.- Toma de muestras de sistemas de distribución.  
Deben escogerse puntos representativos que cubran el sistema completo.
- a.2.- Toma de muestras de cuerpos receptores.  
Se toman generalmente cerca de la superficie.
- a.3.- Toma de muestras para estudios intensivos de cuerpos receptores.

El muestreo representativo debe ser considerando las características particulares del estudio, entre algunos factores importantes a considerar son:

el sitio, profundidad del muestreo, método y hora de muestreo, número de muestras posibles de procesar y tipo de contaminación (contaminación en un punto o promedio), etc.

**b) Número, frecuencia y tamaño de muestra.**

El número mínimo de muestras depende del número de usuarios.

La fig. 9.1 es una gráfica que indica el número mínimo de muestras que deben ser analizadas por mes, de acuerdo con el número de usuarios del sistema.

En el caso de que se excedan los estándares establecidos para coliformes, deben tomarse muestras diarias en el mismo sitio y los análisis deben continuarse hasta que en dos muestras consecutivas se presente un nivel aceptable de coliformes. Tales muestras deben considerarse como adicionales y no deben ser incluidas en el número total de muestras mensuales analizadas.

**c) Botellas de muestreo**

Las botellas utilizadas para la toma de muestras deben tener como mínimo 100 ml. de capacidad mas un pequeño espacio para aire. La botella y la tapa deben de ser de un material bacteriológicamente inerte (vidrio o plástico generalmente).

Los frascos deben lavarse adecuadamente, enjuagarse con agua limpia y esterilizarse. Los frascos que se destinen para la recolección de muestras de aguas con cloro residual deben llevar un agente decolorador, a no ser que contengan caldo para la siembra directa. El tiosulfato de sodio es un agente satisfactorio de decoloración; su presencia en una muestra de agua clorada, en el instante de la recolección, neutraliza cualquier cloro residual y evita, con esto, que el tiempo que la muestra se encuentra en tránsito al laboratorio se vea afectada obteniendo resultados erróneos (falsos negativos).

Utilizando el tiosulfato, en tales condiciones es probable que el examen bacteriológico indique el verdadero contenido bacteriano de la muestra en el momento del muestreo.

El tiosulfato de sodio se debe agregar al frasco de muestra, limpio y seco, antes de la esterilización, en una cantidad que proporcione una concentración aproximada de 100 mg/l. (0.1 ml. de una solución al 10% de tiosulfato de sodio en un frasco de 100 ml.

**d) Volumen de muestra.**

Para muestras de agua potable para la técnica de filtro de membrana se requiere un volumen de 100 ml. Sin embargo, en aguas superficiales, naturales, no potables y residuales las cuentas bacterianas pueden ser muy altas por lo que se requieren volúmenes menores de muestra para el análisis.

La tabla 9.1 es una guía de los volúmenes de muestra a utilizar.

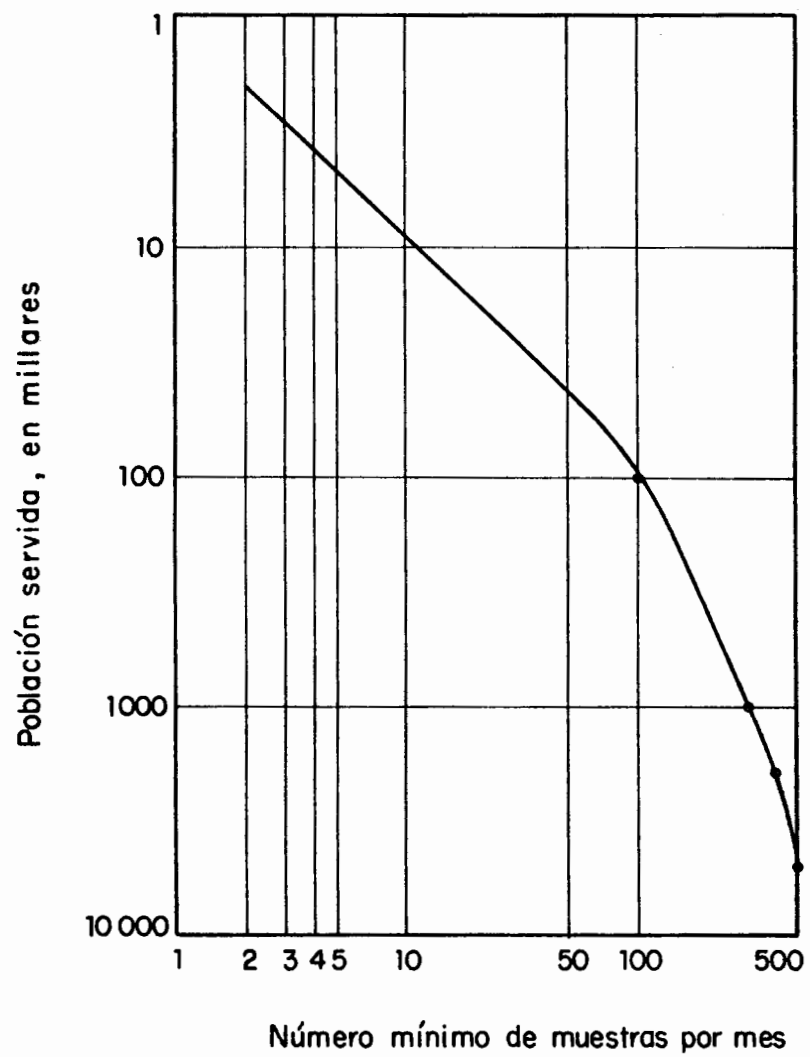


Fig 9.1 NUMERO MINIMO DE MUESTRAS,  
BASADO EN LA POBLACION SERVIDA

**TABLA 9.1**  
**VOLUMENES DE AGUA SUGERIDOS**

| TIPO DE AGUA                                    | TIPO DE ORGANISMO                          |                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                 | COLIFORMES<br>TOTALES                      | COLIFORMES<br>FECALES                    | ESTREPTOCOCOS<br>FECALES                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Agua potable                                    | 100 mL                                     | -----                                    | Insuficientes<br>datos disponi-<br>bles para pro-<br>ducir índices<br>confiables.<br>El analista<br>debe seguir la<br>guía de coli-<br>formes fecales<br>ó si se tienen<br>registros an-<br>teriores dis-<br>ponibles.<br>Use estos nive-<br>les como una -<br>guía para la -<br>selección del<br>volumen. |
| Manantiales                                     | 15,60,100 mL                               | 30,100 mL                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Lagos ó depó-<br>sitos natura-<br>les.          | 4,15,60,100 mL                             | 10,30,100 mL                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Tomas de a --<br>bastecimiento<br>de agua       | 0.08,0.15,0.5,<br>1.0, 4.0 mL              | 0.1,0.3,1.0,<br>3.0, 10.0 mL             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Playas de re-<br>creo                           | 0.08,0.15,0.5,<br>1.0,4.0 mL.              | 0.1,0.3,1.0,<br>3.0,10.0 mL.             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Ríos                                            | 0.003,0.01,<br>0.02,0.08 mL                | 0.01,0.03,<br>0.1,0.3,<br>1.0 mL.        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Efluentes de<br>aguas residua-<br>les cloradas. | 0.003,0.01,<br>0.02,0.08 mL                | 0.01,0.03,<br>0.1,0.3<br>1.0 mL.         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Aguas residua-<br>les crudas                    | 0.0001,0.0003,<br>0.001,0.003,<br>0.01 mL. | 0.0003,0.001,<br>0.003,0.01,<br>0.03 mL. |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

## **OBJETIVO**

Aprender las técnicas y cuidados que se requieren para la toma de muestras de agua.

## **MATERIAL**

- Frasco para muestra
- Papel de estraza
- Autoclave
- Tiosulfato de sodio al 10%
- Muestra problema
- Pipeta de 1 mL..

## **PROCEDIMIENTO**

**TECNICAS PARA RECOLECCION DE LA MUESTRA.**

**MUESTREO DE UN SISTEMA DE DISTRIBUCION.**

Cuando se toma la muestra de agua se debe dejar un amplio espacio de aire en el frasco para facilitar el mezclado de la muestra por agitación, como paso previo al examen.

Se debe procurar que las muestras sean, en realidad, representativas del agua en estudio, y asimismo, que no se contaminen en forma alguna después del muestreo o antes del examen.

El frasco de muestra se destapa con todo cuidado evitando tocar el tapón y la boca del frasco para que éstos no se contaminen al efectuar la toma de muestra.

El frasco se debe tomar cerca de su base y se ha de llenar sin enjuagar, volviendo a taparlo inmediatamente.

Si se tratara de tomar una muestra de un grifo del sistema de distribución, se debiera comprobar primero que el grifo escogido suministre agua directamente de una tubería de la red a través de una línea de servicio y que no se abastezca, por ejemplo, de una cisterna o de un tanque de almacenamiento.

El grifo se ha de abrir completamente y se deja que el agua fluya al drenaje por 2 o 3 minutos, o por el tiempo suficiente para permitir la purga de la línea de servicio.

En el momento del muestreo se restringe el flujo de la llave, para que se pueda llenar el frasco sin salpicaduras.

Se deben evitar como puntos de muestreo los grifos con fugas, que ocasionen que el agua escurra fuera del frasco.

Debe hacerse una determinación de cloro en el sitio de muestreo.

## MUESTREOS EN CUERPOS DE AGUA

En muestreos directos de ríos, arroyos, lagos, embalses, manantiales o pozos poco profundos (o norias), el propósito debe ser obtener una muestra que sea representativa del agua que se pretende usar para abastecer a los consumidores. Por lo tanto, no es recomendable tomar las muestras demasiado cerca de las márgenes o demasiado lejos del punto de toma, o a una profundidad mayor o menor que la de la toma.

En los arroyos se deben evitar las zonas de remansos. Se pueden tomar las muestras de ríos, arroyos, lagos o embalses asiendo con la mano el frasco, cerca de su base, y sumergiéndolo abajo de la superficie, con la boca hacia abajo. En ese momento se invierte el frasco para que la boca quede ligeramente hacia arriba y en sentido opuesto a la corriente; si no existe corriente, como en los embalses, se crea artificialmente empujando el frasco horizontalmente en dirección opuesta a la de la mano.

Si no es posible la recolección de muestras en estas condiciones, se puede fijar un lastre al frasco, al que se hace descender en el agua. En cualquier caso, se debe procurar no alterar las márgenes. Para tomar muestras profundas en lagos o embalses se necesitan aparatos especiales que permiten destapar mecánicamente el frasco, debajo de la superficie.

Para tomas de muestras de otros lugares especiales no mencionados aquí debe consultarse la técnica particular.

El volumen de muestra debe ser el suficiente para verificar todos los ensayos que se requieran, de preferencia no menos de 100 ml para muestras destinadas a exámenes bacteriológicos.

## REGISTRO DE DATOS Y CONDICIONES DE TRASLADO

Todas las muestras deben ir acompañadas de datos completos y exactos de identificación y descripción como: fecha, hora de muestreo, temperatura del agua, localización del punto de muestreo, nombre del muestreador. Generalmente se utilizan claves para éstos datos.

El examen bacteriológico de las muestras de agua se debe iniciar inmediatamente después de su recolección; sin embargo, muy raras veces se puede proceder así y se deben establecer normas más prácticas. Por lo tanto, se recomienda que los procedimientos técnicos se inicien dentro de la hora siguiente a la recolección de la muestra, y en ningún caso ese lapso debe exceder de 30 horas para agua potable y 8 horas para otro tipo de muestras.

En el período que transcurra entre la recolección y el examen, se debe mantener la muestra enfriada con hielo o en refrigeración (recolección: 6 horas y procedimientos de laboratorio: 2 horas).

## **RESULTADOS**

**Las muestras recolectadas en esta práctica serán utilizadas para realizar los análisis en las siguientes prácticas.**

## **PRACTICA 10**

### **ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA**

#### **CUENTA EN PLACA**

##### **INTRODUCCION**

Las bacterias no se pueden contar por examen microscópico directo a menos que haya como mínimo 100 millones de células por litro. Sin embargo, los depósitos naturales de agua rara vez contienen más de 100 000 células por ml.; por consiguiente, el método indirecto empleado es la cuenta en placa.

La cuenta en placa es uno de los procedimientos de rutina más utilizados para determinar el contenido bacteriano de muy diferentes materiales. En el análisis de agua, esta técnica se utiliza para determinar el número total de organismos presentes en una muestra de agua.

Se trata de proporcionar a los microorganismos las condiciones y alimento necesario, para que puedan desarrollarse en caso de existir, ya que de un organismo se genera una colonia, y dicha colonia es formada por una gran cantidad de microorganismos.

Un volumen determinado de agua se diluye en forma seriada en seguida, 1 ml. de cada dilución se vacía en una placa de agar nutritivo contándose las colonias resultantes.

Como se cuentan únicamente las células capaces de formar colonias, el método se conoce también como "cuenta viable". Las diluciones se efectúan dependiendo del tipo de muestra de agua que se va a utilizar (potable, residual, etc), hasta que se alcanza una dilución que contenga por ml entre 30 y 300 células capaces de formar colonias.

Dado que la muestra original pudo haber contenido desde 0 hasta un millón de bacterias viables, se hace necesario diluir siempre hasta 0.00001 y sembrar en las cajas de Petri muestras de 1 ml. de cada dilución, contando entonces únicamente las colonias en aquellas placas que contienen entre 30 y 300 colonias.

Las razones para estas limitaciones numéricas son, por una parte, que por abajo de 30 el porcentaje de error en la cuenta es demasiado grande, mientras que por arriba de 300 la placa está tan sobrepoblada que no permite a cada célula formar una colonia visible.

Lo usual es que el agua de buena calidad tenga cuentas bajas, menos de 100 por ml. Las cuentas en placa son útiles para determinar la eficiencia de las operaciones para eliminar microorganismos, como la sedimentación, filtración y cloración. Las cuentas se deben hacer antes y después del tratamiento específico.

Los resultados indican en que porcentaje ha sido reducida la población microbiana.

## **OBJETIVO**

Determinar el número de colonias presentes en las cajas de Petri de la muestra problema.

## **MATERIAL**

- Agar Nutritivo o Agar Triptona Glucosa
- Asa de siembra
- Cajas de Petri estériles
- Pipetas graduadas de 1 ml. estériles
- Muestra de agua
- Tubos con agua de dilución
- Mechero

## **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Agitar vigorosamente el frasco que contenga la muestra unas 25 a 40 veces en un minuto, hacer las diluciones convenientes.
- 2.- Colocar 1 ml. de cada dilución en sendas cajas de Petri y verter encima el medio de cultivo previamente fundido y enfriado a una temperatura entre 43 y 45° C.
- 3.- Homogeneizar, dejar solidificar e incubar invirtiendo las cajas a 35 ° C.

La Figura 10.1 indica este procedimiento.

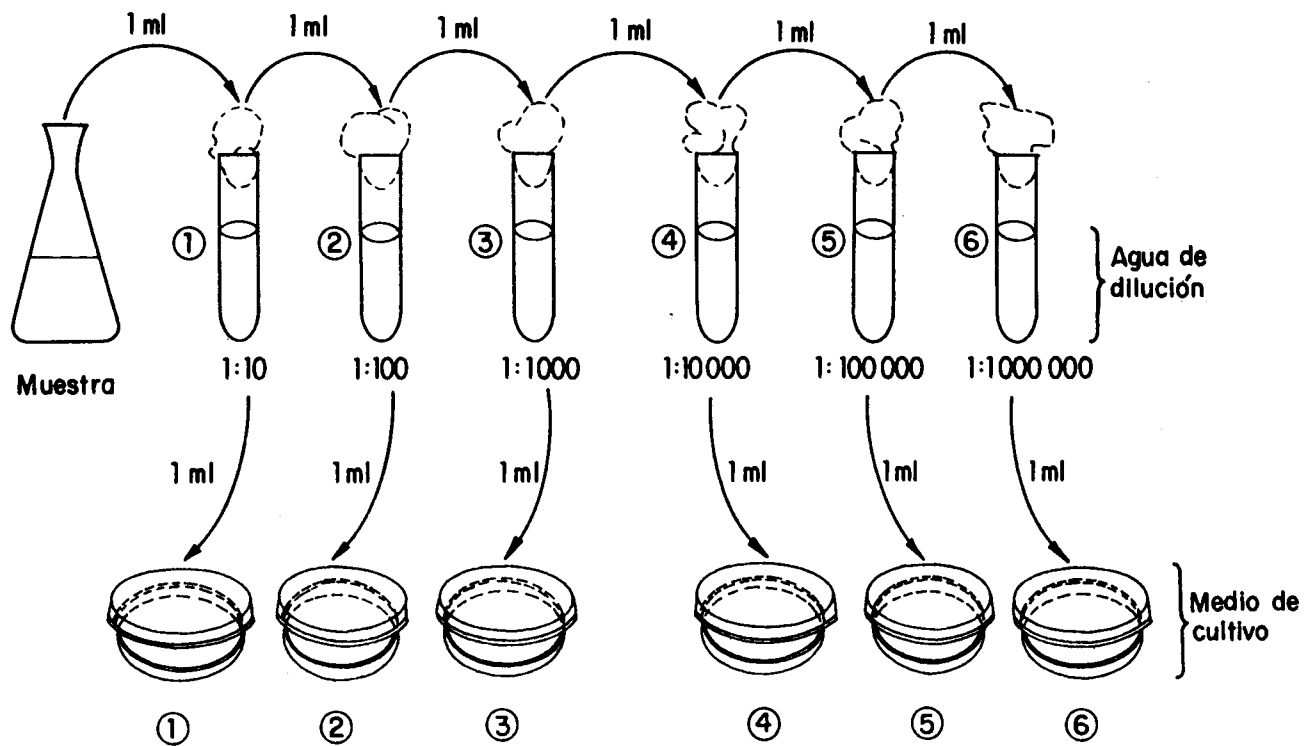


Fig 10.1 CUENTA EN PLACA



## RESULTADOS

### DEPFI

Hacer observaciones a las 24 y 48 horas respectivamente, contar y tomar como bueno el número en aquellas placas en las que haya entre 30 y 300 colonias.

Cuente en forma precisa las colonias, utilizando un cuenta colonias, el que facilitará el proceso de conteo, ya que las colonias se iluminan, amplifican y se observan contra un fondo cuadrículado.

El número de colonias encontradas en la placa, multiplicada por la dilución del espécimen que representa la placa, será igual al número de colonias por ml. (o gramo) del espécimen.

Por ejemplo: si se encontraron 230 colonias en la dilución correspondiente a 1:1000 de una muestra cualquiera, el cálculo será el siguiente:

$$230 \times 1000 = 230\ 000 \text{ colonias / ml.}$$

Es recomendable hacer siembras por duplicado o triplicado de cada una de las diluciones y promediar los resultados de las cuentas.

## PRACTICA 11

### ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA

#### DETERMINACION DE COLIFORMES.

#### TECNICA DE LOS TUBOS MULTIPLES DE FERMENTACION.

### INTRODUCCION

El método de sembrado en placa se usa para tener una idea general de la población bacteriana acuática. Mientras que este método es satisfactorio para estudios generales de Biología, es inadecuado emplearlo para realizar análisis sanitarios de agua; éstos incluyen la búsqueda de bacterias intestinales en el agua, ya que su presencia indica contaminación con aguas negras y el consiguiente peligro de la diseminación de enfermedades entéricas.

En vista de que cualquier bacteria entérica puede ser considerablemente sobrepasada numéricamente por otros tipos presentes en las muestras de agua, es necesario el empleo de una técnica selectiva para ponerlas de manifiesto; después del aislamiento de las colonias en placas de medios selectivos, se requiere su identificación como miembros del grupo *Escherichia-Aerobacter* (Coliformes), para establecer que la fuente de agua ha sido contaminada.

El grupo coliforme incluye a todas las bacterias aerobias o anaerobias facultativas, Gram-negativas, no esporógenas, que fermentan la lactosa con formación de gas, dentro de las 48 horas, a una temperatura de 35 ° C.

Las pruebas normales para la demostración del grupo coliforme se pueden llevar a cabo por la técnica de tubos múltiples de fermentación (prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba complementaria), o por la técnica de filtros de membrana. Cada técnica se aplica dentro de sus limitaciones específicas.

Se ha demostrado que aún después de la agitación de la muestra, es muy irregular la distribución de las bacterias en el agua; es perfectamente posible dividir un volumen de agua en porciones y encontrar después del ensayo, que es nulo el número de organismos en una porción, o cuando menos, inferior a la media aritmética que se base en el examen del volumen total de agua. También es bastante probable que la proliferación en un tubo de fermentación sea el resultado de la multiplicación no de uno, sino de varios organismos. Sin embargo, es más conveniente considerar que el desarrollo se debe a un individuo aislado.

Los resultados del examen de tubos y diluciones múltiples se expresan en términos del "número más probable"; este término es una estimación que se basa en ciertas fórmulas de probabilidad. Por

consideraciones teóricas y por determinaciones en gran escala, se ha observado que esta estimación tiende a ser mayor que el número real y que esta disparidad tiende a disminuir, al aumentar el número de tubos que se examine de cada dilución.

La exactitud de una prueba aislada depende del número de tubos que se empleen, y se obtienen los datos más satisfactorios, cuando en la porción más grande que se examine, se tiene gas en algunos o en todos los tubos; y cuando, en la menor porción que se examine, no hay gas en ningún tubo, o lo hay en muy pocos tubos.

El valor numérico de la estimación del contenido bacteriano se determina, principalmente, por aquella dilución que muestre tanto tubos positivos como negativos. La exactitud que se puede esperar de los resultados depende del número de porciones, en especial de la dilución crítica.

No se debe permitir que se confunda con un mero ejercicio estadístico, el interés creciente en la precisión de la técnica de tubos múltiples y la expresión de los resultados como NMP, pues son un medio para estimar la densidad coliforme de un agua, y por lo tanto, para establecer su calidad sanitaria. La mejor valoración de tal calidad depende aún de la interpretación de los resultados de la técnica de tubos múltiples o de otros métodos, posiblemente más precisos, que se puedan implantar, lo mismo que de todos los informes que se hayan obtenido de un agua por reconocimientos previos o prácticos similares. Cuando se examinan aguas de calidad potable, es necesario usar un mínimo de cinco tubos de fermentación del medio presuntivo que se escoja, conteniendo cada tubo 10 ml o 100 ml de la muestra de agua.

En el examen de otras aguas que se presuma que son de calidad potable, es necesaria la inoculación de cinco tubos de cada dilución, cuando menos, para obtener una precisión aceptable y un informe razonablemente satisfactorio; en ningún caso se deben usar menos de tres tubos de cada dilución.

En el examen de aguas distintas de las de calidad potable, se deben inocular una serie de tubos de caldo lactosado o caldo lauril triptosa, con volúmenes decimales del agua, dependiendo la selección de los volúmenes de la densidad probable de coliformes.

## **OBJETIVO**

Determinar la presencia del grupo coliforme (cuantitativamente NMP), aplicando la técnica de los tubos múltiples de fermentación.

# TECNICA DEL NUMERO MAS PROBABLE.

## TUBOS MULTIPLES DE FERMENTACION

### A.-TUBOS DE FERMENTACION. PRUEBA PRESUNTIVA

#### MATERIAL

- Muestra de agua
- Pipetas graduadas estériles de 1 ml y 10 ml.
- Tubos con agua peptonada para dilución estériles.
- Tubos con caldo lactosado o caldo lauril triptosa (caldo lauril sulfato de sodio).

La técnica empleada en esta práctica es la de los tubos múltiples de fermentación.

#### PROCEDIMIENTO

1.- Tomar un 1 ml. de la muestra problema y hacer las diluciones convenientes, o bien, si se trata de agua potable, sembrar 5 tubos con 10 ml., otros 5 con 10 ml. y 5 más con 1 ml.; o bien adoptar cualquiera de los sistemas que recomiendan las normas. Si se utilizan porciones de 10 ml. en adelante, utilizar un volumen de caldo igual al de la siembra, pero utilizando caldo de doble concentración.

Rotular en forma adecuada los tubos indicando el número de muestra, volumen y número de tubo e identificación del analista (ver figura 11.1 ).

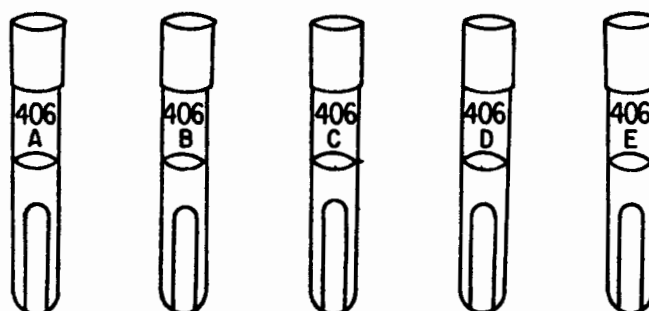
2.- Incubar durante 48 horas a 35 ° C.

3.- Observar la aparición de gas. Cualquier cantidad se considera como positiva.

4.- Determinar el número más probable consultando las tablas del "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater". (Ver tabla 11.1).

5.- Para la prueba presuntiva, se observan los tubos a las 24 horas de incubación, tomar los tubos positivo para continuar la prueba; en caso de que no hubiera tubos positivos se dejan incubar otras 24 horas. Si a las 48 horas, no hay tubos positivos, la prueba se da por concluida y se considera que no hay presencia de *Escherichí colí* ( ver figura 11.2 ).

**FIGURA 11.1**  
**MODO SUGERIDO PARA LA IDENTIFICACION DE TUBOS**  
**EN LA PRUEBA DE TUBOS MULTIPLES**



|                         | Tubo<br>1       | Tubo<br>2       | Tubo<br>3       | Tubo<br>4       | Tubo<br>5       | Volumen de<br>muestra |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|
| Número<br>de<br>muestra | 406<br>A        | 406<br>B        | 406<br>C        | 406<br>D        | 406<br>E        | 10 ml                 |
|                         | 406<br>a        | 406<br>b        | 406<br>c        | 406<br>d        | 406<br>e        | 1 ml                  |
|                         | 406<br><u>a</u> | 406<br><u>b</u> | 406<br><u>c</u> | 406<br><u>d</u> | 406<br><u>e</u> | 0.1 ml                |
|                         | 406<br>1a       | 406<br>1b       | 406<br>1c       | 406<br>1d       | 406<br>1e       | 0.01 ml               |
|                         | 406<br>2a       | 406<br>2b       | 406<br>2c       | 406<br>2d       | 406<br>2e       | 0.001 ml              |

TABLA 11.1 a

INDICE DEL NMP (NUMERO MAS PROBABLE CON LIMITES DE CONFIANZA DEL 95% PARA VARIAS COMBINACIONES DE RESULTADOS POSITIVOS CUANDO SE USAN 5 TUBOS POR DILUCION (10 ML., 1.0 ML, 0.1 ML).

| COMBINACION<br>DE POSITIVOS | INDICE DEL<br>NMP/100 ML | LIMITE DE<br>CONFIANZA<br>DEL 95% |      | COMBINACION<br>DE POSITIVOS | INDICE DEL<br>NMP/100 ML | LIMITE DE<br>CONFIANZA<br>DEL 95% |       |
|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|------|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-------|
|                             |                          | INF.                              | SUP. |                             |                          | INF.                              | SUP.  |
| 0-0-0                       | <0                       | -                                 | -    | 4-2-0                       | 22                       | 7                                 | 67    |
| 0-0-1                       | 2                        | <0.5                              | 7    | 4-2-1                       | 26                       | 9                                 | 78    |
| 0-1-0                       | 2                        | <0.5                              | 7    | 4-3-0                       | 27                       | 9                                 | 80    |
| 0-2-0                       | 4                        | <0.5                              | 11   | 4-3-1                       | 33                       | 11                                | 93    |
|                             |                          |                                   |      | 4-4-0                       | 34                       | 12                                | 93    |
| 1-0-0                       | 2                        | <0.5                              | 7    | 5-0-0                       | 23                       | 7                                 | 70    |
| 1-0-1                       | 4                        | <0.5                              | 11   | 5-0-1                       | 31                       | 11                                | 89    |
| 1-1-0                       | 4                        | <0.5                              | 11   | 5-0-2                       | 43                       | 15                                | 110   |
| 1-1-1                       | 6                        | <0.5                              | 15   | 5-1-0                       | 33                       | 11                                | 93    |
| 1-2-0                       | 6                        | <0.5                              | 15   | 5-1-1                       | 46                       | 16                                | 120   |
|                             |                          |                                   |      | 5-1-2                       | 63                       | 21                                | 150   |
| 2-0-0                       | 5                        | <0.5                              | 13   | 5-2-0                       | 49                       | 17                                | 130   |
| 2-0-1                       | 7                        | 1                                 | 17   | 5-2-1                       | 70                       | 23                                | 170   |
| 2-1-0                       | 7                        | 1                                 | 17   | 5-2-2                       | 94                       | 28                                | 220   |
| 2-1-1                       | 9                        | 2                                 | 21   | 5-3-0                       | 79                       | 25                                | 190   |
| 2-2-0                       | 9                        | 2                                 | 21   | 5-3-1                       | 110                      | 31                                | 250   |
| 2-3-0                       | 12                       | 3                                 | 28   | 5-3-2                       | 140                      | 37                                | 340   |
| 3-0-0                       | 8                        | 1                                 | 19   | 5-3-3                       | 180                      | 44                                | 500   |
| 3-0-1                       | 11                       | 2                                 | 25   | 5-4-0                       | 130                      | 35                                | 300   |
| 3-1-0                       | 11                       | 2                                 | 25   | 5-4-1                       | 170                      | 43                                | 490   |
| 3-1-1                       | 14                       | 2                                 | 34   | 5-4-2                       | 220                      | 57                                | 700   |
| 3-2-0                       | 14                       | 4                                 | 34   | 5-4-3                       | 280                      | 90                                | 850   |
| 3-2-1                       | 17                       | 5                                 | 46   | 5-4-4                       | 350                      | 120                               | 1,000 |
| 4-0-0                       | 13                       | 3                                 | 31   | 5-5-0                       | 240                      | 68                                | 750   |
| 4-0-1                       | 17                       | 5                                 | 46   | 5-5-1                       | 350                      | 120                               | 1,000 |
| 4-1-0                       | 17                       | 5                                 | 46   | 5-5-2                       | 540                      | 180                               | 1,400 |
| 4-1-1                       | 21                       | 7                                 | 63   | 5-5-3                       | 920                      | 300                               | 3,200 |
| 4-1-2                       | 26                       | 9                                 | 78   | 5-5-4                       | 1,600                    | 640                               | 5,800 |
|                             |                          |                                   |      | 5-5-5                       | ≥2,400                   | —                                 | —     |

**TABLA 11.1 B**

**ED CINCO TUBOS DE 10 ML.**

| Número de tubos positivo<br>de cinco tubos de 10 ml | NMP por<br>100 ml | Límite del NMP |          |
|-----------------------------------------------------|-------------------|----------------|----------|
|                                                     |                   | Inferior       | Superior |
| 0                                                   | 0                 | 0              | 6.0      |
| 1                                                   | 2.2               | 0.1            | 12.6     |
| 2                                                   | 5.1               | 0.5            | 19.2     |
| 3                                                   | 9.2               | 1.6            | 29.4     |
| 4                                                   | 19.0              | 3.3            | 52.9     |
| 5                                                   | ∞                 | 8.0            | ∞        |

## RESULTADOS

Determinar el número más probable, consultando las tablas. y separar los tubos positivos para continuar la prueba.

### B. - TUBOS DE FERMENTACION. PRUEBA CONFIRMATIVA.

## MATERIAL

- Tubos de fermentación con caldo lactosado o caldo lauril triptosa positivos de la prueba anterior.
- Tubos de fermentación con caldo bilis-lactosa-verde brillante.
- Una caja con agar Endo
- Una caja con agar Eosina - azul de metileno
- Mechero
- Asa de siembra
- Portaobjetos.

## PROCEDIMIENTO

En cuanto los tubos de la prueba presuntiva muestren gas, proceder de inmediato a efectuar la siembra en los medios para la prueba confirmativa, de la manera siguiente:

a.- Tomar del tubo positivo una pequeña muestra con el asa y transferirla al tubo con caldo bilis - lactosa - verde brillante. Incubar a 35 ° C durante 48 horas.

b.- Tomar de alguno de los tubos que dieron la prueba positiva presuntiva una cantidad muy pequeña con el asa. Sembrar sobre las cajas de Petri con Endo y con Eosina - azul de metileno, utilizando algunas de las técnicas de aislamiento. Incubar a 35 ° C, 24 horas, invirtiendo las cajas.

## RESULTADOS

Interpretación: la formación de gas en cualquier cantidad, dentro de las 48 horas, constituye una prueba positiva, debiendo entonces continuarse la prueba hasta la fase complementaria.

En las cajas de Petri con Endo se consideran colonia típicas todas aquellas que son nucleadas, tengan o no brillo metálico; como atípicas las opacas, no nucleadas, mucoides, que después de 24 horas de incubación presenten color rosa; y como negativas todas las demás.

En el medio con Eosina - azul de metileno se consideran colonias típicas todas aquellas que tengan centro negro (cuando se ven desde abajo, contra la luz) y se denominan nucleadas. Las colonias atípicas son las no nucleadas de color rosa y opacas.

### **C. - TUBOS DE FERMENTACION. PRUEBA COMPLEMENTARIA**

#### **MATERIAL.**

- Tubos de fermentación positivos de caldo bilis - lactosa - verde brillante.
- Una caja de agar Endo
- Una caja con agar Eosina - azul de metileno
- Un tubo con medio de agar nutritivo inclinado
- Un tubo de fermentación con caldo lauril sulfato de sodio
- Mechero
- Asa de siembra
- Portaobjetos
- Colorantes y reactivos para coloración de Gram.

#### **PROCEDIMIENTO**

A.- Si se utilizaron los tubos de fermentación con lactosa- bilis verde brillante para proseguir la prueba, siémbrese entonces sobre las placas con Endo y Eosina azul de metileno, en cuanto en dichos tubos aparezca gas sin esperar a que pasen las 48 horas.

B.- En el caso de que se hubieran preferido las cajas de Petri, escójase una colonia típica o atípica y siémbrese en un tubo de fermentación con caldo lauril triptosa y en otro con agar nutritivo inclinado, utilizando el asa de siembra tratando de no tocar otra colonia.

C.- Incube ambos tubos a 35 ° C durante 24 y 48 horas, observe la presencia o ausencia de gas en el tubo de fermentación. A las 24 horas tome un poco de cultivo del tubo de agar nutritivo inclinado, con el asa de siembra y haga una coloración de Gram. (Ver figuras 11.2 ,11.3 y 11.4 ).

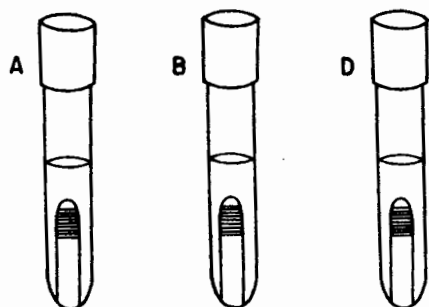
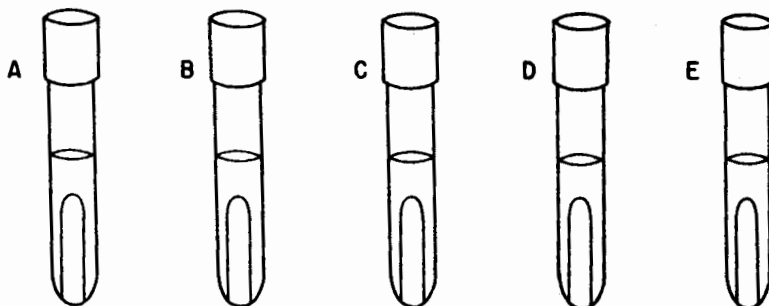
#### **RESULTADOS**

Interpretación: la formación de gas en el tubo de fermentación y la presencia de bacterias Gram - Negativas, no esporuladas, en forma de bacilos cortos, se considera como una prueba positiva completa.

La tabla 11.2 sugiere una forma para presentación de los resultados obtenidos

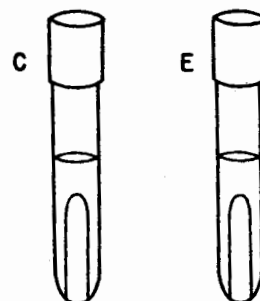
## A. PRUEBA PRESUNTIVA

SE INOCULAN 10 ml DE LA MUESTRA DE AGUA A CADA UNO DE LOS 5 TUBOS DEL CALDO DE LAURIL TRIPTOSA, Y SE INCUBAN POR  $24 \pm 2$  Hs a  $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



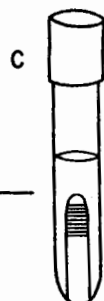
EXISTE PRODUCCION DE GAS  
PRUEBA PRESUNTIVA POSITIVA

SIN GAS O CON PRODUCCION DUDOSA  
DE GAS SE INCUBA POR 25 Hs MAS  
(INCUBACION TOTAL  $48 \pm 2$  Hs)



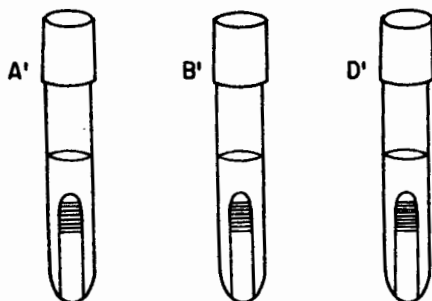
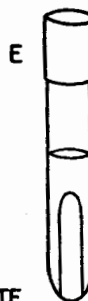
B. PRUEBA CONFIRMATIVA SE  
TRANSFIERE CON EL ASA UN INOCULO A:

CALDO LACTOSADO BILIS VERDE BRILLANTE. SE  
INCUBA POR  $48 \pm 2$  Hs a  $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



EXISTE PRODUCCION DE GAS  
PRUEBA POSITIVA

NO SE PRODUCE GAS  
PRUEBA NEGATIVA  
GRUPO COLIFORME AUSENTE



SE PRODUCE GAS  
GRUPO COLIFORME CONFIRMADO

NO SE PRODUCE GAS  
PRUEBA NEGATIVA  
GRUPO COLIFORME AUSENTE

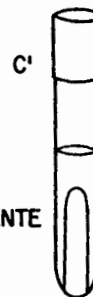
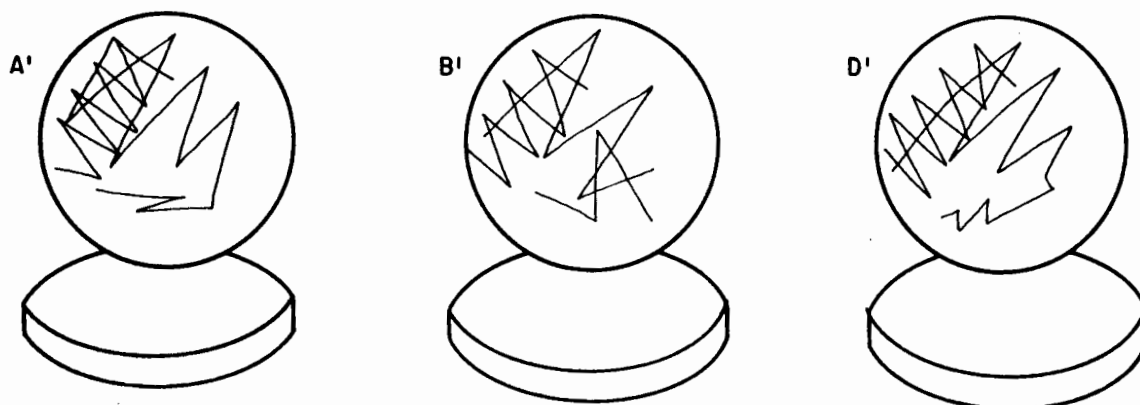
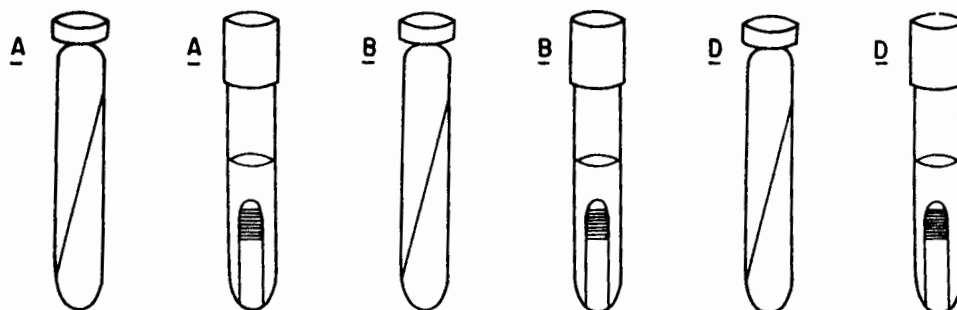


Fig 11.2 DETERMINACION DEL GRUPO COLIFORME POR MEDIO DE LA TECNICA DE TUBOS MULTIPLES DE FERMENTACION

C. PRUEBA COMPLEMENTARIA. LOS INOCULOS DE LOS TUBOS A', B' y D' SE APLICAN EN ESTRIAS SOBRE LAS PLACAS DE AGAR EOSINA AZUL DE METILENO. (EMB) SE INCUBAN POR  $24 \pm 2$  Hs, a  $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



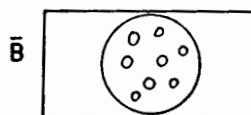
SE TRANSFIERE UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO DE UNA PLACA DE EMB ó AGAR NUTRIENTE ADOPTANDO UN PLANO INCLINADO DENTRO DEL TUBO DE ENSAYO Y AL CALDO DE LAURIL TRIPTOSA. SE INCUBAN LOS TUBOS DE CALDO DE LAURIL TRIPTOSA POR 24 ó  $48 \pm 2$  Hs, a  $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



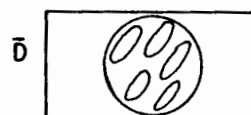
SE PREPARA UNA TINCION DE GRAM CON UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO BACTERIANO DE CADA TUBO DE AGAR NUTRIENTE INCLINADO



PRUEBA POSITIVA  
(Bacilos gram negativos)



PRUEBA NEGATIVA  
(Cocos gram negativos)



PRUEBA NEGATIVA  
(Bacilos gram positivos)

PRUEBA COMPLETA POSITIVA: SE DEMUESTRA LA PRODUCCION DE GAS, BACILOS ESPOROGENOS TINCION GRAM NEGATIVA (roja) IDENTIFICADOS

PRUEBA COMPLETA NEGATIVA: NO SE CUMPLE CON ALGUNO O CON TODOS LOS REQUISITOS ANTERIORES DE LA PRUEBA COMPLETA POSITIVA

Fig 11.2 Continuación

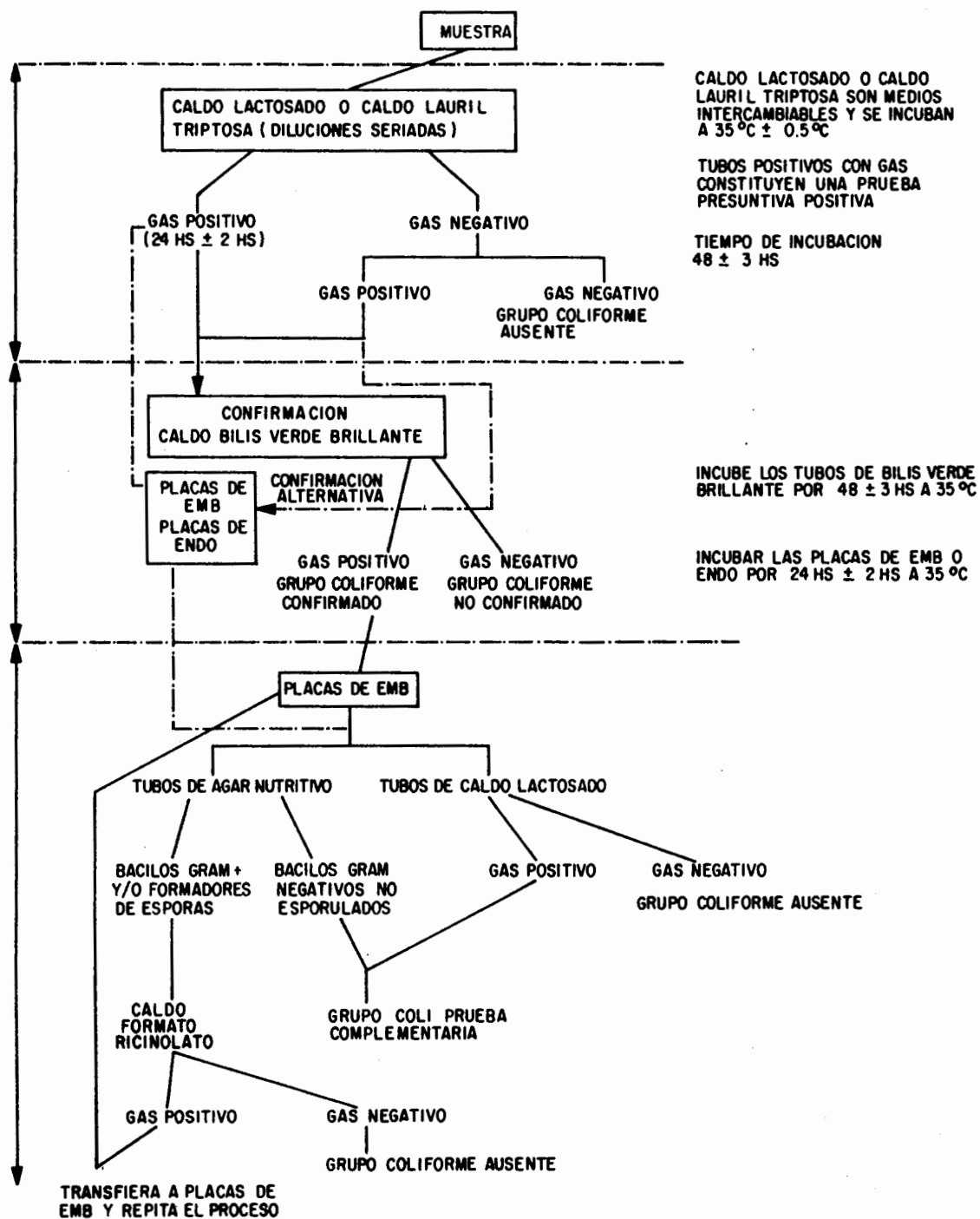


Fig 11.3 PRUEBAS PARA EL GRUPO COLIFORME

EL GRUPO DE BACTERIAS COLIFORMES INCLUYE  
TODOS LOS BACILOS GRAM NEGATIVOS ANAERO-  
BICOS Y FACULTATIVOS, NO ESPORULADOS QUE  
PRODUCEN GAS Y ACIDO A PARTIR DE LA LACTOSA

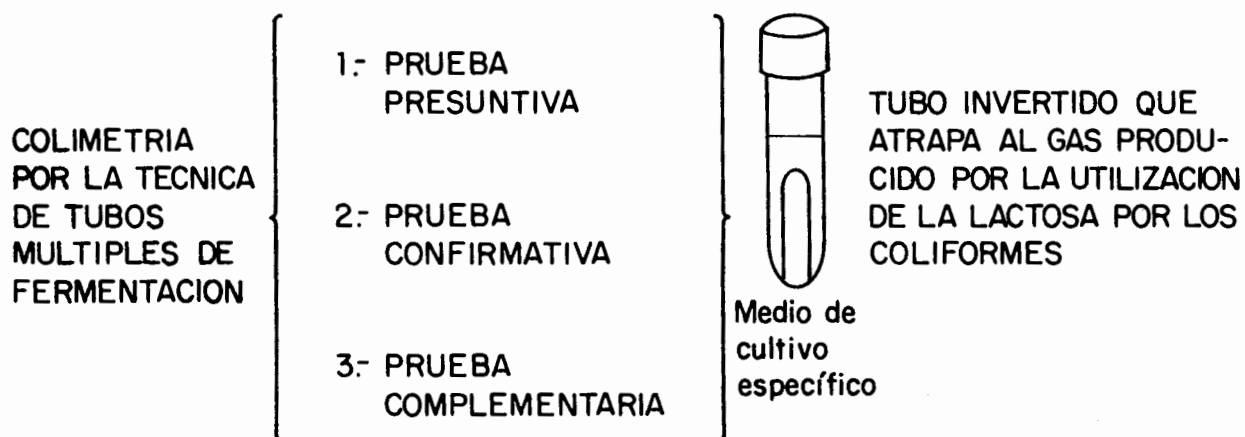


Fig 11.4 DETERMINACION DEL GRUPO COLIFORME POR  
MEDIO DE LA TECNICA DE TUBOS MULTIPLES  
DE FERMENTACION

**Tabla 11.2 FORMA DE REPORTAR LOS RESULTADOS DE ANALISIS DE AGUA**

|              |                 |                                  |                           |
|--------------|-----------------|----------------------------------|---------------------------|
| <b>FECHA</b> | <b>HOJA No.</b> | <b>PROCEDENCIA DE LA MUESTRA</b> | <b>NOMBRE DEL TECNICO</b> |
|              |                 |                                  |                           |

|                   |                     |                               |
|-------------------|---------------------|-------------------------------|
| <b>PRESUNTIVA</b> | <b>CONFIRMATIVA</b> | <b>COLIFORMES FECALIS (*)</b> |
|-------------------|---------------------|-------------------------------|

|               |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| <b>ml</b>     |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>24 hs</b>  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>48 hs</b>  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| <b>CODIGO</b> |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

|                          |
|--------------------------|
| <b>INDICE NMP/100 ml</b> |
|                          |

## PRACTICA 12

### ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA. DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES. PRUEBAS DIFERENCIALES. REACCIONES IMVIC

#### INTRODUCCION

Se presupone que el objetivo de los análisis rutinarios son para determinar la existencia de microorganismos patógenos en el agua. Sin embargo, esto no es verdad, por las siguientes razones:

- 1.- Los organismos patógenos llegan al agua en forma esporádica y no sobreviven mucho tiempo; por lo tanto, pueden no estar en una muestra que se envíe al laboratorio.
- 2.- Si se encuentran en pequeñas cantidades, pueden pasar desapercibidos a los procedimientos empleados.
- 3.- Se necesitan 24 horas o más para obtener resultados de los exámenes y si se encuentran microorganismos patógenos, muchas personas pueden haber tomado agua antes de que se conozcan resultados, y así haberse expuesto a la infección.

Se sabe que los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua, proceden de las descargas intestinales de hombres y animales. Además, ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli*, y varios microorganismos similares, denominados coliformes, estreptococos fecales, ( como *Streptococcus faecalis*) y *Clostridium perfringens*, son habitantes normales del intestino grueso de hombres y animales, y en consecuencia siempre están en las materias fecales. Así pues, la presencia de cualquiera de estas especies en el agua es evidencia de contaminación fecal y el camino está abierto a los patógenos ya que se encuentran en las materias fecales.

Puesto que los exámenes de laboratorio para encontrar microorganismos patógenos en el agua tienen las desventajas enumeradas, se han desarrollado técnicas para detectarlos en las excretas, particularmente los del grupo coliforme. Este propósito ha probado ser satisfactorio en la práctica y tiene las siguientes ventajas:

- 1.- Los microorganismos coliformes, sobre todo *E. coli*, habitan constantemente en el intestino humano en grandes cantidades. Se estima que una persona, en promedio, excreta al día miles de millones de estos microorganismos.
- 2.- Estos microorganismos viven más tiempo en el agua que los patógenos.

3.- Obviamente, una persona sana en general no elimina microorganismos patógenos, pero puede desarrollársele una infección intestinal y esos microorganismos aparecerán en las materias fecales. Así, la presencia de coliformes en el agua se toma como señal de alarma, pues ha sido contaminada peligrosamente.

## EL GRUPO COLIFORME

El grupo de bacterias coliformes comprende todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, gram-negativos, no esporulados que producen ácido y gas al fermentar la lactosa. Las especies clásicas de este grupo son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. Hay relación de estos microorganismos con otros del grupo entérico - *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomona* y *Alcaligenes* gram-negativos no esporulados -.

*E. coli* es un habitante normal del intestino humano y de los animales. *Enterobacter aerogenes* es más frecuente en granos y plantas pero también en las materias fecales. Como estas especies tienen gran semejanza en su aspecto morfológico y características de cultivo, es necesario recurrir a pruebas bioquímicas para diferenciarlos. Reacciones que tengan las siguientes cuatro características son muy importantes para lograr este propósito:

1.- Capacidad para producir indol. *E. coli* lo produce, y *Enterobacter aerogenes* no.

2.- Cantidad de ácido producida en un medio especial de caldo glucosado adicionado del indicador rojo de metilo. Los dos microorganismos producen ácido a partir de la glucosa. Sin embargo, *E. coli* produce pH más bajo, lo que hace que vire al rojo de metilo, mientras que *Enterobacter aerogenes* no cambia el color del indicador.

3.- Capacidad para producir acetilmetilcarbinol en un medio de peptona glucosado. Este compuesto químico se detecta por la reacción de Voges-Proskauer. *E. coli* no produce acetilmetilcarbinol mientras que *Ent. aerogenes* sí lo hace.

4.- Utilización de citrato de sodio. *Enterobacter aerogenes* es capaz de utilizar el citrato de sodio como su única fuente de carbono, esto es, se desarrolla en un medio de cultivo químicamente definido en el cual el citrato de sodio es el único compuesto de carbono. *E. coli* no se desarrolla en estas circunstancias.

Por conveniencia, a estas pruebas se las ha designado en forma colectiva reacciones IMViC (I = indol, M = rojo de metilo, Vi = reacción Voges-Proskauer y C = citrato).

La tabla 12.1 muestra las reacciones de cada una de las especies típicas.

Las reacciones de los microorganismos del grupo *coli* - *aerogenes* desafortunadamente no son tan claras como las que se describen aquí. Algunos cultivos responden con otras combinaciones de reacciones a este esquema de pruebas y generalmente se les conoce como tipos intermedios. Además, hay especies del género *Klebsiella* y *Citrobacter* que se parecen a los coliformes y de los cuales es necesario obtener datos bioquímicos y serológicos más detallados para poder diferenciarlas.

**TABLA 12.1**

**DIFERENCIACION DE LAS CEPAS TIPICAS DE ESCHERICHIA COLI Y ENTEROBACTER AEROGENES CON BASE EN LAS REACCIONES IMVIC.**

| ORGANISMO                     | REACCION |                   |                    |         |
|-------------------------------|----------|-------------------|--------------------|---------|
|                               | INDOL    | ROJO DE<br>METILO | VOGES<br>PROSKAUER | CITRATO |
| <i>Escherichia coli</i>       | +        | +                 | -                  | -       |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | -        | -                 | +                  | +       |

**OBJETIVO**

Determinar la presencia de coliformes fecales en la muestra problema, así como realizar las pruebas diferenciales.

**MATERIAL**

- Tubos positivos de la prueba presuntiva
- Tubos con caldo *Escherichia coli* (EC)
- Asa de siembra
- Mechero
- Baño María a  $44.5^{\circ} \text{C} \pm 0.2^{\circ} \text{C}$ .

## **PROCEDIMIENTO**

Esta es una prueba CONFIRMATIVA que se aplica a las pruebas presuntivas positivas y NO DIRECTAMENTE A LA MUESTRA PROBLEMA.

1.- Inocular por cada tubo positivo, uno con caldo EC, utilizando el asa de siembra.

2.- Incubar a  $44.5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. No dejar pasar más de media hora entre la inoculación y la incubación.

## **RESULTADOS**

Se considera una reacción positiva, que indica origen fecal, la producción de gas en el tubo de fermentación a las 24 horas o antes de ese lapso.

Consigne, tabulándose, los resultados (Ver figuras 11.4 y 12.1 ).

## **PRUEBAS DIFERENCIALES. REACCIONES INVIC**

### **A).- PRUEBA DEL INDOL.**

## **MATERIAL**

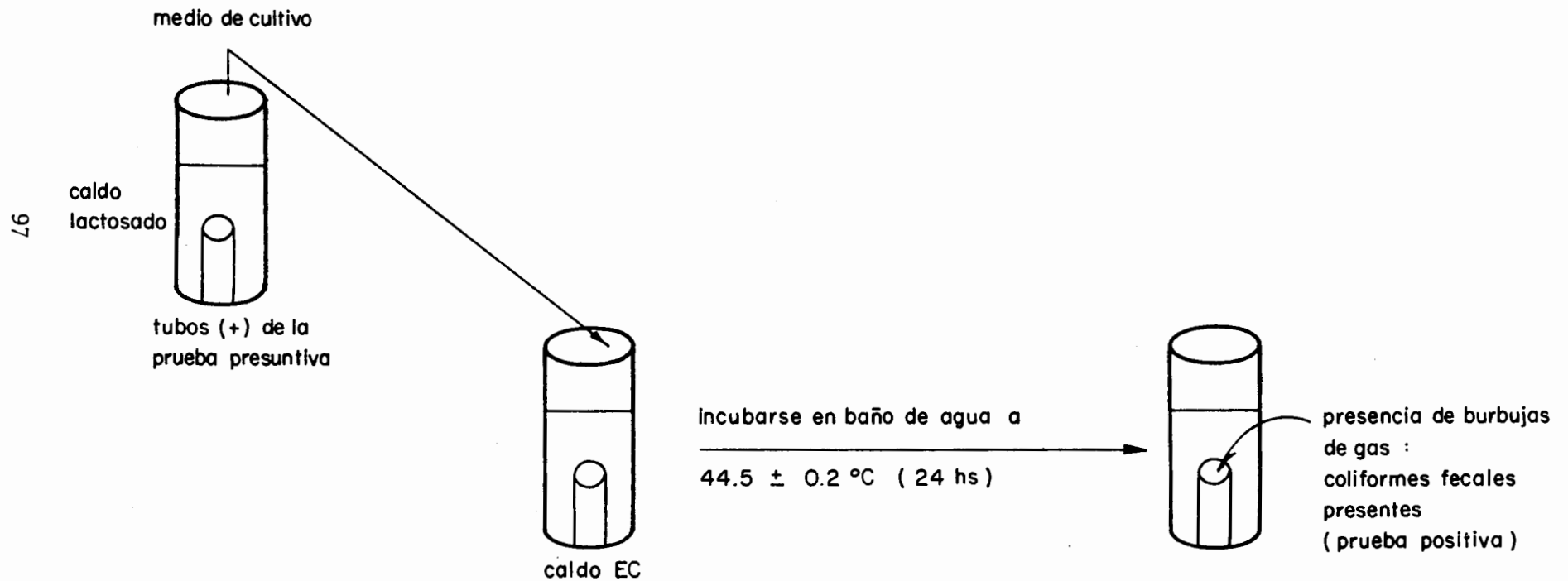
- Tubos con caldo triptofano
- Tubos positivo de la prueba de coliformes fecales (EC) o cajas de Petri con colonias típicas o atípicas.
- Reactivo de Kovac o de Ehrlich
- Asa de siembra
- Pipetas graduadas de 1 ml. esterilizada.

## **PROCEDIMIENTO**

1.- Seleccione una colonia típica, bien aislada, de alguna de las placas de la prueba confirmativa y siembre de ahí, tomando con el asa de siembra, en un tubo con caldo triptofano. Incube 24 horas a  $35^{\circ}\text{C}$ .

2.-Agregue 0.2 a 0.3 ml. del reactivo de Ehrlich ó 0.5 ml. de la solución de Kovac. Deje reposar durante 10 minutos y observe el resultado.

Fig 12.1 Determinación de coliformes fecales



## **RESULTADOS**

**Interpretación:** la aparición de un anillo rojo en la superficie del líquido indica una reacción positiva, debido a la formación de indol a partir del triptofano.

### **BD.- PRUEBA DEL ROJO DE METILO**

#### **MATERIAL**

- Tubos con 10 ml de caldo peptonado
- Asa de siembra
- Solución indicadora de rojo de metilo
- Mechero

#### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Sembrar de alguna de las colonias típicas de los medios de Endo o Eosina-azul de metileno, al tubo con caldo peptonado, utilizando el asa de siembra.
- 2.- Incubar 5 días a 35 ° C.
- 3.- Añadir 10 gotas del indicador.

## **RESULTADOS**

**Interpretación:** Si aparece un color rojo, la prueba se considera positiva, si el color es amarillo la prueba es negativa.

### **CD.- PRUEBA DE VOGES - PROSKAUER**

#### **MATERIAL**

- Cajas de Petri de la prueba confirmativa.
- Tubos con 10 ml. de caldo peptonado
- Solución de hidróxido de potasio
- Pipetas graduadas de 1 ml.

## PROCEDIMIENTO

- 1.- Inocular el tubo de caldo peptonado con alguna de las colonias típicas seleccionadas en las cajas de Endo o Eosina -azul de metileno, tomándola con el asa de siembra.
- 2.- Incubar a 35 °C, 48 horas.
- 3.- Agregar al tubo de cultivo 0.6 ml. de solución de alfa-naftol. Agitar y añadir, ya sin agitación, 0.2 ml de solución de KOH.

## RESULTADOS

Interpretación: Si aparece una coloración rosa o rojiza en los tubos, al cabo de 2 a 4 horas, la prueba se considera positiva. La lectura debe hacerse precisamente en ese lapso, pues los resultados leídos después de las 4 horas no tienen validez.

### DD.- PRUEBA DEL CITRATO DE SODIO

## MATERIAL

- Cajas de Petri con colonias típicas o atípicas en los medios de Endo o Eosina - azul de metileno.
- Tubos con una superficie inclinada pequeña de medio de citrato de Simmons.
- Asa de siembra
- Mechero

## PROCEDIMIENTO

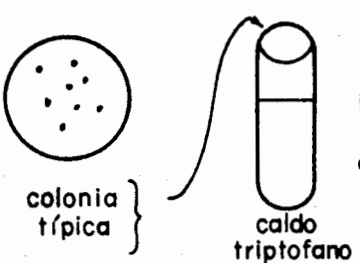
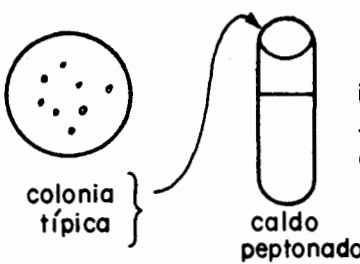
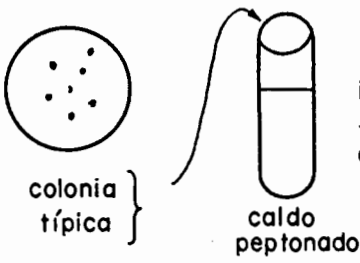
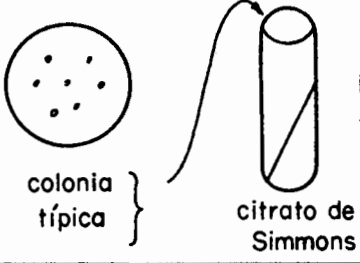
- 1.- Inocule una pequeñísima cantidad de cultivo en la superficie inclinada del tubo con medio de Simmons.
- 2.- Incube de 72 a 96 horas a 35 ° C.

## RESULTADOS

Interpretación: el crecimiento, aunado al vire del indicador, constituye una prueba positiva. Si no se ve que haya cambiado el color del medio, la prueba se considera como negativa.

La figura 12.2 resume gráficamente el procedimiento para las pruebas diferenciales.

Fig 12.2 PRUEBAS DIFERENCIALES O IMViC

| INICIAL | PRUEBA          | MEDIO DE CULTIVO   | PROCEDIMIENTO                                                                                                                                                                                                                               | RESULTADO (POSITIVO)                                              |
|---------|-----------------|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| I       | Indol           | caldo triptofano   |  <p>colonia típica } caldo triptofano</p> <p>incubar 24hs<br/>a 35°C</p> <p>Reactivo de Ehrlich<br/>+<br/>o<br/>Reactivo de Kovacs</p> <p>esperar 10'</p> | Observar aparición de coloración roja                             |
| M       | Rojo de metilo  | caldo peptonado    |  <p>colonia típica } caldo peptonado</p> <p>incubar 5 días<br/>a 35°C</p> <p>Solución Indicadora de rojo de metilo</p>                                    | Observar aparición de coloración roja por vire del indicador      |
| Vi      | Voges Proskauer | caldo peptonado    |  <p>colonia típica } caldo peptonado</p> <p>incubar 48 hs<br/>a 35°C</p> <p>+ 0.6 ml α naftol (agitar) + 0.2 ml KOH (sin agitar)</p>                     | Observar aparición de coloración rosa o rojiza (2 - 4 hs después) |
| C       | Citrato         | citrato de Simmons |  <p>colonia típica } citrato de Simmons</p> <p>incubar de 72 a 96 hs a 35 °C</p>                                                                        | Observar crecimiento y vire                                       |

## PRACTICA 13

### DETERMINACION DE OTROS INDICES DE CONTAMINACION

#### ESTREPTOCOCOS FECALES.

#### DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE.

### INTRODUCCION

Los términos "enterococos", estreptococos fecales", *Streptococcus* del grupo D", "*Streptococcus faecalis*", y aún "estreptococos", se han usado indistintamente para indicar la presencia de estreptococos en el tracto intestinal de animales de sangre caliente, o el material fecal excretado en forma reciente por otros.

Aunque las características de los estreptococos fecales, de los enterococos y de los estreptococos del grupo D son muy semejantes, no son sinónimos.

El siguiente diagrama ilustra los subgrupos contenidos en el grupo de estreptococos fecales:

|                       |                                                   |         |
|-----------------------|---------------------------------------------------|---------|
| Grupo<br>Enterococcus | <i>S. faecalis</i>                                | G       |
|                       | <i>S. faecalis</i> subespecie <i>liquefaciens</i> | R       |
|                       | <i>S. faecalis</i> subespecie <i>zymogenes</i>    | U       |
|                       | <i>S. faecium</i>                                 | P       |
|                       |                                                   | O       |
|                       | <i>S. bovis</i>                                   |         |
|                       | <i>S. equinus</i>                                 | D       |
|                       | <i>S. avium</i>                                   | GRUPO Q |

En la forma que lo define Sherman, el estreptococo fecal incluye cuatro especies del grupo enterococcus: *Streptococcus faecalis*, *S. zymogenes*, *S. durans* y *S. liquefaciens*.

Estos organismos forman ácido a partir de la dextrosa, no llegan a producir catalasa, descarboxilan la triosina y proliferan, en presencia de 6.5% de cloruro de sodio y a pH 9.6, en leche que contenga 0.1% de azul de metileno y sobre agar con 40% de bilis y a 45 ° y 10 ° C.

Otras características de este grupo son su resistencia a la penicilina, estreptomina, sulfonamidas y telurito de potasio. Sólo dos de ellos, *S. zymogenes* y *S. durans*, producen la beta-hemólisis. Estos cuatro estreptococos pertenecen al Grupo serológico D de Lancefield.

También son estreptococos fecales otros organismos como el *S. faecalis* (biotipo fecal), *S. bovis* y *S. equinus*, que se pueden incluir en las especies de estreptococos que se consideran indicadoras de contaminación fecal.

Se pueden utilizar al grupo de enterococos como un indicador de la contaminación fecal, teniendo en cuenta que el habitat normal de estos organismos es el intestino del hombre y de los animales, y que no se sabe que se encuentren en la naturaleza, en ausencia de contaminación fecal del hombre o de los animales.

Los enterococos perecen rápidamente en los suelos, mientras que los organismos coliformes sobreviven por largos períodos. Además, los enterococos no proliferan en las aguas. No se proponen estas pruebas para enterococos como un sustituto de las determinaciones de coliformes; sin embargo, si se demuestra la presencia del estreptococo fecal se confirma la suposición de que los organismos coliformes que se identifican en una muestra de agua son de origen fecal. En consecuencia, la prueba puede ser de valor en cualquier problema relacionado con el significado sanitario de las bacterias coliformes.

Para los propósitos de análisis microbiológico de las aguas, una definición aceptable de estreptococos fecales es la siguiente:

"El grupo compuesto de especies del grupo D que se encuentran presentes en forma consistente en números significativos en excretas frescas de animales de sangre caliente, el cual, incluye a todos los grupos de enterococos, además de otros grupos de estreptococos".

La relación coliformes fecales / estreptococos fecales (CF/SF), cuando se considera en las aguas residuales municipales es de 4.0 o mayor, mientras que es menor de 0.7 para escurrimientos provenientes de agua de lluvias (contaminación producida por animales).

El uso de esta relación es útil para identificar el origen de la contaminación como de origen humano o no humano.

La tabla 1 presenta la relación CF / SF calculada para algunos animales:

TABLA No. 1

| Contaminación<br>de origen | CF/SF |
|----------------------------|-------|
| Humano -----               | 4.4   |
| Pato -----                 | 0.6   |
| Oveja -----                | 0.4   |
| Pollo -----                | 0.4   |
| Puerco -----               | 0.4   |
| Vaca -----                 | 0.2   |
| Pavo -----                 | 0.1   |

Las determinaciones de enterococos pueden ser de particular valor para lo siguiente:

- a) Reconocimientos de contaminación de corrientes;
- b) Estudios en algunas aguas potabilizadas, ya que, por ejemplo, los enterococos pueden ser más resistentes que las bacterias coliformes hacia la acción desinfectante del cloro;
- c) Estudios de aguas de albercas, balnearios, y
- d) Estudios de aguas salobres, en las que los enterococos pueden sobrevivir por mayor tiempo que los coliformes.

En aguas naturales, la proporción más frecuente de organismos coliformes a enterococos puede variar de 10:1 a 1:2.

Se pueden utilizar dos técnicas para las determinaciones de enterococos:

- a) las diluciones en tubos múltiples, con pruebas confirmadas y estimación del número más probable, y
- b) el filtro de membrana.

Ambas son alternativas.

## OBJETIVO

Determinar la presencia de estreptococos fecales en la muestra problema, utilizando la técnica del número más probable.

## MATERIAL

- 15 tubos con caldo azida-dextrosa (AD)
- 15 tubos con caldo azida - violeta de etilo (AVE)
- Tubos con 9 ml. de solución para dilución, esterilizados.
- Muestra de agua
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml. esterilizadas
- Mechero
- Asa de siembra
- Portaobjetos
- Reactivos para tinción de Gram
- Microscopio

## **A.- PRUEBA PRESUNTIVA**

### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Prepare las diluciones de la muestra problema.
- 2.- Inocule su serie de tubos con caldo -azida-dextrosa. utilizando 1 ml. de las diluciones adecuadas de la muestra.
- 3.- Incube los tubos inoculados a 35 ° C, durante 24 y 48 horas.

### **RESULTADOS**

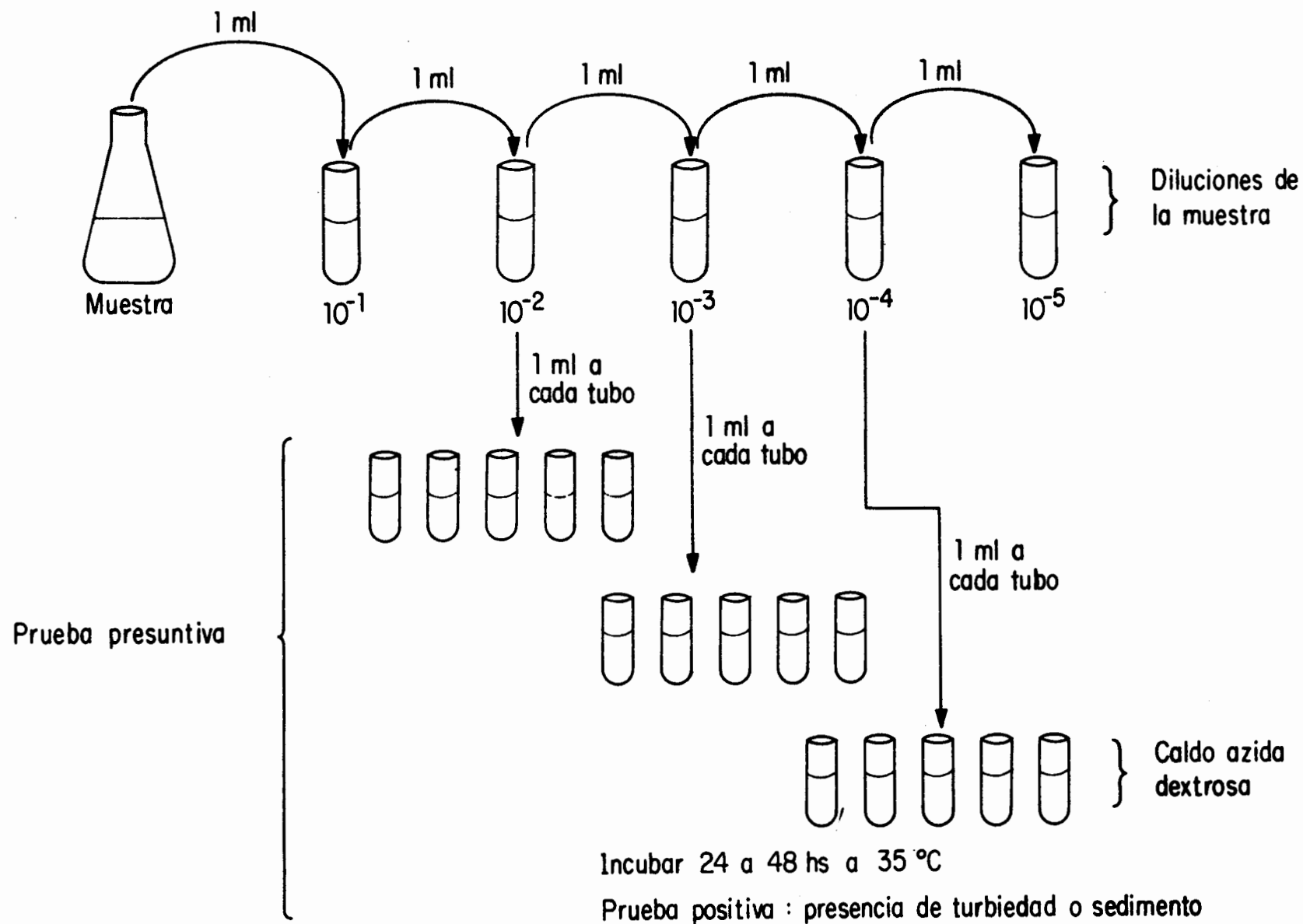
- 1.- Examine cada tubo, después de las 24 horas, para ver si hay presencia de turbiedad y si en el fondo se ha formado un sedimento. Vuelva a observar a las 48 horas los tubos que a las 24 horas dieron negativos.
- 2.- Retenga todos los tubos positivos para la prueba confirmativa.
- 3.- Si al final del período de incubación no presentan los tubos ni turbiedad ni sedimento, la prueba se considera negativa y eso significa que el agua es apta para ser bebida.

## **B.- PRUEBA CONFIRMATIVA**

### **PROCEDIMIENTO**

- 1.- Todos los tubos con caldo-azida-dextrosa que después de las 24 o 48 horas mostraron turbiedad se someten a la prueba confirmativa.
- 2.- Transfiera tres asadas de cada tubo positivo a sendos tubos con medio AVE. El asa deber tener un diámetro mínimo de 5 mm.
- 3.- Incube los tubos inoculados a 35 ° C durante 48 horas.

El procedimiento para determinación de estreptococos fecales se presenta en la figura 13.1



### a) PRUEBA PRESUNTIVA

Fig 13.1 Determinación de estreptococos fecales

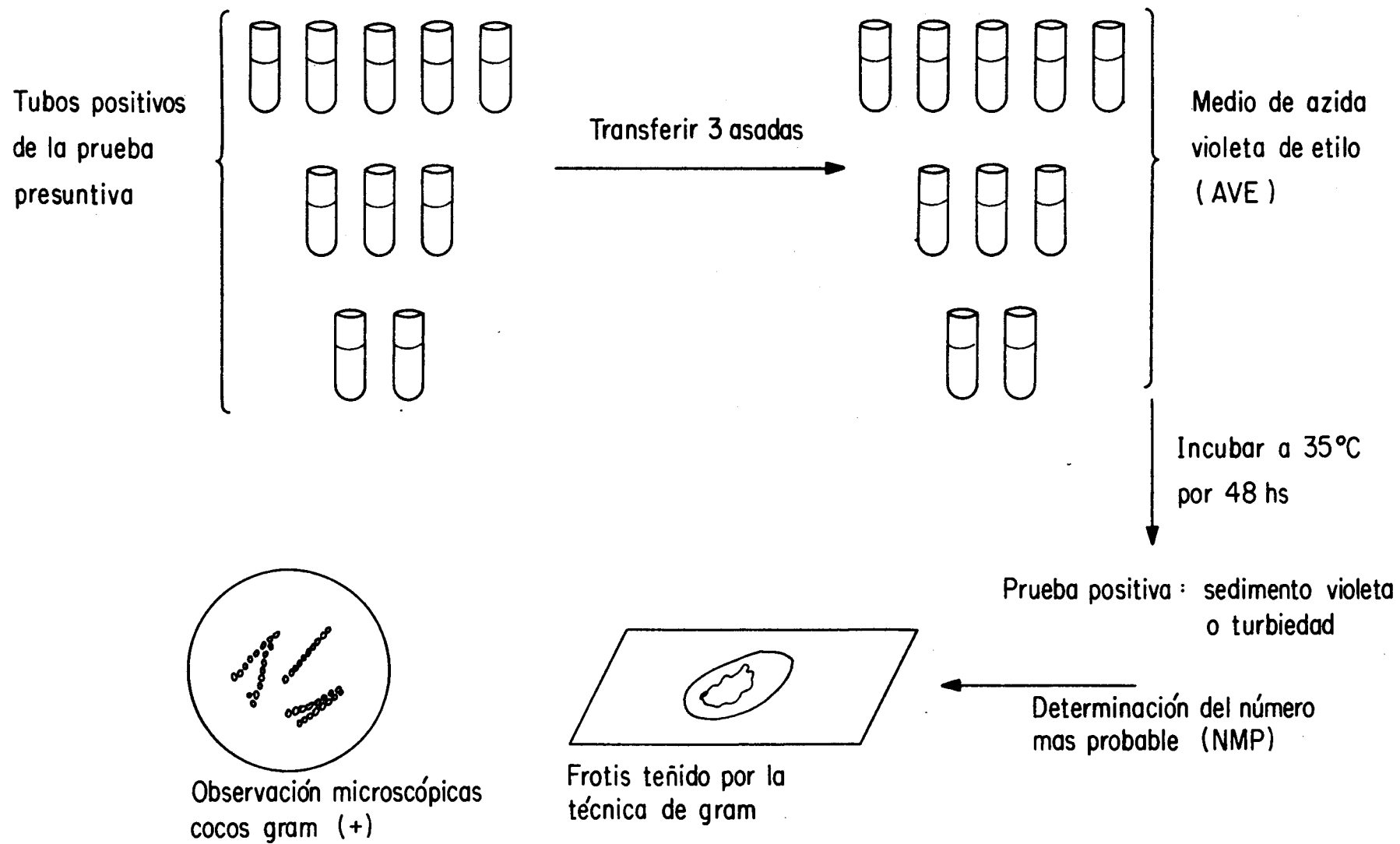


Fig 13.1 b) PRUEBA CONFIRMATIVA

## RESULTADOS

La presencia de *Streptococcus faecalis* queda demostrada por la presencia de un sedimento violeta en el fondo del tubo, u ocasionalmente, por una turbiedad densa.

Compruebe la presencia de microorganismos esféricos que forman cadenas, tomando un poco del sedimento con un asa. Haga un frotis y téñalo usando la técnica de Gram. Consigne todos sus resultados en forma tabular.

Determine el número más probable de estreptococos utilizando las mismas tablas que se usan para coliformes.

## **PRACTICA 14**

### **COLIMETRIA POR EL METODO DE FILTROS DE MEMBRANA**

#### **INTRODUCCION**

El procedimiento de filtros de membrana, para el examen bacteriológico del agua, se originó en Alemania durante la segunda guerra mundial.

Esta técnica consiste en los siguientes pasos:

- 1.- Un disco filtrante estéril se pone en la unidad de filtración.
- 2.- Se hace pasar un volumen de agua por el disco filtrante, las bacterias serán retenidas en la superficie de la membrana.
- 3.- Se quita el disco filtrante y se pone sobre una almohadilla absorbente que previamente se ha saturado con el medio de cultivo apropiado.  
Las almohadillas absorbentes con los discos filtrantes se acomodan en cajas de Petri de tamaño especial, las cuáles se incuban.
- 4.- Después de la incubación, se desarrollarán colonias sobre el disco filtrante en cualquier lugar donde hayan quedado bacterias atrapadas durante el proceso de filtración.

A diferencia de la técnica de tubos múltiples de fermentación, el procedimiento de filtro de membrana permite realizar cuentas directas de coliformes.

Esta técnica tiene muchas ventajas y aplicaciones útiles, algunas de las cuales son:

A) La técnica del filtro de membrana proporciona un medio para mejorar el control de la calidad del agua en las plantas potabilizadoras de agua y en otros laboratorios, puesto que:

- 1) tiene mayor grado de precisión (posibilidad de duplicar los resultados), que la prueba de tubos múltiples de fermentación;
- 2) permite el examen de mayores volúmenes de muestra que la prueba de tubos múltiples, con mayor sensibilidad en la identificación de coliformes, y
- 3) se obtienen resultados definitivos en menor tiempo que con el procedimiento de tubos múltiples.

B) El método de filtro de membrana permite la filtración de las muestras en el campo y el embarque de los filtros al laboratorio en un medio de preservación.

C) Se puede aplicar la técnica de filtro de membrana en casos de desastres o de emergencias como los que se pueden suscitar con roturas en los acueductos y tuberías, cuando es importante disponer en breve tiempo de los resultados del examen, para la pronta aplicación de los tratamientos correctivos.

D) En la actualidad, la prueba de filtros de membrana presenta limitaciones definidas. Hay campos de aplicación, por lo general no asociados con el abastecimiento de agua potable, en los que no se puede aceptar que éste método constituya una alternativa satisfactoria de la técnica de tubos múltiples de fermentación en caldo lauril sulfato de sodio:

1) En aguas con turbiedad producida por algas o por materiales, el taponamiento o recubrimiento de los filtros impide la filtración de volúmenes de muestra suficientemente grandes, para que se pueda obtener una indicación de confianza de la densidad de los coliformes y, asimismo, interfiere con el desarrollo de las colonias características de bacterias coliformes durante la incubación.

2) En aguas con una alta densidad de organismos no coliformes, resulta excesivamente baja la relación de las estimaciones de densidad del filtro membrana a las estimaciones del NMP. Se deben estas discrepancias a las características específicas de los microorganismos de las muestras, a la acción inhibitoria del medio o a peculiaridades del agua en ensayo, tales como la presencia de iones de metales pesados u otras sustancias tóxicas, o a temperaturas naturales elevadas.

E) La modificación de ésta técnica, para filtración en el campo, es particularmente valiosa para el control rutinario y trabajos de campo.

## **OBJETIVO**

Determinar la presencia de organismos coliformes de la muestra problema utilizando el método de filtro de membrana.

## **MATERIAL**

- Aparato para filtración sobre membrana esterilizado
- Filtros de membrana esterilizados
- Cajas de Petri de 50 ó 60 mm de diámetro
- Frasco para muestra
- Pinzas metálicas con la punta lisa
- Microscopio
- Medio MF - Endo
- Bomba de vacío
- Matraz Kitasato

## **PROCEDIMIENTO**

1.- Coloque un disco absorbente en cada caja de Petri y añádale 2.2 ml del medio MF -Endo.

2.- Con unas pinzas coloque sobre el aparato de filtración, previamente esterilizado, la membrana.

3.- Filtre, después de agitar convenientemente la muestra, el volumen adecuado sobre la membrana.

Para la determinación de coliformes en agua potable se utiliza un volumen de 100 ml de muestra.

Para aguas con cuentas bacterianas altas, tales como aguas superficiales, aguas negras, etc. deberá usarse un volumen de muestra menor, según sea el caso, pero los resultados deben de expresarse por 100 ml de muestra, haciendo los cálculos correspondientes.

4.- Cierre la bomba de vacío y retire la membrana colocándola a continuación, con las pinzas, encima del disco absorbente impregnado de medio, dentro de la caja de Petri.

5.- Incube a 35 ° C durante 20 a 22 horas, con la caja en posición normal (invertida).

6.- Efectúe el recuento de las colonias de organismos coliformes.

La figura 14.1 indica gráficamente este procedimiento.

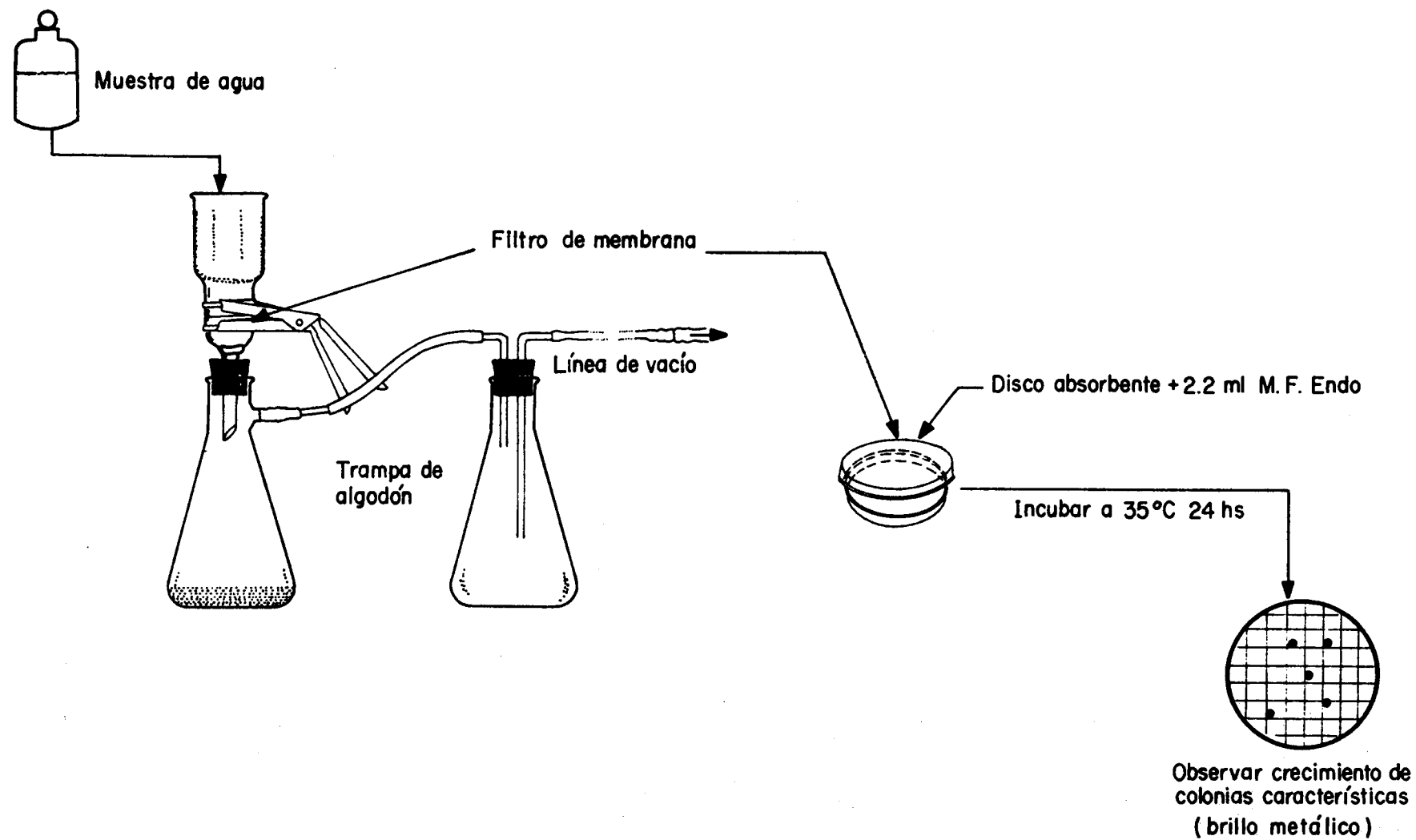


Fig 14.1 Determinación de coliformes por medio de la Técnica de Filtro de Membrana

## RESULTADOS

Se consideran organismos coliformes todos aquellos que producen una colonia oscura (generalmente de color verde púrpura) con brillo metálico. El brillo puede cubrir toda la colonia, sólo el área central o bien toda la superficie. Para observarlo mejor hacer la observación al microscopio.

Consigne sus resultados indicando el número de coliformes en 100 ml.



## INTRODUCCION

El suelo se ha definido como la región de la tierra donde se conjugan la Geología y la Biología y desde un punto de vista funcional debe ser considerado como la capa del planeta que provee el sustrato que hace posible la vida vegetal y animal.

- a) Partículas minerales
- b) Residuos orgánicos
- c) Agua
- d) Gases

Pocos ambientes tienen tanta variedad de microorganismos, como el suelo. La diversidad de la microbiota representa un obstáculo para calcular la población de una muestra de suelo.

Para este fin se utilizan técnicas tales como la siembra en medios de cultivo apropiados, cuentas microscópicas directas o incluso el análisis del lixiviado producto de desechos sólidos dispuestos en el suelo.

En general podemos decir que ningún método por sí solo puede revelar la población microbiana total absoluta.

Los desechos sólidos causan problemas en el medio ambiente principalmente en lo referente a los siguientes aspectos:

- 1.- Salud pública :- vectores (ratas, moscas, etc.)  
                              - olores
- 2.- Contaminación de aguas subterráneas
- 3.- Contaminación de aguas superficiales.

## TIPOS DE DESECHOS

- Urbanos
- Comerciales
- Industriales
- Domésticos

Algunos de los métodos utilizados para la disposición final de los desechos sólidos se refieren a:

- Relleno sanitario
- Tiradero
- Océano
- Incineración
- Pirólisis
- Pulverización y dispersión en sitio de disposición

El relleno sanitario precisamente aprovecha las propiedades del suelo tales como filtrabilidad y presencia de microorganismos, que degradan los desechos sólidos dispuestos en él.

Es una de las técnicas más convenientes para la disposición de dichos desechos y presenta la gran ventaja de que, comparativamente con las otras técnicas, los costos se reducen apreciablemente y presenta condiciones ideales desde el punto de vista de la salud pública.

## OBJETIVOS

Simular las condiciones existentes en un relleno sanitario, después de un período, efectuar un análisis del lixiviado obtenido, cuantificando los microorganismos presentes. Filtrar el lixiviado haciéndolo pasar por diferentes medios estableciendo la eficiencia remocional de microorganismos, con respecto a las condiciones iniciales y comparando los resultados obtenidos por cada uno de ellos (NMP y cuenta en placa).

## PROCEDIMIENTO

1.- Con una muestra de basura aproximado de 0.033 metros cúbicos dispuesta en un recipiente de plástico y compactado adecuadamente para llegar a un peso aproximado de 16.5 Kg se prepara el modelo de acuerdo a la figura 15.1.

2.- El modelo se regará diariamente con un volumen de agua aproximado de 332 ml para simular las condiciones reales de precipitación existentes en un relleno sanitario. Esto se hará durante un período aproximado de 60 días.

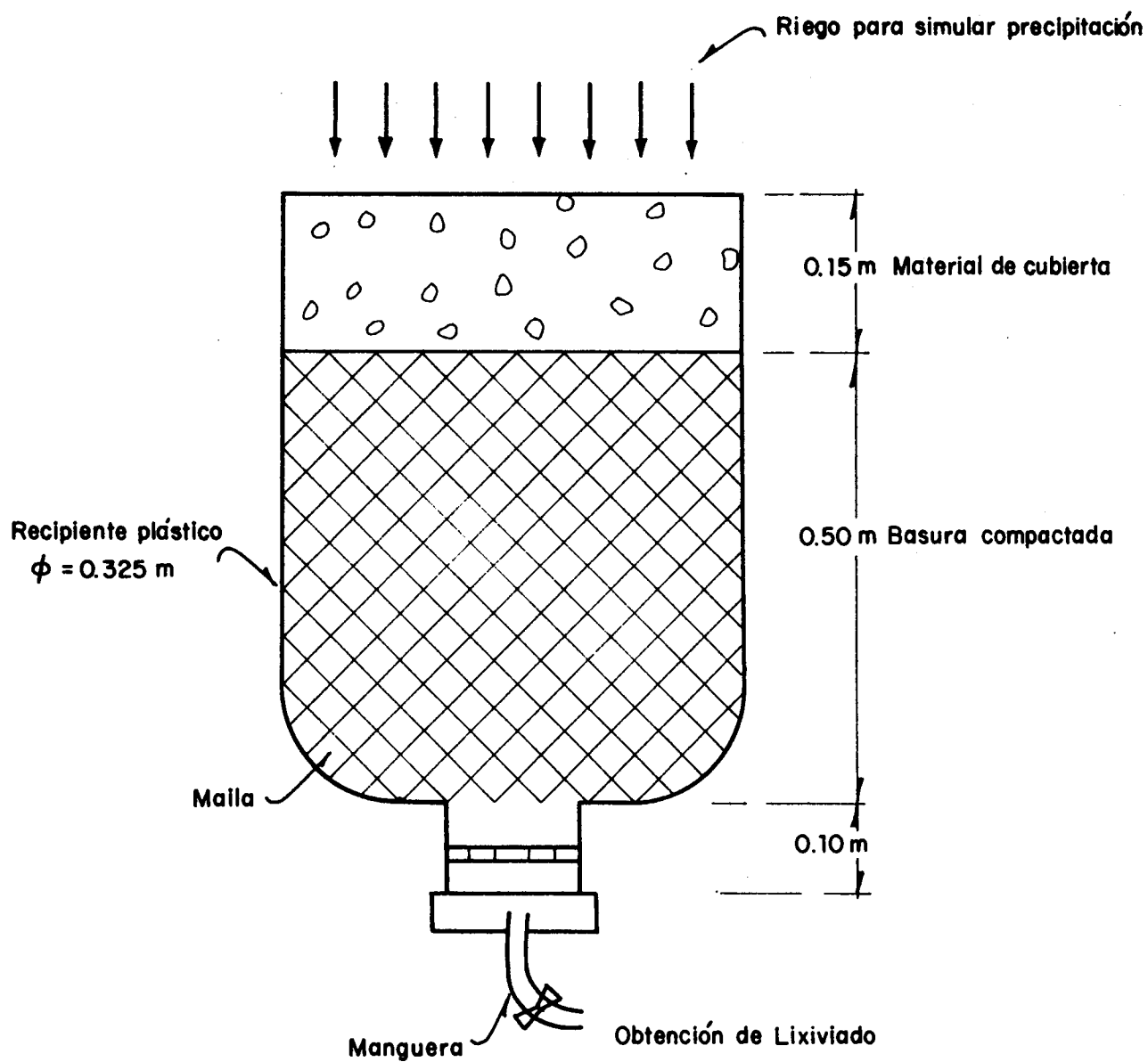


Fig 15.1 Modelo de simulación de un relleno sanitario

3.- El lixiviado obtenido a través de este proceso se irá desechando. El lixiviado final, después del periodo será utilizado para el análisis y los pasos siguientes.

4.- De éste lixiviado se harán pasar aproximadamente 250 ml. por tres recipientes conteniendo cada uno, un medio filtrante diferente a saber: arena, arena -tierra negra (50% - 50%) y tierra negra. Ver figura 15.2

## RESULTADOS

Tanto para la concentración inicial como para las muestras provenientes de filtrar por los diferentes medios a saber C1, C2 y C3, se determina:

- 1.- Número más probable de coliformes (NMP).
- 2.- Cuenta en placa.
- 3.- DBO de las muestras.

Las determinaciones anteriores se efectuaran siguiendo el esquema 15.3 y se reportará utilizando el formato de la tabla 15.1

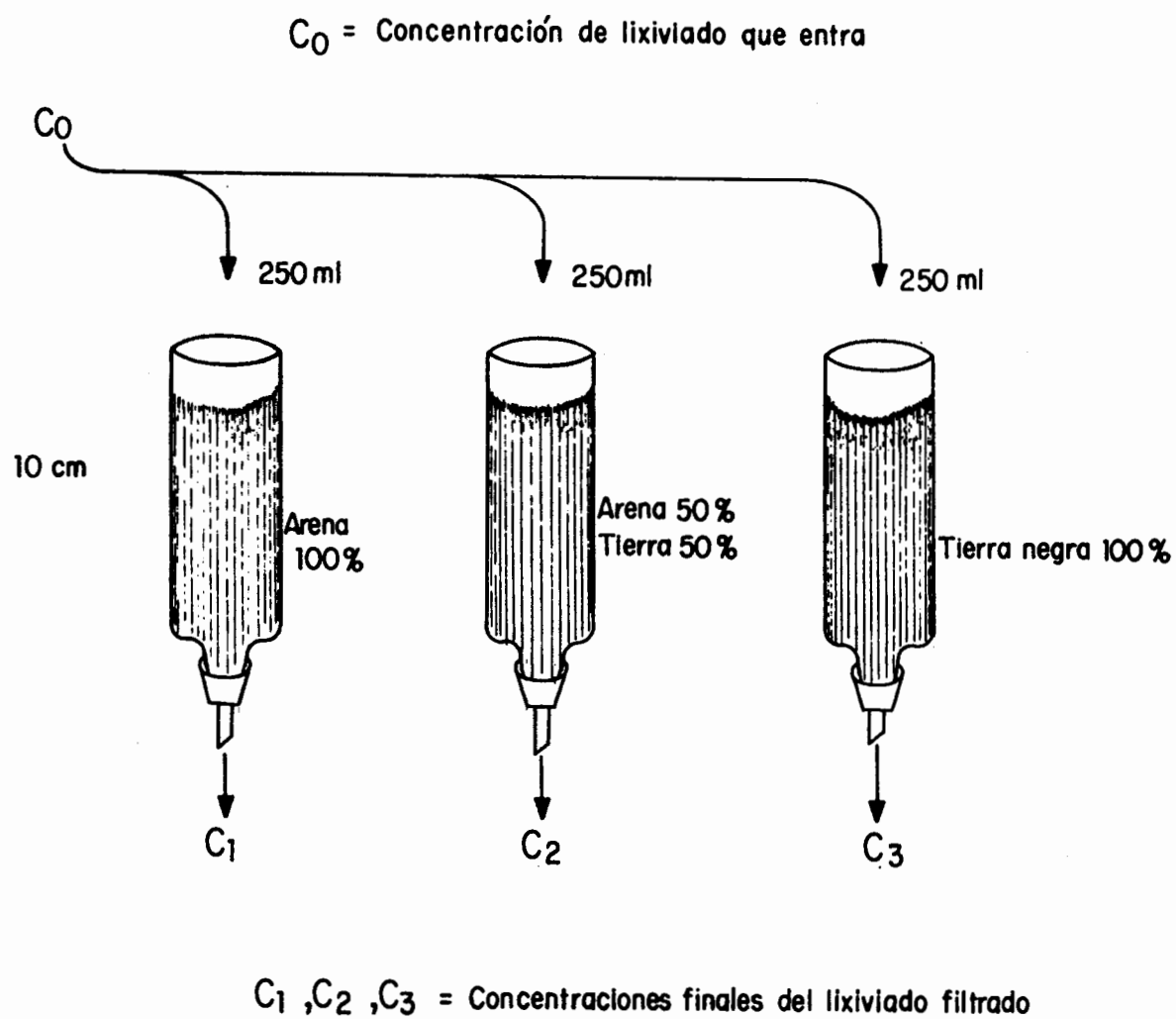


Fig 15.2 Columnas de filtración

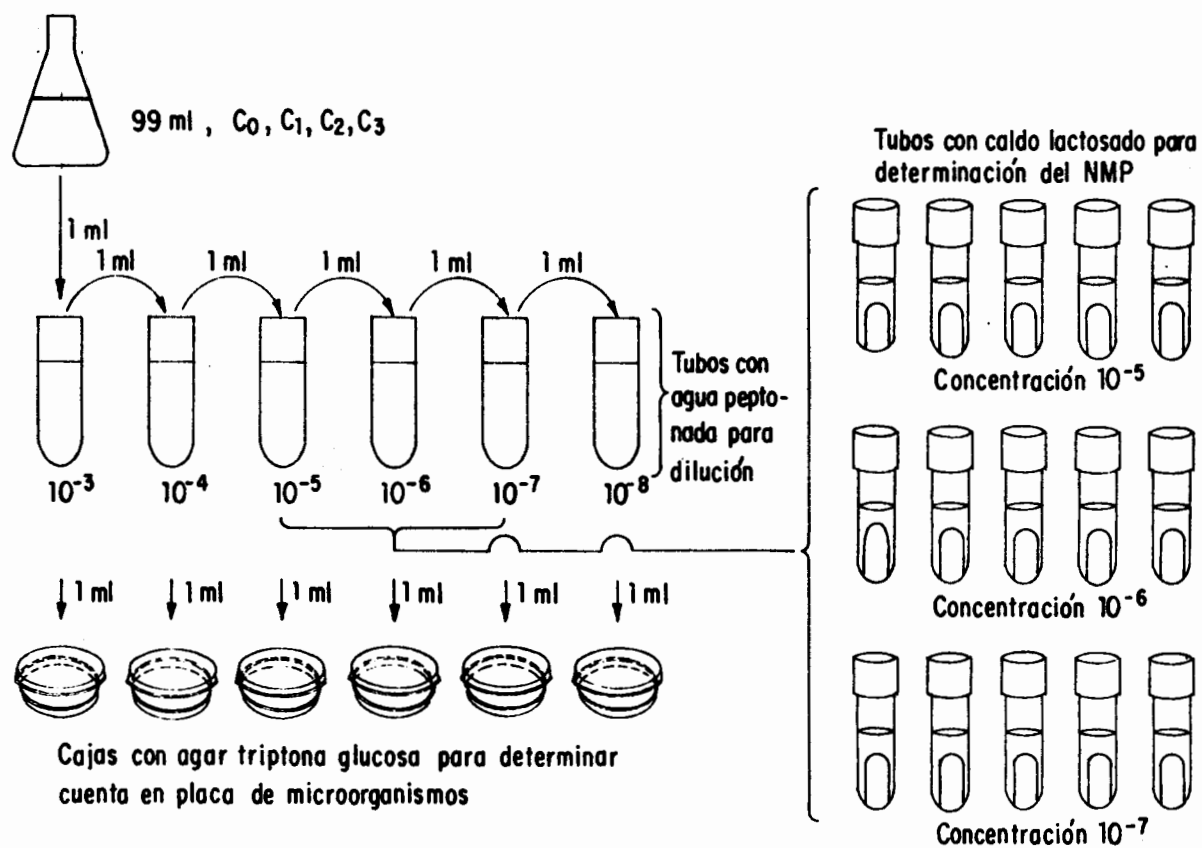


Fig 15.3 Procedimiento para análisis de lixiviados ( $C_0$ ) y filtrados ( $C_1$  ,  $C_2$  y  $C_3$ )

Tabla 15.1

| <div>Dilución</div> <div>Concentración</div> | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | Cuenta en placa | NMP/100ml Coliformes |
|----------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------------|----------------------|
| $C_0$                                        |           |           |           |           |           |           |           |                 |                      |
| $C_1$                                        |           |           |           |           |           |           |           |                 |                      |
| $C_2$                                        |           |           |           |           |           |           |           |                 |                      |
| $C_3$                                        |           |           |           |           |           |           |           |                 |                      |

**PARTE 4**

**PREPARACION DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO**

## PREPARACION DE MEDIOS

### AGAR - ALMIDON

|         |        |
|---------|--------|
| Agar    | 15.0 g |
| Almidón | 10.0 g |

Disolver 25 g en un litro de agua destilada. Calentar suavemente hasta disolución completa, agitar de vez en cuando. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión durante 15 minutos.

### AGAR ENDO

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Peptona                           | 10.0 g |
| Lactosa                           | 10.0 g |
| Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) | 3.5 g  |
| Agar                              | 15.0 g |
| Fucsina básica                    | 0.5 g  |
| Sulfito de sodio                  | 2.5 g  |

Para rehidratar el medio suspender 41.5 g en un litro de agua destilada y calentar hasta disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 15 lb. de presión ( $121^{\circ}C$ ).

### AGAR EOSINA AZUL DE METILENO

|                                   |         |
|-----------------------------------|---------|
| Peptona                           | 10.0 g  |
| Lactosa                           | 5.0 g   |
| Sacarosa                          | 5.0 g   |
| Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ ) | 2.0 g   |
| Agar                              | 13.5 g  |
| Eosina Y                          | 0.4 g   |
| Azul de metileno                  | 0.065 g |

Para rehidratar el medio, suspender 36 g en 1000 ml de agua destilada. Calentar hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 lb de presión ( $121^{\circ}C$ ).

### AGAR EXTRACTO, GLUCOSA Y TRIPTICASEINA (AGAR TRIPTONA GLUCOSA)

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Peptona de caseina       | 5.0 g  |
| Extracto de carne de res | 3.0 g  |
| Dextrosa                 | 1.0 g  |
| Agar                     | 15.0 g |

Suspender 24 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Disolver al calor, hervir durante un minuto. Esterilizar a  $121^{\circ}C$  (15 lb. de presión) durante 15 minutos.

#### AGAR GELATINA

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Gelatina nutritiva | 128.0 g |
| Agar               | 15.0 g  |

Disolver 143.0 g del polvo en un litro de agua destilada. Calentar suavemente, agitando a menudo, hasta disolver completamente. Esterilizar durante 15 minutos a 15 lb. de presión en autoclave.

#### AGAR - LECHE DESCREMADA

|                  |        |
|------------------|--------|
| Leche descremada | 10.0 g |
| Agar             | 15.0 g |

Disolver 25 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

#### AGAR NUTRITIVO

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Extracto de carne   | 3.0 g  |
| Peptona de gelatina | 5.0 g  |
| Agar                | 15.0 g |

Se suspenden 23.0 g del polvo en 1 lt. de agua destilada. Mézclese bien. Se calienta suavemente agitando de cuando en cuando y se hierve 1 ó 2 minutos hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 ° C (15 lb. de presión) durante 15 minutos.

#### AGAR SABOURAUD

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Neopeptona o peptona | 10.0 g |
| Dextrosa             | 40.0 g |
| Agar                 | 15.0 g |

Disolver 65 g en un litro de agua destilada. Calentar lentamente hasta ebullición. Esterilizar durante 15 minutos a 15 lb. de presión. (121 ° C).

#### AGUA PEPTONADA (AGUA DE DILUCION)

Se disuelve un gramo de peptona en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos.

#### CALDO AZIDA VIOLETA DE ETILO (EVA)

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| Tryptona                            | 20.0 g    |
| Glucosa                             | 5.0 g     |
| Cloruro de sodio                    | 5.0 g     |
| Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )   | 2.7 g     |
| Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) | 2.7 g     |
| Azida de sodio                      | 0.4 g     |
| Violeta de etilo                    | 0.00083 g |

Disolver 35.8 g en 1 lt. de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión durante 15 minutos.

#### CALDO BILIS LACTOSA VERDE BRILLANTE

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| Bilis de buey deshidratada | 20.0 g  |
| Lactosa                    | 10.0 g  |
| Peptona de gelatina        | 10.0 g  |
| Verde brillante            | 13.3 mg |

Disolver 40 g de polvo en un litro de agua destilada. Esterilice a 121 ° C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

#### CALDO ESCHERICHIA COLI

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Triptosa                            | 20.0 g |
| Lactosa                             | 5.0 g  |
| Sales de bilis                      | 1.5 g  |
| Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )   | 4.0 g  |
| Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) | 1.5 g  |
| Cloruro de sodio                    | 5.0 g  |

Para rehidratar el medio suspender 37 g en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 lb de presión.

#### CALDO AZIDA DEXTROSA

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Extracto de carne | 4.5 g  |
| Tryptona          | 15.0 g |
| Dextrosa          | 5.0 g  |
| Cloruro de sodio  | 7.5 g  |
| Azida de sodio    | 0.2 g  |

Para rehidratar el medio disolver 34.7 g en 1 lt. de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 15 lb. de presión.

**CALDO LAURIL SULFATO DE SODIO  
(CALDO LAURIL TRIPTOSA)**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| Lauril sulfato de sodio             | 0.1 g  |
| Peptona de caseina                  | 20.0 g |
| Lactosa                             | 5.0 g  |
| Fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ )   | 2.75 g |
| Fosfato monopotásico ( $KH_2PO_4$ ) | 2.75 g |
| Cloruro de sodio                    | 5.0 g  |

Se suspenden 35.6 g del polvo deshidratado en un litro de agua destilada. Calentar si es necesario hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión durante 15 minutos.

**CALDO NUTRITIVO**

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| Peptona de gelatina      | 5.0 g |
| Extracto de carne de res | 3.0 g |

Se disuelven 8 g del polvo en 1 lt. de agua destilada. Si es necesario caliéntese. Esterilícese a 121 °C (15 lb. de presión) durante 15 minutos.

**CALDO PEPTONADO**

|                                   |       |
|-----------------------------------|-------|
| Peptona                           | 5.0 g |
| Dextrosa                          | 5.0 g |
| Fosfato dipotasico ( $K_2HPO_4$ ) | 5.0 g |

Disolver 15 g en un litro de agua destilada. Esterilizar el medio 15 minutos a 15 libras de presión.

**CALDO TRIPTOFANO**

Disolver 10 g de triptona en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave 15 minutos a 15 lb. de presión.

**GELATINA NUTRITIVA**

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Caldo nutritivo | 8.0 g   |
| Gelatina        | 120.0 g |

Disolver 128 g de polvo en un litro de agua destilada. Calentar suavemente, agitando, hasta completa disolución. Esterilizar en autoclave a 15 lb. de presión, durante 15 minutos.

#### MEDIO DE CITRATO DE SIMMONS

|                                                                      |        |
|----------------------------------------------------------------------|--------|
| Fosfato diácido de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ ) | 1.0 g  |
| Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )                      | 1.0 g  |
| Cloruro de sodio                                                     | 5.0 g  |
| Citrato de sodio                                                     | 2.0 g  |
| Sulfato de magnesio                                                  | 0.2 g  |
| Agar                                                                 | 15.0 g |
| Azul de Bromotimol                                                   | 0.08 g |

Se suspenden 24.2 g de polvo en un litro de agua destilada.  
Esterilizar en autoclave 15 minutos durante 15 lb. de presión.

#### MEDIO MF-ENDO

|                                                   |         |
|---------------------------------------------------|---------|
| Extracto de levadura                              | 1.5 g   |
| Casitona                                          | 5.0 g   |
| Tiopeptona                                        | 5.0 g   |
| Triptosa                                          | 10.0 g  |
| Lactosa                                           | 12.5 g  |
| Desoxicolato de sodio                             | 0.1 g   |
| Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )   | 4.375 g |
| Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) | 1.375 g |
| Cloruro de sodio                                  | 5.0 g   |
| Lauril sulfato de sodio                           | 0.05 g  |
| Sulfato de sodio                                  | 2.1 g   |
| Fucsina básica                                    | 1.05 g  |

Para rehidratar el medio, disuelva 48 g en 1 lt. de agua destilada que contenga 20 ml. de etanol. Calientese hasta ebullición. Preparar en el momento de la práctica.

## PREPARACION DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

### ALCOHOL-ACETONA

|                |         |
|----------------|---------|
| Alcohol de 96° | 700 ml. |
| acetona        | 300 ml. |

Mezclar.

### MEZCLA CROMICA

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| Dicromato de potasio        | 65.0 g        |
| Agua                        | 35.0 ml       |
| Acido sulfúrico concentrado | cbp 1000.0 ml |

Disolver el dicromato de potasio en agua, calentando; enfriar y agregar lentamente ácido sulfúrico concentrado hasta completar a 1000 ml.

### REACTIVO DE EHRLICH

|                                       |         |
|---------------------------------------|---------|
| Para-aminobenzaldehído                | 5.0 g   |
| Alcohol isoamílico (o amílico normal) | 75.0 g  |
| Acido clorhídrico concentrado         | 25.0 ml |

Disolver el para-aminobenzaldehído en el alcohol y agregar el ácido clorhídrico; el reactivo deber quedar de color amarillo.

### SOLUCION DE ALFA - NAFTOL

|                                                            |           |
|------------------------------------------------------------|-----------|
| Alfa naftol purificado,<br>(punto de fusión 92.5° C o más) | 5.0 g     |
| Etanol absoluto                                            | 100.0 ml. |

Disolver el alfa - naftol en el etanol. Esta solución debe prepararse el mismo día que se emplee.

### SOLUCION DE AZUL DE METILENO

|                  |          |
|------------------|----------|
| Azul de metileno | 0.3 g    |
| Etanol (96°)     | 30.0 ml  |
| Agua destilada   | 100.0 ml |

Disolver el azul de metileno en el alcohol; agregar en el agua destilada y filtrar a través de papel.

#### **SOLUCION DE CLORURO MERCURICO**

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Cloruro mercúrico | 15.0 g   |
| Acido clorhídrico | 20.0 ml  |
| Agua destilada    | 250.0 ml |

Disolver el cloruro mercúrico en el agua destilada y luego agregar el ácido clorhídrico, mezclando bien.

#### **SOLUCION DE FUCSINA FENICADA O DE ZIEHL - NEELSEN**

|                |         |
|----------------|---------|
| Fucsina básica | 0.3 g   |
| Alcohol (96 °) | 10.0 ml |
| Fenol          | 5.0 g   |
| Agua destilada | 95.0 ml |

Disolver la fucsina en el alcohol y el fenol en el agua destilada; mezclar las dos soluciones después.

#### **HIDROXIDO DE POTASIO (Solución al 30%)**

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Hidróxido de potasio | 30.0 g   |
| Agua destilada       | 100.0 ml |

Disolver el hidróxido de potasio en el agua destilada.

#### **SOLUCION DE ROJO DE METILO**

|                |          |
|----------------|----------|
| Rojo de metilo | 0.1 g    |
| Etanol 96 °    | 300.0 ml |
| Agua destilada | 200.0 ml |

Disolver el colorante en el alcohol y agregar el agua destilada.

#### **SOLUCION DE SAFRANINA**

|                |          |
|----------------|----------|
| Safranina      | 0.25 g   |
| Alcohol 95 %   | 10.0 ml  |
| Agua destilada | 100.0 ml |

Disolver la safranina en el alcohol filtrar a través de papel filtro.

## SOLUCION DE VIOLETA CRISTAL - OXALATO DE AMONIO DE HUCKER

### Solución A:

|                 |         |
|-----------------|---------|
| Violeta cristal | 2.0 g   |
| Alcohol 96 °    | 20.0 ml |

Mezclar.

### Solución B :

|                                                                                                  |         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Oxalato de amonio ( $\text{NH}_4$ ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O | 0.8 g   |
| Agua destilada                                                                                   | 80.0 ml |

Mezclar las soluciones A y B .

## SOLUCION DE YODO DE GRAM (LUGOL)

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Yodo              | 1.0 g    |
| Yoduro de potasio | 2.0 g    |
| Agua destilada    | 300.0 ml |

Disolver el yoduro de potasio en una pequeña cantidad de agua; agregar a esta solución el yodo poco a poco y una vez disuelta completar hasta los 300 ml.

## SOLUCION SALINA

|                  |          |
|------------------|----------|
| Cloruro de sodio | 0.085 g  |
| Agua destilada   | 100.0 ml |

Disolver el cloruro de sodio en el agua.

## TIOSULFATO DE SODIO (Solución al 10%)

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Tiosulfato de sodio | 10.0 g   |
| Agua destilada      | 100.0 ml |

Disolver el tiosulfato de sodio en el agua destilada, mezclar bien.

## **BIBLIOGRAFIA**

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, " Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater ". 15 ed. 1980.

Blair, John E. et al " Manual of Clinical Microbiology ". American Society for Microbiology. Bethesda, Md. 1970.

Bradshaw, Jack L.Dr. " Microbiología de Laboratorio ". Ed. El Manual Moderno. México, 1976.

Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons " Bergey's Manual of Determinative Bacteriology " 8a. ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.

DIFCO Laboratories Inc. " DIFCO Manual de Bacteriología " 9a. ed. Madrid. 1978.

Gillies, R.R. and T.C. Dodds. " Bacteriology Illustrated " 3a.ed Churchill Livingstone. 1973.

Hach, Co. Analytical Procedure " Coliform Procedures " 1983.

Hendricks W. Charles "Evaluation of the Microbiology Standards for Drinking Water ". U.S. Environmental Protection Agency, USA 1978.

Millipore Corporation, " Water Microbiology Laboratory and Field Procedures. 1986.

Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. " Procedimientos Simplificados para el Examen de Aguas. Publicación Científica # 369. 1978.

Pelczar, Michael and E.C. Chan, " Laboratory Exercises " in Microbiology " 4a. ed. Ed. Mc. Graw-Hill. USA. 1977.

Pelczar, Michael et al. " Microbiología ". 2a ed. Ed. Mc. Graw-Hill. USA. 1988.

2Rohde, Paul. " BBL Manual of Products and Laboratory Procedures " 5a. ed. BBL Division of Becton, Dickinson and Company. USA. 1968.

U. S. Environmental Protection Agency " Water Quality Studies. Training Manual " Water Program Operations. 1974.

F/DEPFI/D-85/1990/EJ.2



703043