

MICROBIOLOGIA SANITARIA

(Manual de Prácticas)

Gabriela Moeller Chávez
Catalina Ferat Toscano

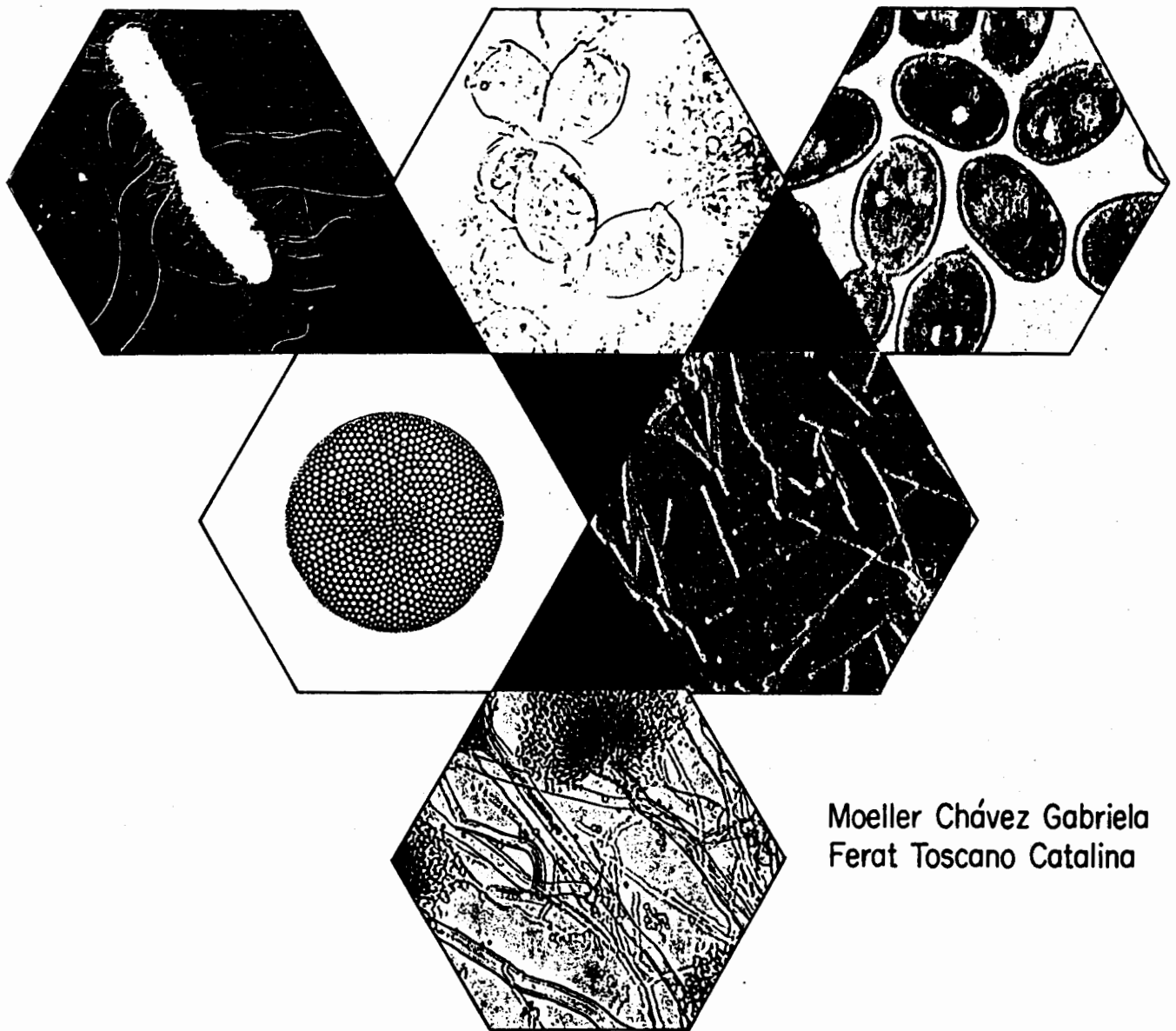
D-85



CEPFI

DEPFI

MANUAL DE PRACTICAS MICROBIOLOGIA SANITARIA



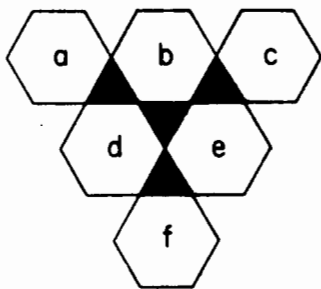
Moeller Chávez Gabriela
Ferat Toscano Catalina

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

G(2)-11407

1a.edición 1990.
2a.edición 1991.

D.R.© División de Estudios de Posgrado,
Facultad de Ingeniería.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Impreso y Hecho en México.
ISBN 968-36-1974-6



- 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

CONTENIDO

	Págs.
INTRODUCCION.....	IX
PARTE 1	
Instrucciones generales en el laboratorio.....	1
PARTE 2	
Técnicas básicas en Microbiología	
1. Lavado y esterilización de material de laboratorio.....	9
2. Preparación de medios de cultivo.....	15
3. Presencia de microorganismos en el medio ambiente.....	21
4. Microorganismos en cultivo puros. Siembra en medios líquidos y sólidos. Aislamiento de microorganismos.....	25
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.....	67
9. Análisis bacteriológico del agua. Muestreo.....	71
10. Análisis bacteriológico del agua. Cuenta en placa.....	79
11. Análisis bacteriológico del agua. Determinación de coliformes. Técnica de los tubos múltiples de fermentación.....	83
12. Análisis bacteriológico del agua. Determinación de coliformes fecales. Pruebas diferenciales. Reacciones IMViC	97
13. Determinación de otros índices de contaminación. Estreptococos fecales. Determinación del número más probable.....	105
14. Colimetría por el Método de Filtro de Membrana.....	113
15. Análisis de lixiviados y comportamiento de microorganismos en diferentes tipos de suelos.....	117
PARTE 4	
Preparación de reactivos y medios de cultivo.	
Preparación de medios de cultivo.....	127
Preparación de soluciones y reactivos.....	133
Bibliografía.....	137

INTRODUCCION

La elaboración del presente manual de prácticas responde a una necesidad que han manifestado los propios alumnos que se inscriben a la Maestría en Ingeniería debido a que, en su mayoría, dichos estudiantes egresan de carreras de Ingeniería y tienen poca o nula experiencia en el trabajo de laboratorio en general y, en este caso, de Microbiología Sanitaria.

Por lo tanto, el contenido de este trabajo abarca desde los conceptos fundamentales de la materia hasta las técnicas específicas de aplicación en el área de la Ingeniería Ambiental.

El temario del laboratorio comprende 15 prácticas que se desarrollan durante un semestre de acuerdo a 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, acerca de las técnicas básicas de Microbiología; la tercera, en relación con las técnicas específicas aplicadas a la Ingeniería Ambiental y la cuarta, un apéndice de 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 más 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 estos últimos.

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.

ADVERTENCIA

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

PARTE 1

INSTRUCCIONES GENERALES EN

EL LABORATORIO

REGLAMENTO DEL LABORATORIO DE INGENIERIA AMBIENTAL DE LA DEPFI

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. Asimismo, debe evitarse la proximidad del mechero a sustancias inflamables tales como alcohol, éter, parafina, etcétera.
- 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 del que fue entregado.
- 9.- Evitar manipular equipo del cual se desconoce su operación así como, también, el que no se esté usando.
- 10.- Observar las medidas de seguridad correspondientes a los diferentes laboratorios.

INFORMACION GENERAL ACERCA DEL LABORATORIO

Para la práctica es obligatorio usar bata blanca pues, de lo contrario, no se permitirá realizar áquella.

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, a través de un vale, el equipo y material de laboratorio necesario para efectuar las prácticas. Una vez finalizadas éstas, se deberá regresar el 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.- Lavarlos con agua simple.
- 2.- Lavarlos 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 QUE EL TRABAJAR CON MICROORGANISMOS IMPLICA UN RIESGO PARA LA SALUD, POR LO QUE HAY QUE TENER ESTRUCTAS MEDIDAS DE HIGIENE Y SEGURIDAD, Y SE DEBEN 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 los cuales dependen de la naturaleza física del material que se va a esterilizar y del uso que se le piensa dar. Entre los métodos más comunes se encuentran:

-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. La esterilización se consigue al suspender el objeto en la flama de un mechero.

-Ebullición:

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

-Esterilización por vapor:

El vapor a presión esteriliza por coagulación de las proteínas debido a que se alcanzan temperaturas superiores a las logradas por ebullición.

El aparato de laboratorio diseñado para esterilizar por este método se llama autoclave y 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 dado que si hay aire presente se obtendrá una temperatura inferior.

Generalmente se opera a una presión de 15 lb/pulg² (121 C°). El tiempo de operación depende de la naturaleza del material por esterilizar, del tipo de recipiente y del volumen.

La esterilización por vapor es empleada en medios de cultivo, soluciones, cantidades medidas de agua en tubos o botellas, material de cristalería, etcétera.

-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.

Tenga precaución al efectuar el procedimiento, 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 / pulg²).
- d) Apague el aparato de esterilización, deje enfriar el material y guárdelo 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 cerrarla.
- 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.

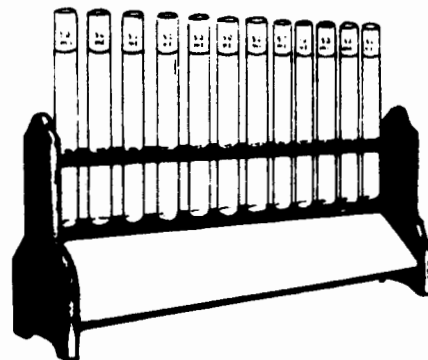
La figura 1 presenta el equipo de laboratorio más comúnmente empleado en Microbiología.



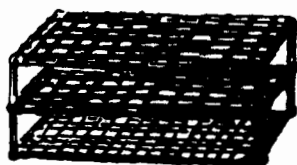
TUBO DE ENSAYE CON
TAPON DE ROSCA



CASA DE PETRI



TUBOS DE ENSAYE Y GRADILLA



GRADILLA PARA TUBOS
DE ENSAYE



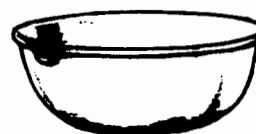
VASO DE
PRECIPITADO



MATRAZ
ERLENMEYER



ASA DE INOCULACION



CAPSULA DE EVAPORACION
O DE PORCELANA



MATRAZ
AFORADO



PROBETA
GRADUADA



MORTERO Y MANO
O PISTILO



VIDRIO DE RELOJ



AGITADOR

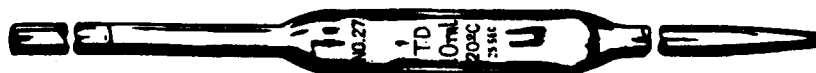


LUPA

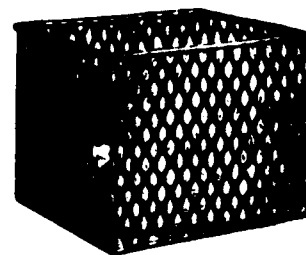
Fig 1 EQUIPO MAS UTILIZADO EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA



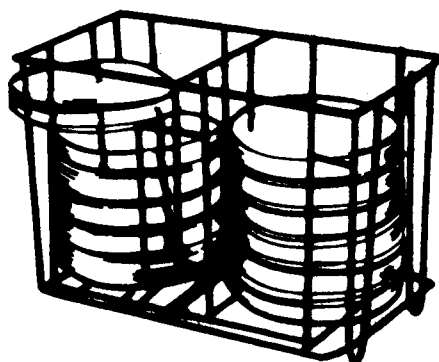
PIPETA GRADUADA O DE MOHR



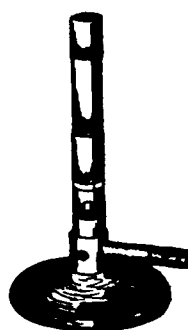
PIPETA VOLUMETRICA



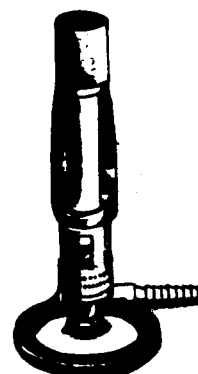
CANASTILLA PARA
TUBOS DE ENSAYE



CANASTILLA PARA CAJAS DE PETRI



MECHERO
DE BUNSEN



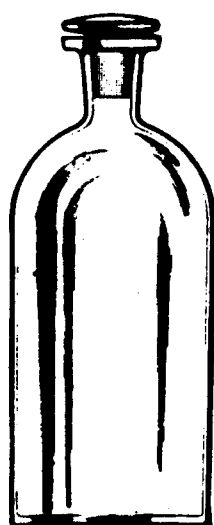
MECHERO FISHER
(Para alta temperatura)



FRASCO
GOTERO



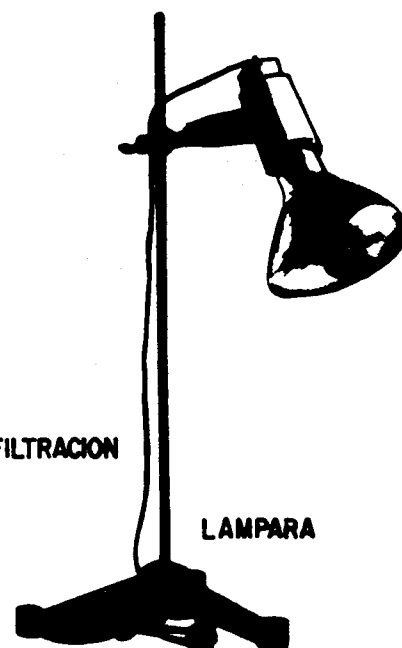
PIPETERO



FRASCO PARA MUESTRA
DE AGUA

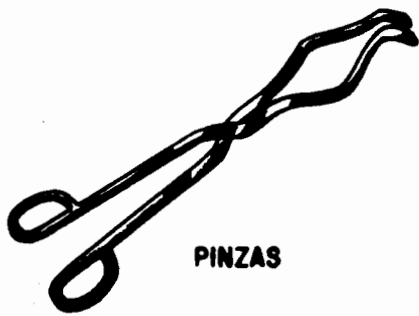


EMBUDO PARA FILTRACION
Y SOPORTE

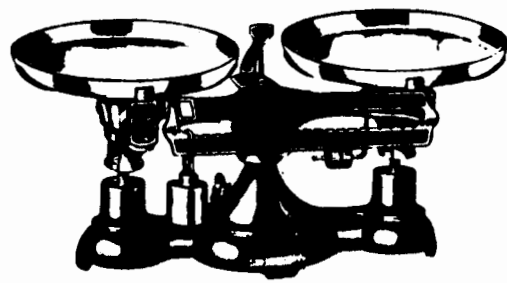


LAMPARA

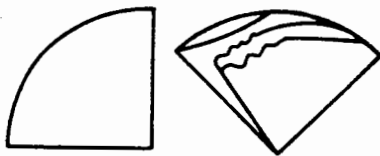
Fig 1 CONTINUACION



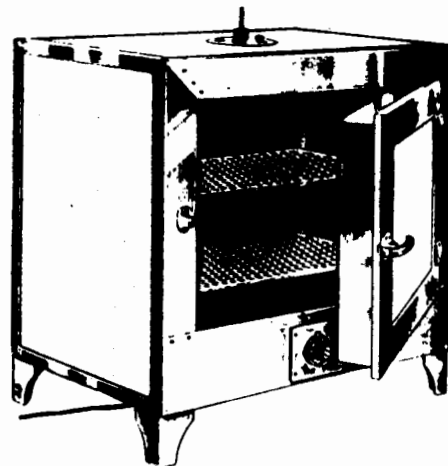
PINZAS



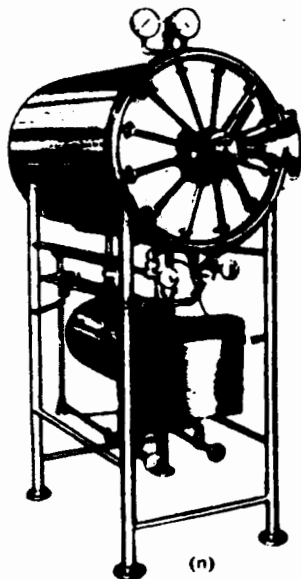
BALANZA GRANATARIA



PAPEL FILTRO



ESTERILIZADOR DE AIRE CALIENTE



AUTOCLAVE

INCUBADORA

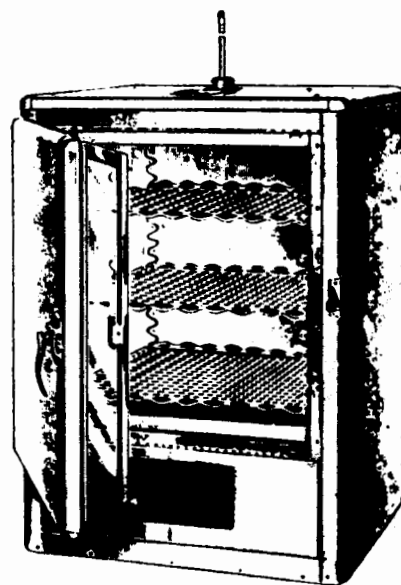


Fig 1 CONTINUACION

PRACTICA 2

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCION

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

Para cultivar a 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
- sales minerales (sodio, potasio, calcio, magnesio) en cantidades pequeñas.

Tanto los microorganismos como las plantas necesitan que estos nutrientes estén en solución para poderlos asimilar. Por ello, se debe seleccionar el medio de cultivo de tal manera que contenga los elementos indispensables 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 dividen 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 y el 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, 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 y posteriormente, se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 lb /pulgada² 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 medio, 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 estos microorganismos puede ser tanto en forma como en estructura celular, movilidad, tamaño, etcétera.

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 forma:
- 4.1.- Pesar 1.0 g de tierra y depositarlo en una caja de Petri. Vaciar sobre ésta 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 ésta el agar líquido y mezclar perfectamente con movimientos rotatorios. Dejar solidificar.
- 5.- Incubar todas las cajas de Petri a temperatura ambiente hasta la próxima 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 colonias presentes en cuanto a su apariencia y características enfatizando, principalmente, en las que siguen a continuación:
 - 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

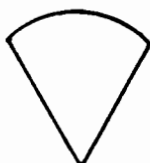


Convexa



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 tabla siguiente.

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 (contienen únicamente un solo tipo de microorganismo).

OBJETIVOS

Conocer los diferentes tipos de siembra empleados 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*

PROCEDIMIENTO

A) GENERALIDADES

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 limpiarse perfectamente (agua y jabón). Después, se colocarán dos mecheros encendidos que 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, etcétera.
- 2.- Con una pipeta estéril se transfiere 1 ml de la muestra problema al tubo rotulado como 1/10. Esta operación se efectúa 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 tapón , el labio del tubo se debe flamear.
- 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 empleado para llevar a cabo las diluciones.

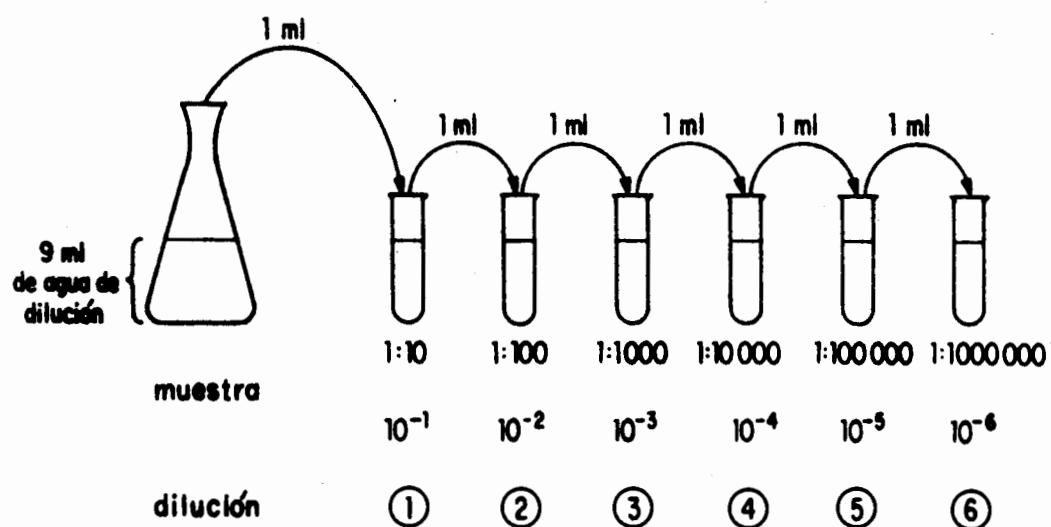


Fig 4.1 Preparación de diluciones de la muestra

- TIPOS DE SIEMBRAS EN MEDIOS SOLIDOS

Para hacer las siembras bacteriológicas, el medio de cultivo sólido de los matraces, se funde colocándolo en baño maría. 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, 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 efectúa 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 estrías. Para el primer caso, el medio se deja enfriar con el tubo en posición vertical; para el segundo, se inclina el tubo en posición a 45°.

Existen dos tipos de siembra:

- a) en placa y
- b) en tubo de cultivo.

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

a) SIEMBRA EN PLACA

Se conoce como siembra en placa a la que se hace en una caja de Petri con el medio de cultivo solidificado. Siempre debe trabajarse en condiciones de esterilidad.

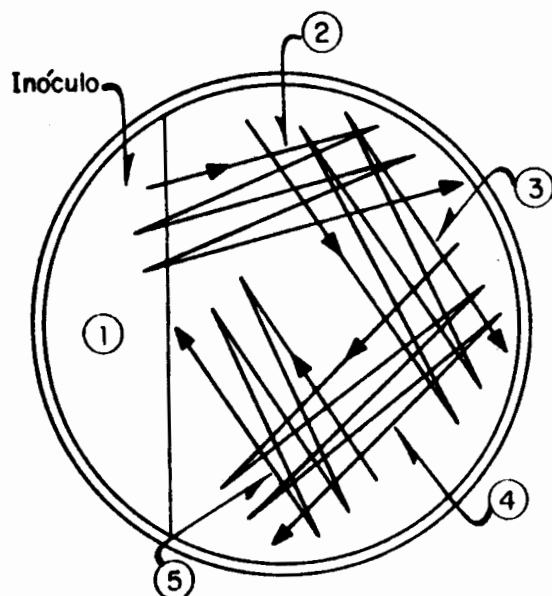
Existen dos variedades de siembra en placa:

- por estrías y
- por vaciado.

- SIEMBRA EN PLACA POR ESTRÍAS:

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 que como cuando se llenó, se flamea el labio y el asa se desliza sobre el medio de cultivo, sin perforar el agar, formando estrías.

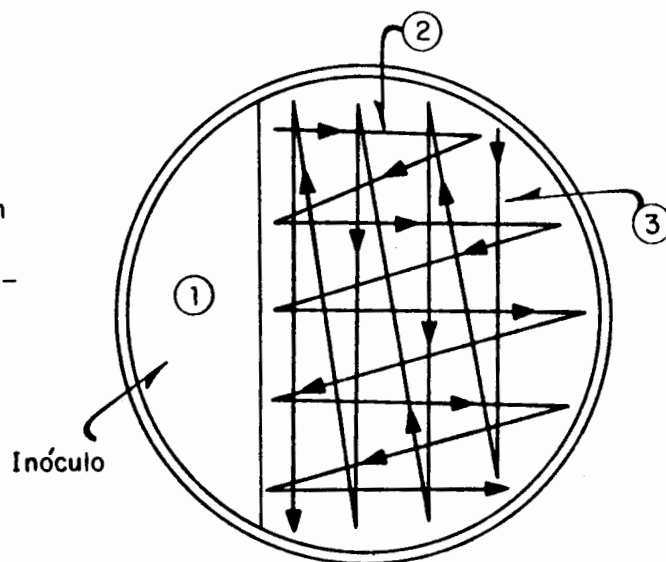
La figura 4.2 muestra un esquema de cómo se lleva a cabo esta operación.



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

- 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 sí licuado (en forma de suspensión). Se llena la caja de la misma forma que 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)

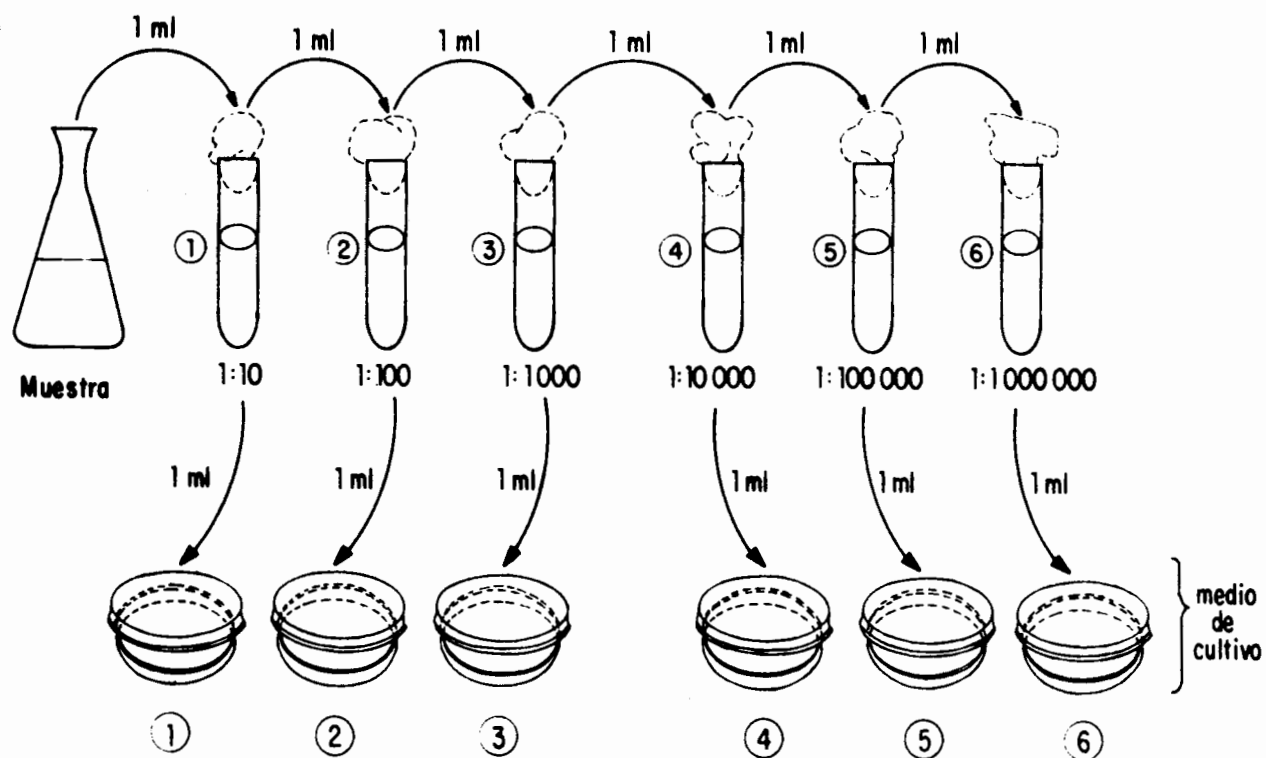


Fig 4.3 Siembra en placa por vaciado

b) 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:

- POR PICADURA:

Se utilizan 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. El asa se debe introducir en el medio picándolo longitudinalmente.

- POR ESTRÍAS:

Se usan 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 sirve, por lo general, para la proliferación de la cepa en cuestión y se hace por suspensión.

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

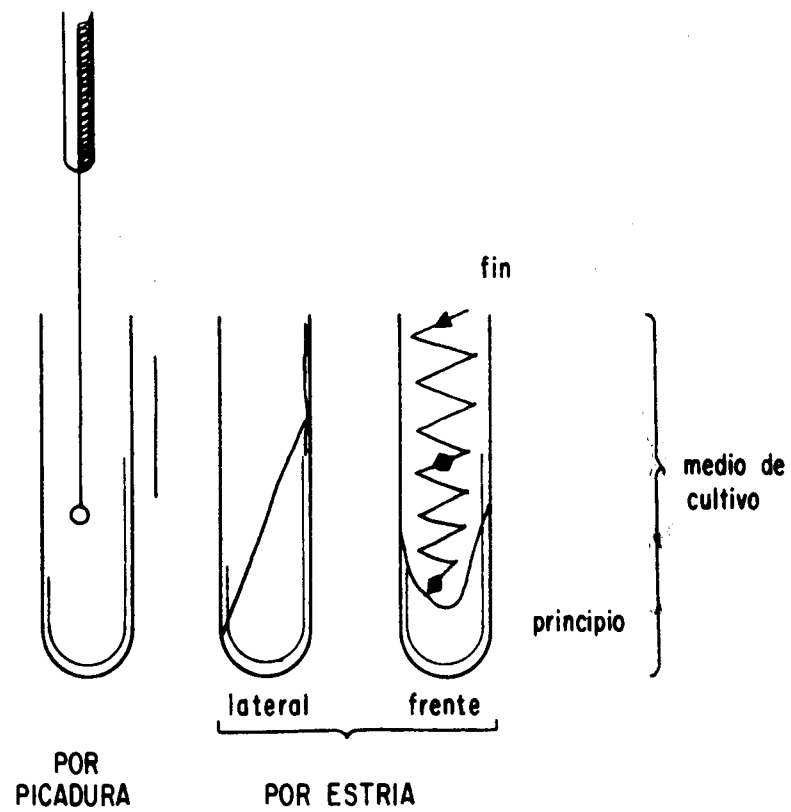


Fig 4.4 Siembra en tubos de cultivo por picadura y por estrías, en medios sólidos

B) EJECUCION

1.- SIEMBRA EN TUBO

1.1.- EN MEDIO SOLIDO

1.1.1.- POR PICADURA

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

1.1.2.-POR ESTRIA

Sembrar las cepas en forma inclinada en cada uno de los tubos con agar nutritivo siguiendo las instrucciones dadas por el profesor. Incubar a 35°C por 24 hrs.

1.2- EN MEDIO LIQUIDO

Con base en las instrucciones del profesor, sembrar las cepas en cada uno de los tubos con caldo nutritivo. Incubar a 35 °C por 24 hrs.

2.- SIEMBRA EN PLACA

2.1.-POR VACIADO

Hacer, como se indicó, las diluciones correspondientes a la muestra 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 a 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 más utilizadas en el estudio de los microorganismos ya que nos proporciona la amplificación necesaria para poder estudiar a los organismos que no son posibles de ser observados a simple vista. El conocer y entender cómo 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, según el principio en el que se base su amplificación, son de dos tipos: el óptico y el electrónico.

En el microscopio óptico, se consigue 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.

De los microscopios ópticos, el más sencillo es conocido como microscopio simple o lupa y consta de una sola lente convergente de capacidad amplificadora muy reducida.

El aparato más empleado es el microscopio compuesto u óptico de campo claro que supera extraordinariamente al anterior ya que, básicamente, posee dos sistemas de lentes, uno de ellos capta y amplía la imagen del objeto observado para, luego, volver a ser amplificada por el segundo sistema, alcanzando así, 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

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

- a) sistema mecánico y
- b) sistema óptico.

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

El pie también es 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 sostiene a las demás piezas.

El brazo, por lo general, es curvo y en la parte superior soporta al tubo del microscopio que se une al brazo por un sistema de cremallera a través del cual se desliza el tubo verticalmente. Éste 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 lo mueve con amplitud; en tanto que, el micrométrico, lo hace lentamente logrando efectuar un enfoque más preciso.

La platina se localiza 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, a menudo, en número de tres a cinco (dependiendo de la calidad del aparato). Las lentes que los forman están montadas dentro de una pieza cilíndrica.

Tanto los oculares como los objetivos tienen 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 el primero, 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 debido a que muchos rayos luminosos se pierden por refracción al pasar de la preparación al aire.

Los objetivos de inmersión son aquellos en los que, entre la lente frontal y el cubreobjetos, se coloca un líquido que, por lo común, es el aceite de cedro ya que, éste, posee un índice de refracción parecido al del vidrio lo cual permite que penetren más rayos luminosos al objetivo y que, por lo tanto, se consiga luz suficiente para aumentos superiores.

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 y se pueden utilizar de acuerdo con las necesidades: cuando no se dispone de condensador de luz, el 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.

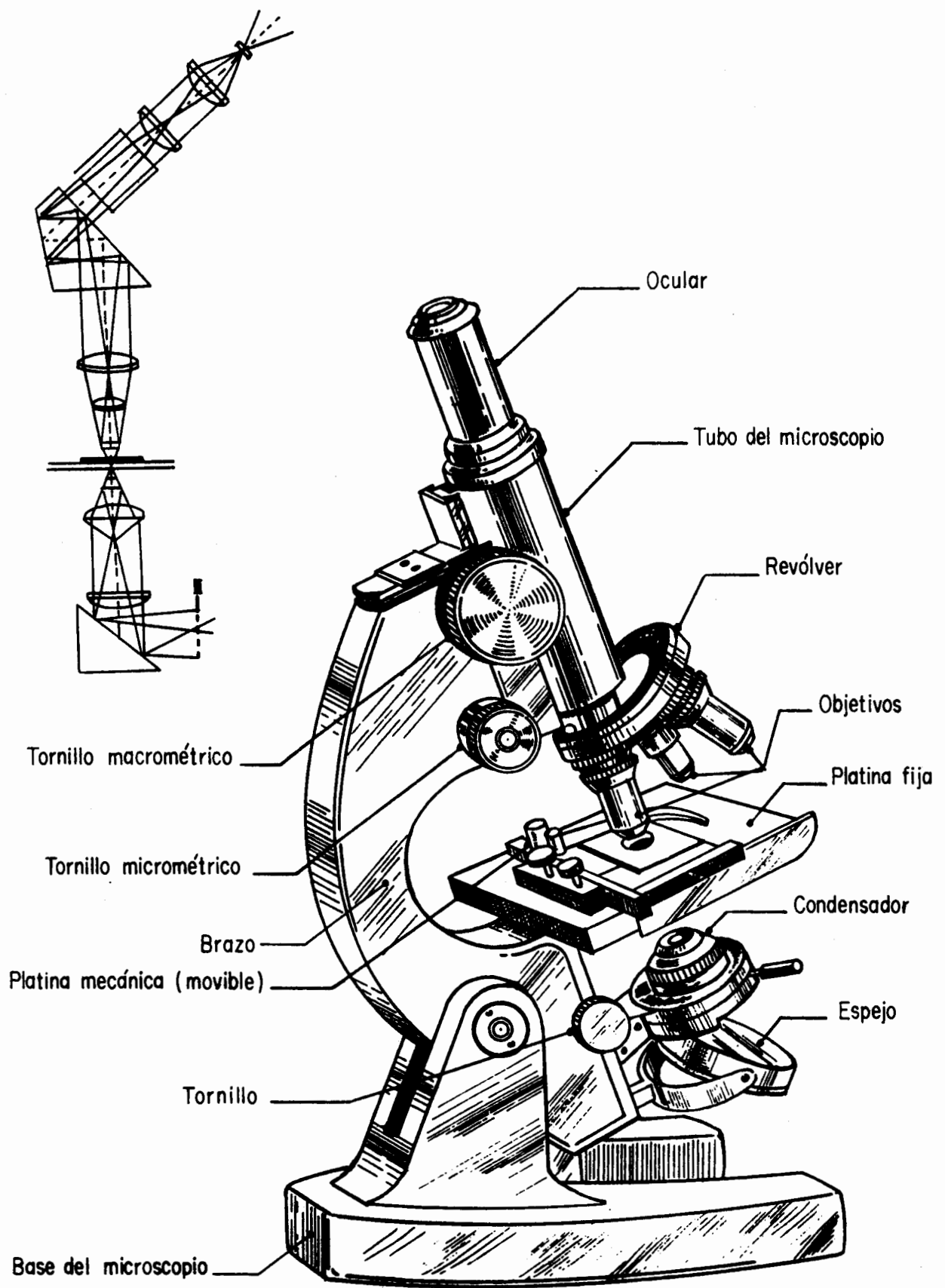
El condensador es un sistema de lentes que aumentan poderosamente el cono de iluminación. Su montaje está dispuesto de modo que pueda subir o bajar; aunque, en algunos modelos, es fijo. El condensador es muy útil cuando se emplean lentes de mayor aumento que exigen una gran cantidad de luz y que no podrían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

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

- ESTEREOMICROSCOPIA

El microscopio estereoscópico es con frecuencia empleado en Microbiología especialmente para el examen de hongos o de las características macroscópicas de colonias bacterianas. A pesar de ofrecer una imagen tridimensional, proporciona un aumento de entre 5 y 100 veces únicamente.

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

- CUIDADO DEL MICROSCOPIO

- 1.- Para transportar el microscopio fuera de su estuche, debe tomarse con una mano el brazo del microscopio, y con la otra, la base o pie.
- 2.- Asegúrese 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 empleado en el montaje de las lentes.
- 3.- Si se realizan observaciones con los objetivos secos, usar el espejo cóncavo y bajar el condensador.
- 4.- Cuando se hagan observaciones con los objetivos de inmersión, asegúrese de que el objetivo sea el correcto. Si se emplea otro, recuerde que el aceite puede desprender la lente. En las observaciones por inmersión utilice el espejo plano y suba el condensador hasta tocar la parte inferior del portaobjetos.
- 5.- Proceda siempre a bajar al máximo permisible el objetivo de inmersión cerciorándose de que el tornillo micrométrico esté 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, retírelos para conseguir una iluminación clara. Quite el ocular para ver que el campo esté iluminado uniformemente.

- 7.- Una vez enfocado el objetivo, ajuste el diafragma para lograr la máxima nitidez.
- 8.- Al observar con microscopio monocular, mantenga ambos ojos abiertos. Cerrar un ojo por períodos largos resulta muy cansado.
- 9.- Al terminar de hacer las observaciones, limpie escrupulosamente el ocular y el objetivo con papel seda especial para lentes.
- 10.- Revise que las piezas estén en su lugar. Haga girar el revólver de manera que el objetivo de menor aumento quede en posición de observación y baje hasta el tope. Guarde el microscopio.

- PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL OBJETIVO DE ACEITE O INMERSION

Puesto que en observaciones futuras el objetivo que se usará más a menudo será el de aceite de inmersión, a continuación se cita el procedimiento para su uso:

- 1.- Cuando la apertura numérica del objetivo sea mayor de 1.00, debe, también, emplearse aceite en el condensador poniendo una gota en la parte superior del lente.
- 2.- Aplique otra gota de aceite en la parte inferior de la preparación.
- 3.- Coloque la preparación en la platina.
- 4.- Suba el condensador lentamente hasta que el aceite de éste toque al 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.- Añada 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 y se distinguirá el espécimen.
- 9.- Utilizando el tornillo micrométrico, haga el ajuste fino para observar nítidamente el espécimen.

- PROCEDIMIENTO PARA EL USO DEL MICROSCOPIO ESTERIOSCÓPICO

- 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.- Observando a través del ocular (de preferencia con el ojo izquierdo), enfoque con el tornillo.
- 5.- Mirando con el ojo derecho, vea si se requiere de un mayor enfoque y emplee para ello el anillo de ajuste ubicado en el ocular.
- 6.- Examine su muestra.

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

Por sus dimensiones sumamente reducidas es esencial utilizar 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 sólo un microorganismo hace forzoso estimular su desarrollo en grandes números y es, en estos cultivos compuestos de millones de células, donde se procede a su estudio en lugar de hacerlo sobre solamente un germen.

Para diferenciar un microorganismo de otro, el microbiólogo en primer lugar observa su aspecto. 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 las 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 estos problemas, el microbiólogo usa siempre técnicas asépticas (ausencia de microorganismos), estos métodos son adecuados para prevenir la contaminación del medio por los microorganismos.

El procedimiento más corriente para estudiar la morfología bacteriana consiste en el examen de un frotis que, previa fijación, se tiñe con algún colorante y 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 esta preparación previa, pueden distinguirse perfectamente células aisladas ya que, de otra forma, los microorganismos se aglomeran en masas sólidas impenetrables a la luz.

Es vital la tinción pues, de lo contrario, 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; 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 diferenciar 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 observar, 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, haciendo 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 conseguir 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 este tratamiento nos permite distinguir entre dos diferentes tipos de bacterias con base en el colorante que retienen.

Existen dos métodos fundamentales de tinción diferencial: 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 ambas técnicas, el colorante inicial tiñe las bacterias por igual aunque, 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 y que 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 distinta en los tipos Gram-positivos y Gram-negativos.

Así pues, por medio del empleo de los métodos de tinción es sencillo identificar los tipos morfológicos más corrientes y hacer accesibles a la vista gránulos y vacuolas, endosporas, esporas, etcétera.

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

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

Hay tres grupos de colorantes: ácidos, básicos y neutros, pero los colorantes del tipo de las sales son los más usados. Se dice que un colorante es básico, cuando la parte coloreada de la molécula se encuentra en el ión positivo mientras que sí, la zona coloreada es la del ión cargado negativamente, se habla de un colorante ácido.

OBJETIVOS

- Conocer, aplicar y observar las diferencias en la tinción de microorganismos de acuerdo con las técnicas utilizadas.
- 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

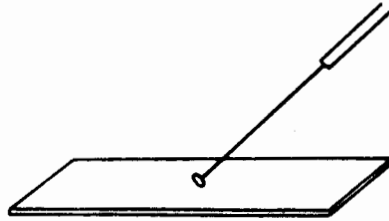
A) PREPARACION DE FROTIS

- 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.**

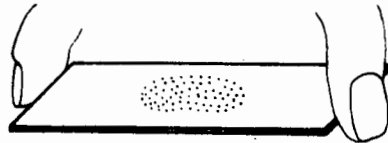
Para una mayor comprensión, la fig. 6.1 describe gráficamente este procedimiento.



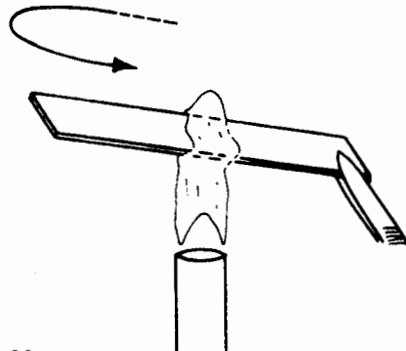
1- Esterilice el asa y deje que se enfrie



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

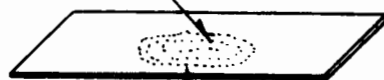


3- Deje secar el frotis al aire o páselo ligeramente por la flama



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



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

Marcar por la parte inferior

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, para ser observado en el microscopio, 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.- Tiña el frotis con alguno de los colorantes que se le proporcionen y permita que actúen; si se trata de cristal violeta o fucsina fenicada, 30 segundos; si es azul de metileno, 5 minutos.
- 2.- Lave con agua de la llave.
- 3.- Escurra.
- 4.- Deje secar perfectamente al aire.
- 5.- Una vez totalmente seco, coloque una pequeña gota de aceite de inmersión y observe.

B.2) TINCION DE GRAM

- 1.- Cubra el frotis con solución colorante de cristal violeta. Deje actuar durante un minuto.
- 2.- Después, lave la preparación con agua de la llave o con una solución de yodo.
- 3.- Posteriormente, cubra la preparación con la solución de lugol durante un minuto.

- 4.- Lave la preparación con agua de la llave.
- 5.- Decolore con alcohol-acetona (o con alcohol al 70%) durante 10 segundos o gota a gota hasta que la última salga clara, es decir, sin colorante.
- 6.- Lave 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.- Observe.

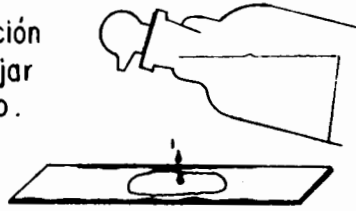
La figura 6.2 describe gráficamente este procedimiento, y la tabla 6.1 y 6.2, la reacción, apariencia y algunas características de las bacterias en los pasos de la técnica de tinción de Gram.

NOTA:

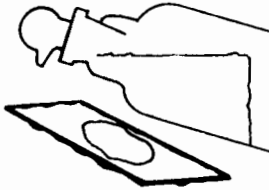
Los microorganismos positivos al Gram toman el primer colorante y aparecen teñidos de color violeta o azul oscuro. Los que aparecen en rojo, toman la safranina y son negativos al Gram.

Existen microorganismos variables al Gram, conviene, por tanto, hacer los frotis de cultivos jóvenes. Si apareciera dentro de la célula una parte sin teñir, puede tratarse de endosporas que no toman fácilmente los colores.

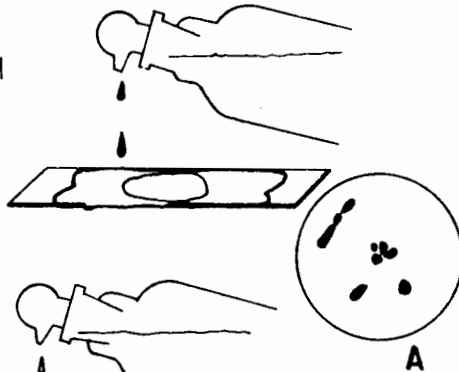
1._ Cubrir el frotis con solución colorante cristal-violeta, dejar actuar durante un minuto.



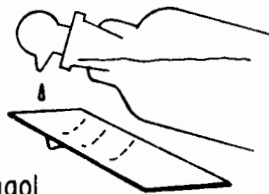
2._ Enjuagar el frotis con solución de yodo o agua corriente



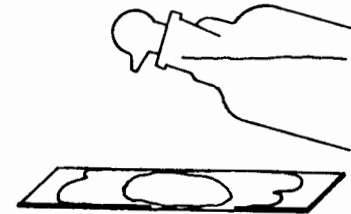
3._ Cubrir el frotis con lugol (solución yodó-yodurada) dejar actuar 1 minuto



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



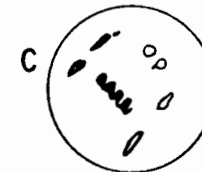
5._ Enjuagar el frotis inmediatamente con agua de la llave.



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.



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, éstas permanecen violetas.	Complejo CV-L se forma dentro de las bacterias, éstas persisten violetas.
Alcohol	Las paredes celulares se deshidratan, hay retracción de los poros, la permeabilidad disminuye, el complejo CV-L no puede salir de la bacteria, se mantiene violeta.	Extracción de lípidos de las paredes celulares, aumento de porosidad, CV-L sale de la bacteria.
Safranina	Las bacterias no afectadas persisten violeta.	Las bacterias toman este colorante y se tiñen de rojo.

TABLA 6.2
ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS BACTERIAS
GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS

Características	Diferencias Relativas	
	Grampositivas	Gramnegativas
Composición de la pared celular.	Baja en lípidos (1-4 %)	Alta en lípidos (11-22 %)
Susceptibilidad a la penicilina.	Mayor	Menor
Inhibición por colorantes básicos; por ejemplo, cristal violeta.	Notable	Menor
Necesidades nutritivas.	Muchas especies relativamente complejas	Relativamente simples
Resistencia a la desinteracción por métodos físicos.	Mayor	Menor

C) OBSERVACION DE PULQUE

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

D) OBSERVACION DE PROTOZOARIOS

- 1.- Con el asa, anteriormente esterilizada y enfriada, tome varias porciones del sedimento de lodos activados y colóquelos sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.
- 2.- Observe la preparación con los objetivos seco débil y seco fuerte identificando los tipos de organismos presentes.

E) OBSERVACION DE HONGOS

- 1.- Con el asa, esterilizada y enfriada con anticipación, tome del cultivo de hongos que se le proporcione una pequeña cantidad de micelio.
- 2.- Colóquelo en un portaobjetos limpio y desengrasado que contenga una gota de solución de potasa al 30%.
- 3.- Observe la preparación con los objetivos seco débil y seco fuerte tratando de reconocer el tipo de estructuras existentes.

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 en ella y hacer transformaciones adicionales una vez que aquellos penetren. 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 llevar a cabo 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 hasta alcanzar el equilibrio de esta última sin que necesariamente la inicien. Las sustancias que se comportan así se llaman catalizadores o agentes catalíticos. Las enzimas pertenecen a esta categoría ya que funcionan como catalizadores del tipo orgánico y son producidas por los organismos vivos.

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

- Las exoenzimas o enzimas extracelulares: 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: sintetizan el material celular y efectúan reacciones catabólicas de las cuales 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, únicamente, reacciones muy específicas a causa de que sólo el sustrato preciso se ajusta en el sitio activo de la enzima igual que una llave embona en una cerradura en especial.

La actividad de una enzima puede ser afectada por todos aquellos factores que alteran 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 bioquímicas potenciales de un cultivo microbiano tiene muchas aplicaciones en Biología. Por ejemplo, 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, 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, precisamente, la de romper sus respectivos sustratos por medios hidrolíticos. Las carbohidrasas, hidrolizan los polisacáridos a azúcares; las proteasas, las proteínas a péptidos y aminoácidos y las lipasas, las grasas a glicerina y ácidos grasos. Cuando los organismos crecen en medios que contienen uno de estos 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 mercurico
- 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
- 3 tubos de ensaye con caldo lactosado o caldo lauril triptosa
- 3 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) Siembre los tubos de ensaye que contienen caldo con las cepas proporcionadas . Deje uno como testigo. Incube los tres tubos a 35° C y observe 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, éste 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. Sin embargo, cuando se hidroliza el almidón, los productos que se obtienen son dextrinas, maltosa y glucosa, productos de menor complejidad que no dan esta reacción azul. Ciertas dextrinas, como la eritrodextrina, se tñen 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 emplea 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 estrías 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°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 faciliten. Siembre por picadura central y estrías cortas como en el caso del almidón.
- 2) Incube 48 horas a 35°C.

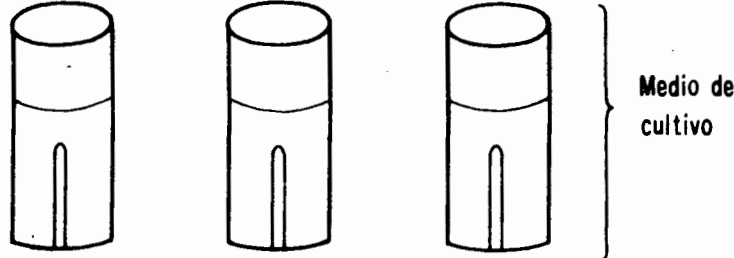
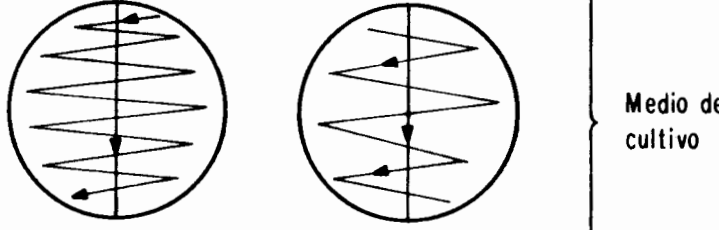
Las colonias de bacterias proteolíticas aparecerán rodeadas de una zona clara mientras que, en las áreas en las que la caseína no ha sido atacada, permanecerá el aspecto opaco del medio.

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 le suministren.
- 2) Incube a 35°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 mientras que, la gelatina hidrolizada, se conservará 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
Siembra de un microorganismo (M. O.) {  Gram(+) Gram(-) Testigo		caldo lactosado + M.O. → incubar a 35°C (24 a 48 hrs) → producción de gas (↑) por hidrólisis de la lactosa
1.2 Hidrólisis de un polisacárido		
Siembra de un M. O. {  Gram(+) Gram(-)		agar almidón + M.O. → incubar a (35° C) (48 hr) → + Lugol → coloración azul (presencia de almidón)

PRECAUCION:

No agite los tubos mientras estén líquidos puesto que puede provocar una solidificación al mezclarse la gelatina hidrolizada con la intacta.

b) Técnica de las placas de gelatina- agar.

- 1) Siembre dos placas de agar-gelatina con las cepas que se le proporcionen según la técnica antes descrita.
- 2) Incube a 35°C durante 48 horas.
- 3) Vierta sobre el cultivo 2 ml de solución de cloruro mercúrico. El reactivo formará un precipitado blanco con la gelatina en tanto que la gelatina hidrolizada no precipitará y se verá como una zona clara.

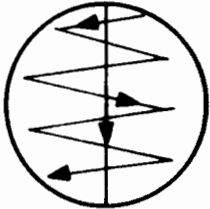
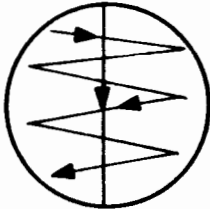
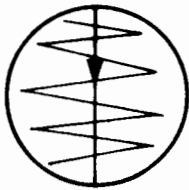
La figura 7.2 esquematiza los dos procedimientos anteriores.

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 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 H₂O₂ 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. {	 Gram (+)  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	 Gram (+)  Gram (-)  Testigo } Medio de cultivo	gelatina nutritiva (sólida) + M.O. $\xrightarrow{\text{incubar 2-7 días}}$ licuación (hidrólisis de gelatina)
b) Hidrólisis en caja	 Gram (+)  Gram (-) } Medio de cultivo	agar gelatina + M.O. $\xrightarrow{\text{incubar 48h } 35^{\circ}\text{C}}$ + Hg Cl ₂ → ↓ blanca (sí hay gelatina)

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 3

ANALISIS DE AIRE

INTRODUCCION

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

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

La flora microbiana del aire es transitoria y variable ya que no es un medio en el que los microorganismos logren desarrollarse; sin embargo, es portador de materia particulada, polvo y gotas, que posiblemente estén cargados de microbios.

El número y tipo de microbios en el aire están determinados por las fuentes de contaminación del ambiente, por ejemplo, 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 éstas se evaporan. Así, son llevados unos cuantos metros o muchos kilómetros; algunos mueren en unos segundos y, 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 establecer su contenido microbiano requiere 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 en las zonas 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 con el fin de que ahí se capturen los microorganismos. Después, se siembran muestras del líquido en placas que se cultivan con el objeto de fijar 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 comúnmente se hallan 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. Permitir la solidificación.
- 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, en el caso de bacterias; observar las preparaciones con KOH al 30% con el objetivo seco fuerte si se trata de hongos.
- 4.- Consignar sus observaciones en la siguiente tabla:

Medio de cultivo	Número de colonias	Tipo predominante Características	
		Macroscópicas	Microscópicas

PRACTICA 9

ANALISIS BACTERIOLOGICO DE AGUA

MUESTREO

INTRODUCCION

La determinación de la calidad del agua es de vital importancia para el bienestar de la comunidad ya que el 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 buen muestreo son:

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

a) Selección del sitio de muestreo

Una localización apropiada 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 recolectan generalmente cerca de la superficie.
- a.3.- Toma de muestras para estudios intensivos de cuerpos receptores.

El muestreo representativo debe realizarse considerando las características particulares del estudio. Entre algunos de los factores que no se deben descuidar se encuentran:

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), etcétera.

b) Número, frecuencia y tamaño de muestra

El número mínimo de muestras depende del número de usuarios. En la fig. 9.1 se 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 ellos. Tales muestras, deben considerarse como adicionales y no incluirse 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 más un pequeño espacio para aire. El frasco y la tapa deben de ser de un material bacteriológicamente inerte (vidrio o plástico por lo común).

Los envases deben lavarse adecuadamente, enjuagarse con agua limpia y esterilizarse. Las botellas que se destinen para la recolección de muestras de aguas con cloro residual deben llevar un agente declorador, a no ser que contengan caldo para la siembra directa. El tiosulfato de sodio es un agente satisfactorio de decloración, 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.

Empleando 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 antes de la esterilización al frasco de muestra limpio y seco 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 la técnica de filtro de membrana en muestras de agua potable se requiere un volumen de 100 ml. Sin embargo, en aguas superficiales, naturales, no potables y residuales se necesitan volúmenes menores de muestra para el análisis porque las cuentas bacterianas pueden ser muy altas.

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

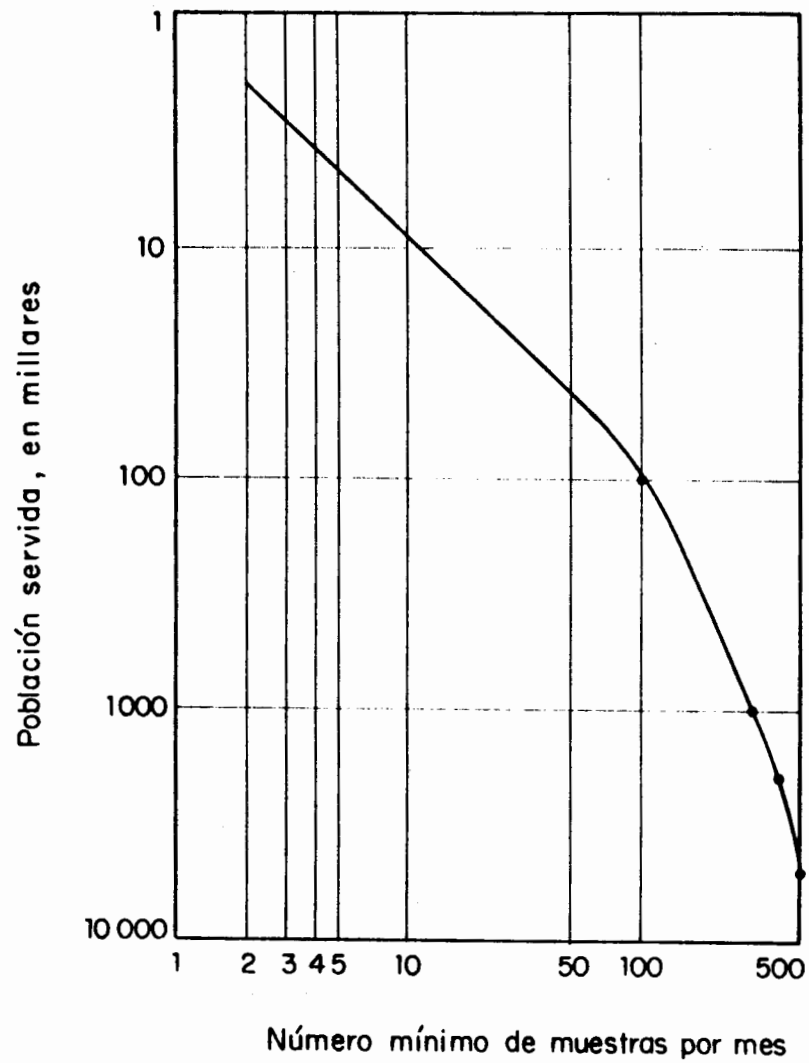


Fig 9.1 NUMERO MINIMO DE MUESTRAS,
BASADO EN LA POBLACION SERVIDA

TABLA 9.1
VOLUMENES DE AGUA SUGERIDOS

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

A) MUESTREO DE UN SISTEMA DE DISTRIBUCION

Como paso previo al examen, 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.

Se debe procurar que las muestras sean en realidad representativas del agua en estudio y 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 envase para que éstos no se contaminen. La botella se debe tomar cerca de su base y se ha de llenar sin enjuagar volviéndola a tapar inmediatamente.

Si se tratara de tomar una muestra de un grifo del sistema de distribución, se deberá 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 ha de dejar que el agua fluya al drenaje por 2 ó 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 con el objeto de llenar el frasco sin que el agua salpique. No deben usarse como puntos de muestreo los grifos con fugas ya que provocan que el agua escurra fuera de la botella. Debe hacerse una determinación de cloro en el sitio de muestreo.

B) 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 ni muy lejos del punto de toma o a una profundidad mayor o menor que éste.

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 con la boca hacia abajo, bajo la superficie. En ese momento, se invierte el envase 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 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 permitan destapar mecánicamente la botella debajo de la superficie.

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.

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

C) 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 estos 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. De esta forma, se sugiere 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, 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 empleadas para efectuar 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, el cual se utiliza para determinar el contenido bacteriano de diversos materiales.

En el análisis de agua dicha técnica se usa para determinar el número total de organismos presentes en una muestra y consiste en proporcionar a los microorganismos las condiciones y alimento necesario para que, en caso de existir, puedan desarrollarse y generar colonias conformadas por una gran cantidad de microorganismos.

Una vez hecho lo anterior, se debe diluir un cierto volumen de agua en forma seriada. 1 ml. de cada dilución se debe vaciar en una placa de agar nutritivo para después contar las colonias resultantes.

Cabe mencionar que como se toman en cuenta únicamente las células capaces de formar colonias, el método se conoce también como "cuenta viable".

Las diluciones se realizan dependiendo del tipo de muestra de agua que se va a emplear (potable, residual, etc) hasta que se alcanza una dilución que posea por ml entre 30 y 300 células capaces de formar colonias.

Dado que la muestra original pudo haber tenido desde cero hasta un millón de bacterias viables, se hace indispensable diluir siempre hasta 0.00001 y sembrar en las cajas de Petri muestras de 1 ml. de cada dilución contando, entonces, solamente 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 crear una colonia visible.

Lo usual es que el agua de buena calidad tenga cuentas bajas, menos de 100 por ml.

Por otro lado, es importante hacer notar que las cuentas en placa se deben hacer antes y después de algún tratamiento en especial. Por lo tanto, son útiles, también, en la determinación de la eficiencia de operaciones como la sedimentación, filtración y cloración que sirven para eliminar microorganismos.

Las cuentas se deben hacer antes y después del tratamiento específico.

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

OBJETIVO

Señalar 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.

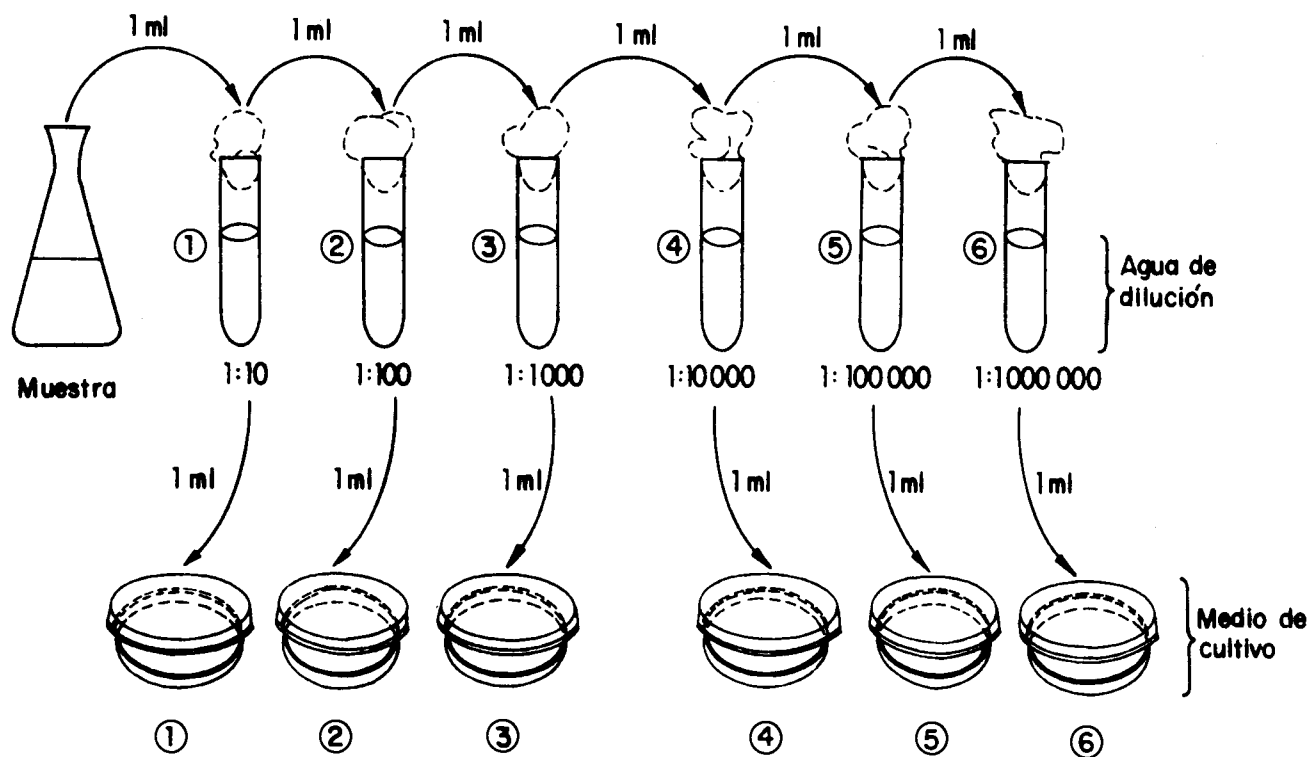


Fig 10.1 CUENTA EN PLACA

RESULTADOS

Haga observaciones a las 24 y a las 48 horas , cuente y tome como bueno el número en aquellas placas en las que haya entre 30 y 300 colonias.

Para contar en forma precisa use un cuenta colonias que facilite el proceso ya que, así, éstas se iluminan, amplifican y se observan contra un fondo cuadriculado.

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 hallaron 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

Mientras que el método de sembrado en placa se usa para tener una idea global de la población bacteriana acuática, lo cual puede resultar satisfactorio en estudios generales de Biología, en un análisis sanitario del agua resulta inadecuado ya que, este último, incluye la búsqueda de bacterias intestinales que indiquen contaminación con aguas negras y el consiguiente peligro de la diseminación de enfermedades entéricas.

En vista de que cualquier bacteria entérica puede ser sobrepasada numéricamente en forma considerable 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 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. A pesar de esto, 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 de cada dilución que se examine.

La exactitud de una prueba aislada depende del número de tubos que se empleen. Se consiguen datos más satisfactorios cuando en la porción más grande que se estudie se tiene gas en algunos o en todos los tubos y cuando en la menor, no hay gas en ninguno o lo hay en muy pocos de ellos.

El valor numérico de la estimación del contenido bacteriano se fija, principalmente, por aquella dilución que muestre tanto tubos positivos como negativos. La exactitud que se puede esperar de los resultados depende, en especial, del número de porciones 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 de la interpretación de los resultados de la técnica de tubos múltiples o de otros métodos, posiblemente más precisos, así como de todos los informes que se hayan obtenido 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 y que cada tubo contenga 10 ml ó 100 ml de la muestra de agua.

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

En el análisis 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 de agua que dependan de la selección de los de la densidad probable de coliformes.

OBJETIVO

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

A.-TUBOS DE FERMENTACION. PRUEBA PRESUNTIVA

MATERIAL

- Muestra de agua
- Pipetas graduadas estériles de 1 ml y 10 ml
- Tubos estériles con agua peptonada para dilución
- 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.

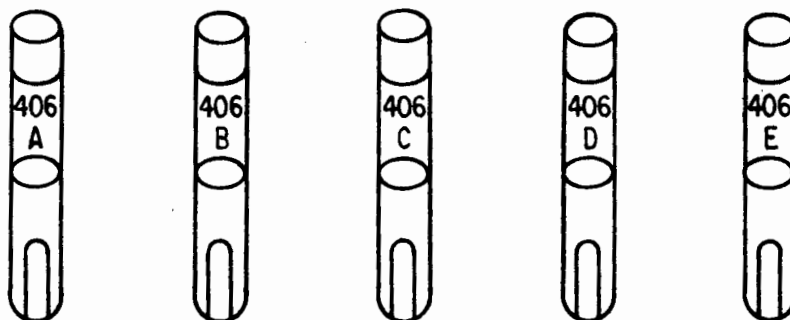
PROCEDIMIENTO

- 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, adoptar cualquiera de los sistemas que recomiendan las normas. Si se utilizan porciones de 10 ml en adelante, usar un volumen de caldo igual al de la siembra, pero empleando caldo de doble concentración.

Se deberán rotular los tubos en forma adecuada indicando el número de muestra, volumen, 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 estima como positiva.
- 4.- Determinar el número más probable consultando las tablas del " Standard Methods for Examination of Water and Wastewater " . (Ver tabla 11.1 a y b).
- 5.- Para la prueba presuntiva, observar los tubos a las 24 horas de incubación y tomar los positivos para continuar la prueba. En caso de que no hubiera tubos positivos, dejar incubar otras 24 horas. Si a las 48 horas no hay tubos positivos, el análisis se da por concluido y se considera que no hay presencia de *Escherichia coli* (ver figura 11.2).

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



	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Volumen de muestra
Número de muestra	406 A	406 B	406 C	406 D	406 E	10 ml
	406 a	406 b	406 c	406 d	406 e	1 ml
	406 <u>a</u>	406 <u>b</u>	406 <u>c</u>	406 <u>d</u>	406 <u>e</u>	0.1 ml
	406 1a	406 1b	406 1c	406 1d	406 1e	0.01 ml
	406 2a	406 2b	406 2c	406 2d	406 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 DE POSITIVOS	INDICE DEL NMP/100 ML	LIMITE DE CONFIANZA DEL 95%		COMBINACION DE POSITIVOS	INDICE DEL NMP/100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 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

B) CINCO TUBOS DE 10 ML.

Número positivo de cinco tubos de 10 ml	NMP por 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

Establecer 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, por tanto, proseguir la prueba hasta la fase complementaria.

En las cajas de Petri con Endo se consideran colonias 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 habla de colonias nucleadas o típicas cuando éstas tengan centro negro (al observarse desde abajo, contra la luz). 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 emplearon los tubos de fermentación con lactosa - bilis -verde brillante para proseguir la prueba, siembre sobre las placas con Endo y Eosina azul de metileno en cuanto aparezca gas sin esperar a que pasen las 48 horas.
- B.- En el caso de que se hubieran preferido las cajas de Petri, escoja una colonia típica o atípica y siembre en un tubo de fermentación con caldo lauril triptosa y en otro, con agar nutritivo inclinado usando el asa de siembra y 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 con el asa de siembra un poco de cultivo del tubo de agar nutritivo inclinado y haga una coloración de Gram. (Ver figuras 11.2 ,11.3 y 11.4).

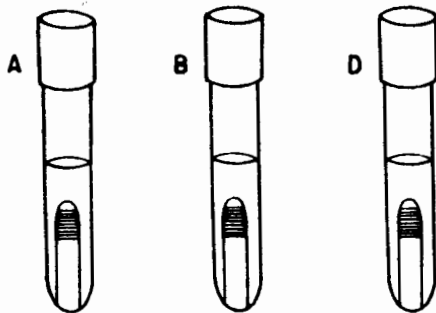
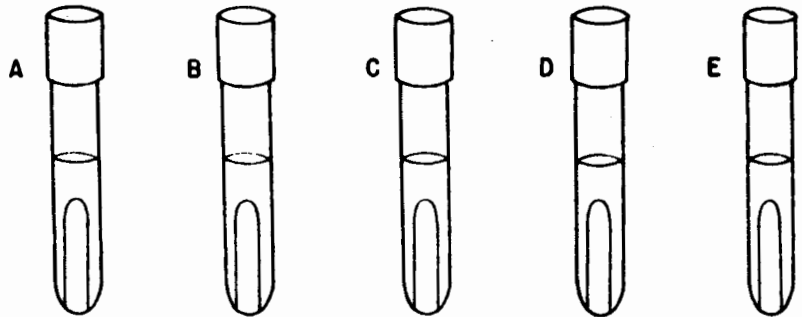
RESULTADOS

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.

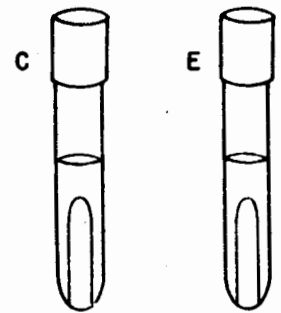
A. PRUEBA PRESUNTIVA

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 ± 2 Hs a $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



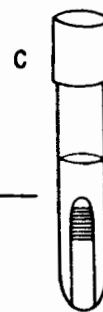
EXISTE PRODUCCION DE GAS
PRUEBA PRESUNTIVA POSITIVA

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



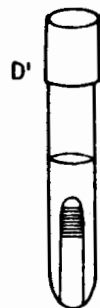
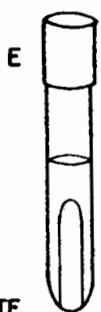
B. PRUEBA CONFIRMATIVA SE
TRANSFIERE CON EL ASA UN INOCULO A:

CALDO LACTOSADO BILIS VERDE BRILLANTE. SE
INCUBA POR 48 ± 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

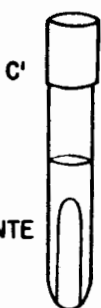
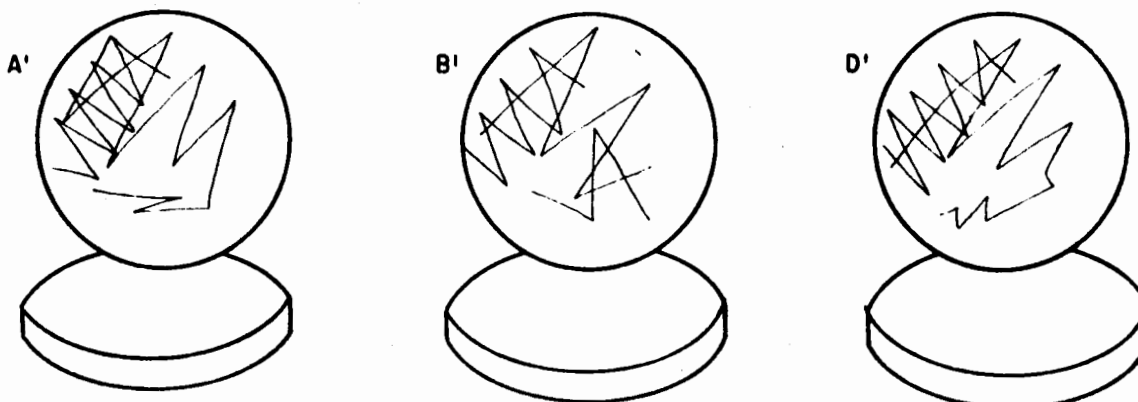
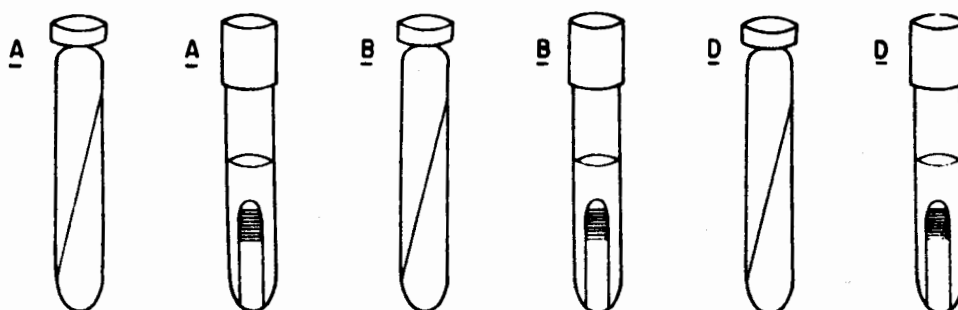


Fig 11.2 DETERMINACION DEL GRUPO COLIFORME POR MEDIO DE LA TECNICA DE TUBOS MULTIPLES DE FERMENTACION

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 ± 2 Hs, a $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



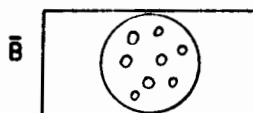
SE TRANSFIERE UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO DE UNA PLACA DE EMB ó AGAR NUTRIENTE ADOPTANDO UN PLANO INCLINADO DENTRO DEL TUBO DE ENSAYO Y AL CALDO DE LAURIL TRIPTOSA. SE INCUBAN LOS TUBOS DE CALDO DE LAURIL TRIPTOSA POR 24 ó 48 ± 2 Hs, a $35^\circ \pm 0.5^\circ \text{C}$



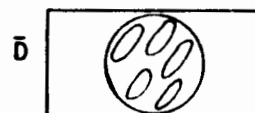
SE PREPARA UNA TINCION DE GRAM CON UNA PEQUEÑA PORCIÓN DEL DESARROLLO BACTERIANO DE CADA TUBO DE AGAR NUTRIENTE INCLINADO



PRUEBA POSITIVA
(Bacilos gram negativos)



PRUEBA NEGATIVA
(Cocos gram negativos)



PRUEBA NEGATIVA
(Bacilos gram positivos)

PRUEBA COMPLETA POSITIVA: SE DEMUESTRA LA PRODUCCION DE GAS, BACIOS 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

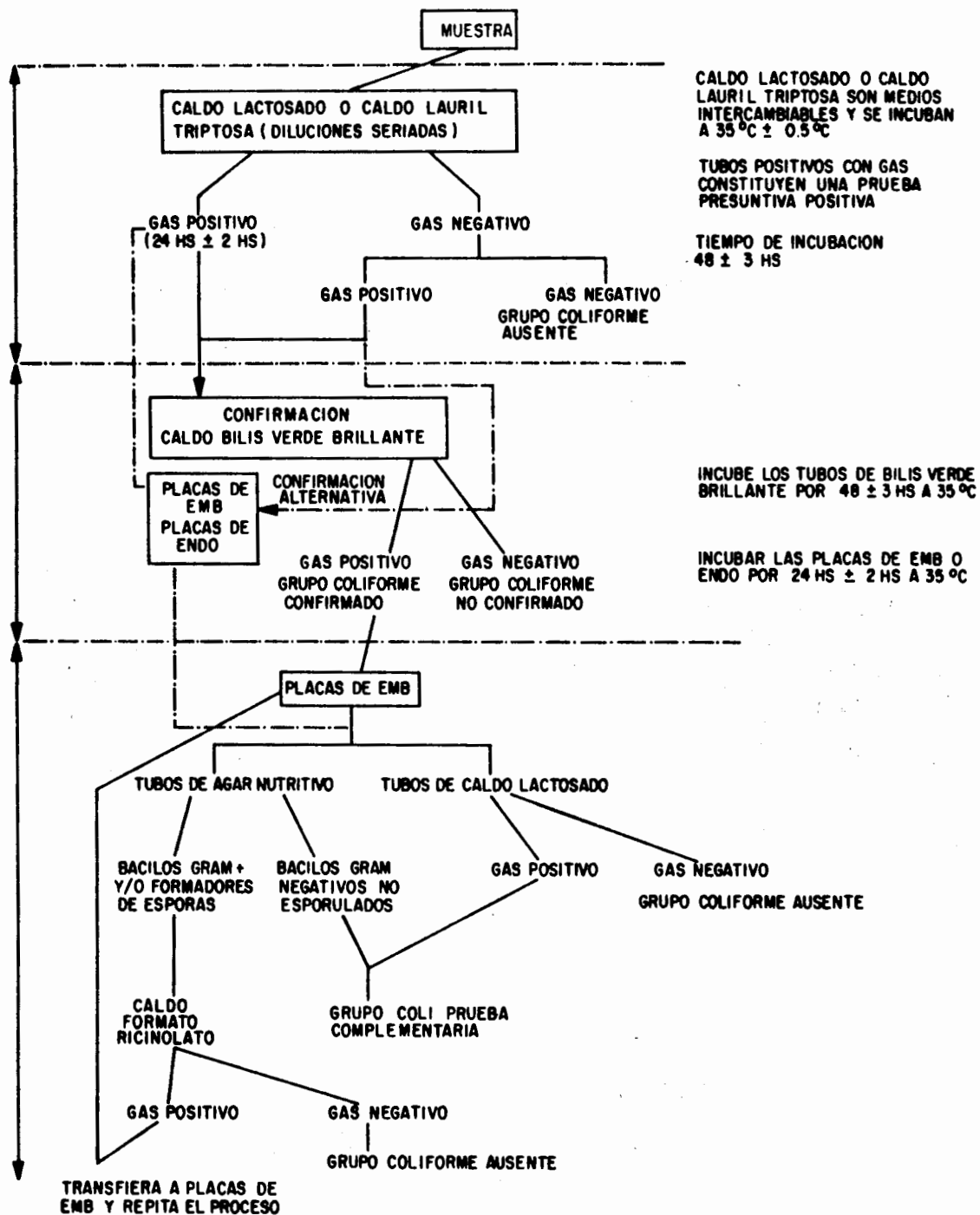


Fig 11.3 PRUEBAS PARA EL GRUPO COLIFORME

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

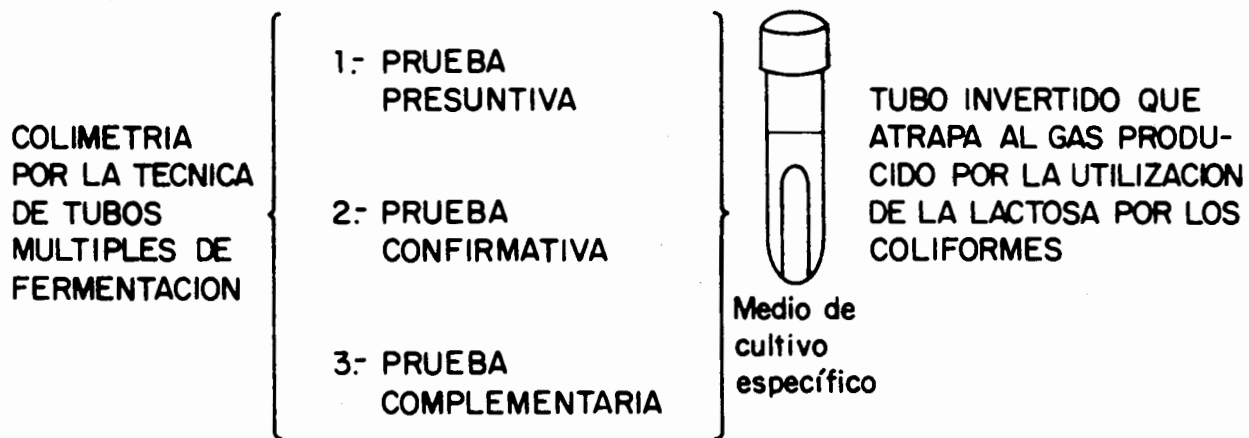


Fig 11.4 DETERMINACION DEL GRUPO COLIFORME POR
 MEDIO DE LA TECNICA DE TUBOS MULTIPLES
 DE FERMENTACION

Tabla 11.2 FORMA DE REPORTAR LOS RESULTADOS DE ANALISIS DE AGUA

FECHA	HOJA No.	PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	NOMBRE DEL TECNICO

PRESUNTIVA	CONFIRMATIVA	COLIFORMES FECALES (*)
------------	--------------	------------------------

ml																			
24 hs																			
48 hs																			
CODIGO																			

INDICE NMP/100 ml

PRACTICA 12

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

INTRODUCCIÓN

Se presupone que el objetivo de los análisis rutinarios es 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 requieren 24 horas o más para obtener las conclusiones de los exámenes y, si se localizan microorganismos patógenos, muchas personas pueden haber tomado agua antes de que se conozcan los resultados, exponiéndose con ello a una infección.

Se sabe que los microorganismos patógenos de 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, (*Streptococcus faecalis*) y *Clostridium perfringens*, son habitantes normales del intestino grueso de hombres y animales y, en consecuencia, siempre están en las materias fecales.

Puesto que los exámenes de laboratorio para hallar microorganismos patógenos en el agua tienen las desventajas enumeradas, se han desarrollado técnicas para detectarlos en las excretas, especialmente los del grupo coliforme. Estos estudios han probado ser satisfactorios en la práctica y tienen 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 éstos aparecerán en las materias fecales. Así, la presencia de coliformes en el agua se toma como señal de alarma pues ésta 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 indispensable recurrir a pruebas bioquímicas para diferenciarlos. Reacciones que tengan las siguientes cuatro características son muy importantes para lograr este propósito:

- 1.- Capacidad para generar indol. *E. coli* lo produce, y *Enterobacter aerogenes*, no.
- 2.- Cantidad de ácido originada en un medio especial de caldo glucosado adicionado del indicador rojo de metilo. Los dos microorganismos elaboran ácido a partir de la glucosa. Pero, *E. coli* lo hace a un pH más bajo lo que origina que vire al rojo de metilo mientras que, *Enterobacter aerogenes* no cambia el color del indicador.
- 3.- Capacidad para crear acetilmetilcarbinol en un medio de peptona glucosado. Este compuesto químico se detecta por la reacción de Voges-Proskauer. *E. coli* no produce acetilmetilcarbinol en tanto que, *Ent. aerogenes*, sí lo hace.
- 4.- Utilización de citrato de sodio. *Enterobacter aerogenes* es capaz de emplear 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 reproduce en estas circunstancias.

Por conveniencia a estas pruebas se les 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 asemejan a los coliformes y de los cuales es necesario obtener datos bioquímicos y serológicos más detallados para poder diferenciarlos.

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 METILO	VOGES 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.

A) COLIFORMES FECALES

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 ° 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 tabulando los resultados (Ver figuras 11.4 y 12.1).

B) PRUEBAS DIFERENCIALES. REACCIONES IMVIC

A).- PRUEBA DEL INDOL

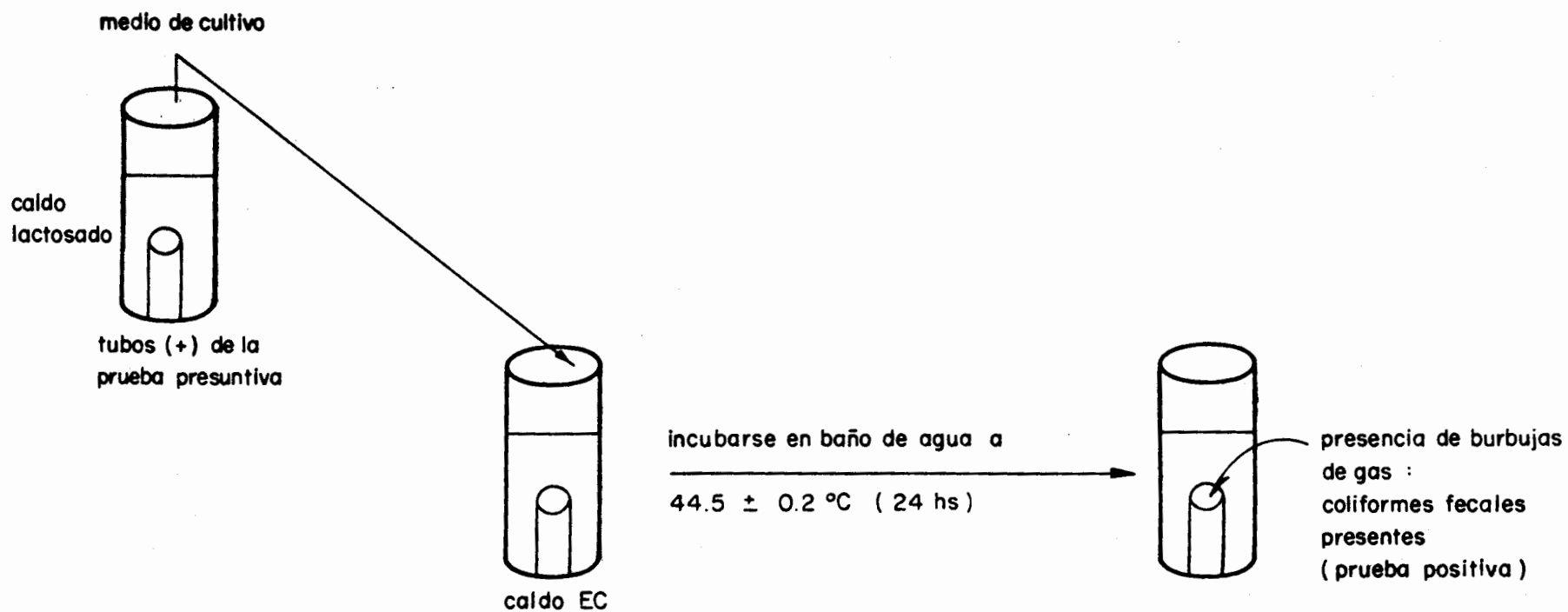
MATERIAL

- 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 esterilizadas de 1 ml

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 ° 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.

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

RESULTADOS

Interpretación: Si se observa un color rojo, la prueba se toma como positiva; si el color es amarillo, es negativa.

C).- 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 se presenta 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 ya que los resultados leídos después de las 4 horas no tienen validez.

D).- 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

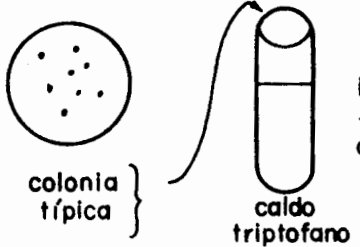
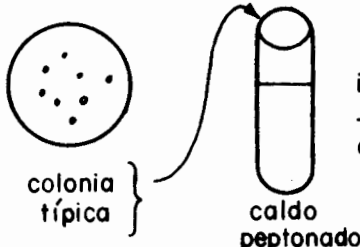
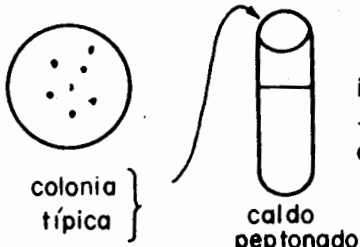
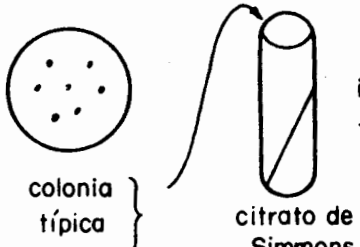
- 1.- Inocule una pequeñísima cantidad de cultivo en la superficie inclinada del tubo con medio de Simmons.
- 2.- Incube de 72 a 96 horas a 35 ° C.

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 juzga 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	 colonia típica } caldo triptofano incubar 24hs a 35°C + $\left. \begin{array}{l} \text{Reactivo de Ehrlich} \\ \text{o} \\ \text{Reactivo de Kovacs} \end{array} \right\}$ esperar 10'	Observar aparición de coloración roja
M	Rojo de metilo	caldo peptonado	 colonia típica } caldo peptonado incubar 5 días a 35°C + Solución indicadora de rojo de metilo	Observar aparición de coloración roja por vire del indicador
VI	Voges Proskauer	caldo peptonado	 colonia típica } caldo peptonado incubar 48 hs a 35°C + 0.6 ml α naftol (agitar) + 0.2 ml KOH (sin agitar)	Observar aparición de coloración rosa o rojiza (2 - 4 hs después)
C	Citrato	citrato de Simmons	 colonia típica } citrato de Simmons incubar de 72 a 96 hs a 35 °C	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", "estreptococos del grupo D", "*Streptococcus faecalis*" y aun "estreptococos", se han usado indistintamente para indicar la presencia de estreptococos en el tracto intestinal de animales de sangre caliente o en el material fecal excretado en forma reciente por otros organismos.

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 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 abarca 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 llegan a incluir en las especies de estreptococos que se consideran indicadoras de contaminación fecal.

Se puede usar 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 hallen en la naturaleza en ausencia de contaminación fecal de éstos.

Los enterococos perecen rápidamente en los suelos mientras que, los organismos coliformes, sobreviven por largos períodos. Asimismo, los enterococos no proliferan en las aguas. Por lo tanto, 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. Esto incluye a todos los grupos de enterococos y a algunos de estreptococos".

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

El uso de esta correlación es útil para identificar el origen de la contaminación ya sea que ésta sea de origen humano o no.

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

TABLA No. 1

Contaminación 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

La localización de enterococos es de particular valor para lo siguiente:

- a) Reconocimientos de contaminación de corrientes;
- b) Análisis en algunas aguas potabilizadas ya que, por ejemplo, los enterococos llegan a ser más resistentes que las bacterias coliformes hacia la acción desinfectante del cloro;
- c) Estudios de aguas de albercas, balnearios, e
- d) Investigación 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 tiende a variar de 10:1 a 1:2.

Se usan dos técnicas para distinguir 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 empleando la técnica del número más probable.

MATERIAL

- 15 tubos con Caldo Azida-Dextrosa (AD)
- 15 tubos con Caldo Azida - Violeta de etilo (AVE)
- Tubos esterilizados con 9 ml de solución para dilución
- 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 usando 1 ml de las diluciones apropiadas de la muestra.
- 3.- Incube los tubos inoculados a 35 ° C durante 24 y 48 horas.

RESULTADOS

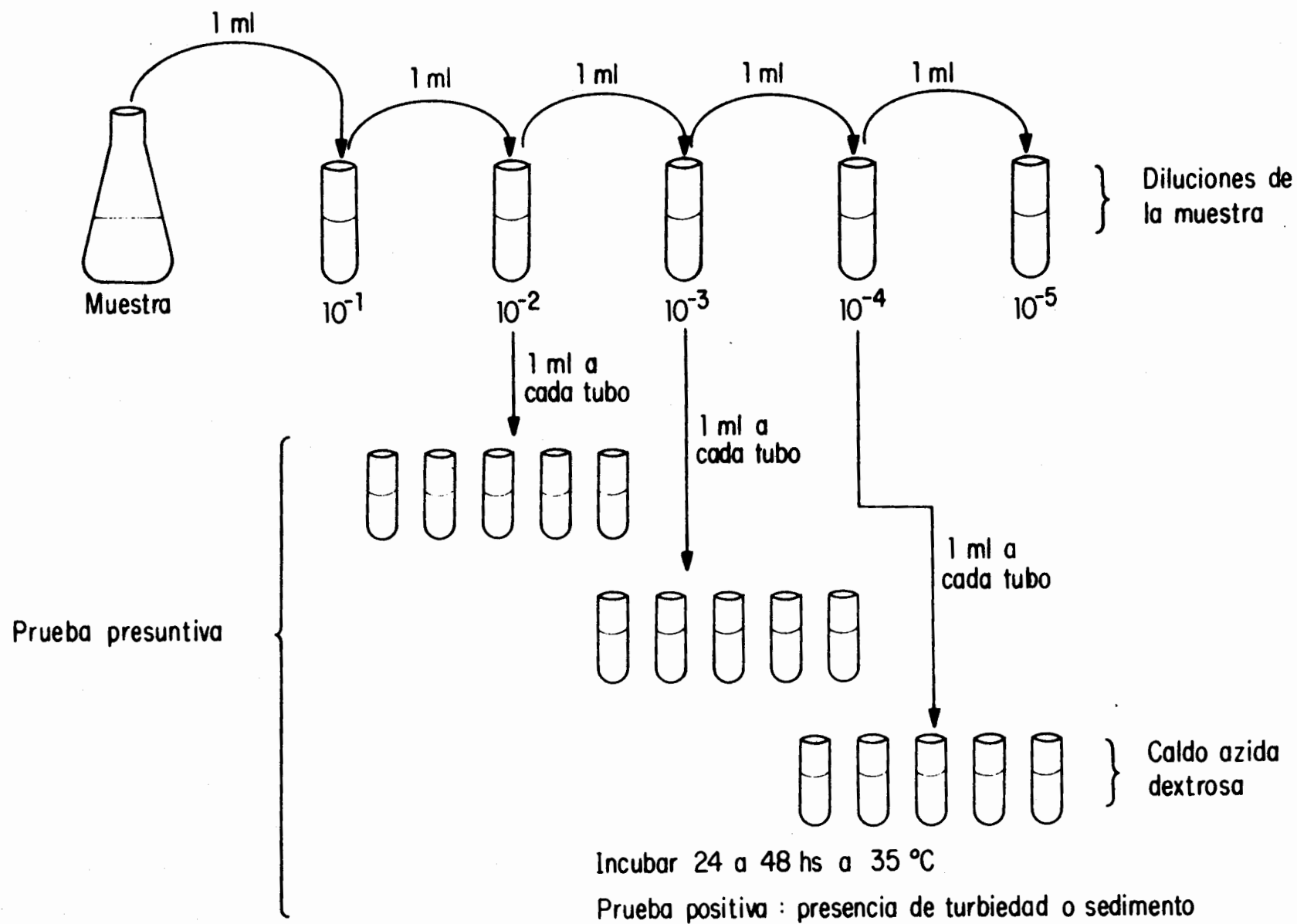
- 1.- Examine cada tubo después de las 24 horas para ver si hay presencia de turbiedad y si en el fondo se ha formado un sedimento. Vuelva a observar a las 48 horas los tubos que a las 24 horas dieron resultados negativos.
- 2.- Retenga todos los tubos positivos para la prueba confirmativa.
- 3.- Si al final del periodo 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 debe 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

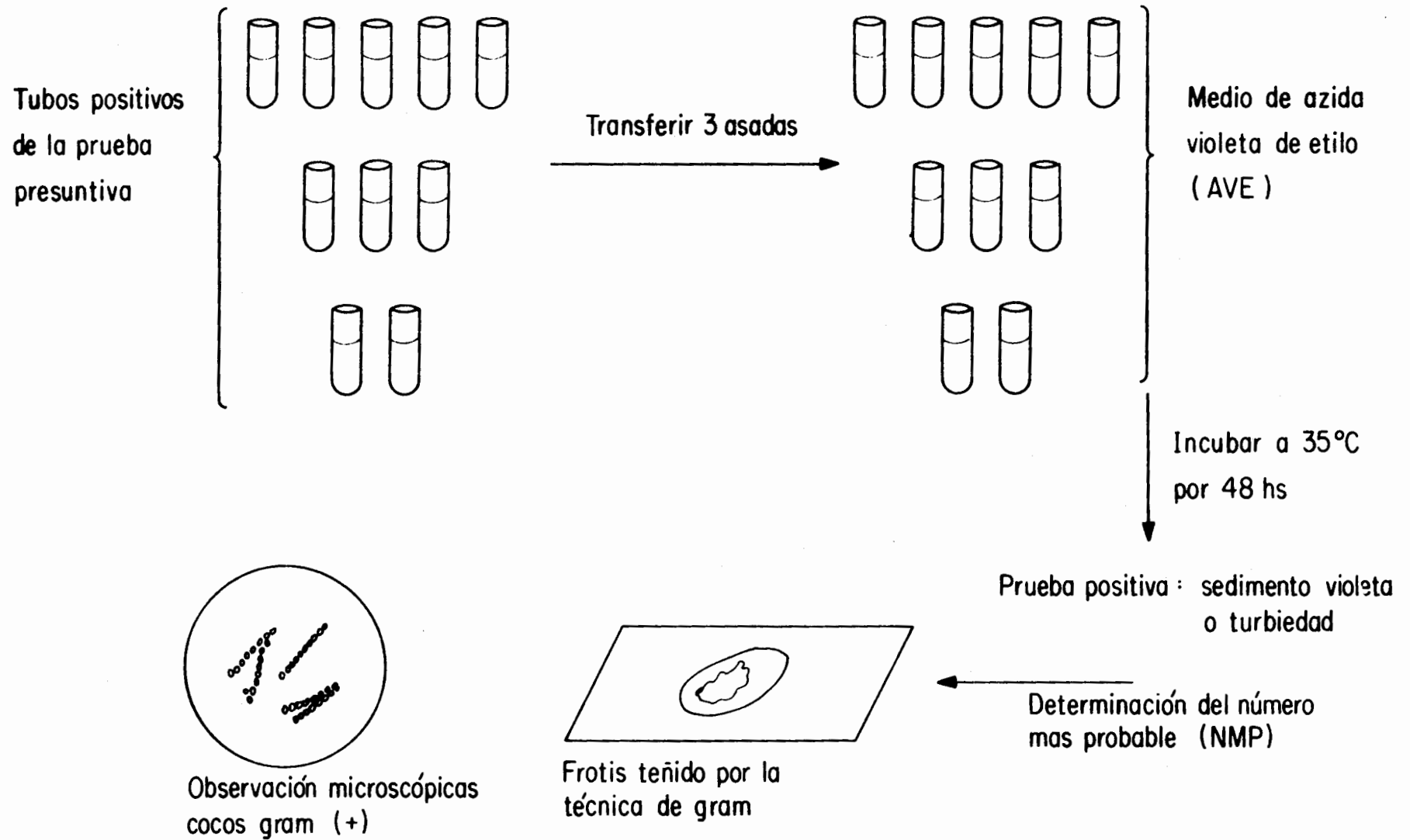


Fig 13.1 b) PRUEBA CONFIRMATIVA

RESULTADOS

La existencia de *Streptococcus faecalis* queda demostrada por la aparición 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 empleando 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 coloca 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 cuales 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 y tiene muchas ventajas y aplicaciones útiles como por ejemplo:

- A) Proporciona un medio para mejorar el control de la calidad del agua en las plantas potabilizadoras 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 comparado con la prueba de tubos múltiples; por lo tanto, posee gran sensibilidad en la identificación de coliformes, y
 - 3) consigue resultados definitivos en menor tiempo que con el procedimiento de tubos múltiples.
- B) Admite 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 en casos de desastres o de emergencias, como los que se llegan a 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) La modificación de esta técnica es particularmente valiosa en el control rutinario y trabajos de campo.

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 acepta que este método constituya una alternativa satisfactoria de la técnica de tubos múltiples de fermentación en caldo lauril sulfato de sodio:

- A) 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 consiga una indicación de confianza de la densidad de los coliformes y, también, interfiere con el desarrollo de las colonias características de bacterias coliformes durante la incubación.
- B) En aguas con una alta densidad de organismos no coliformes resulta excesivamente baja la relación de las estimaciones de densidad del filtro membrana con respecto a las del NMP. Estas discrepancias se deben a las características específicas de los microorganismos de las muestras, a la acción inhibitoria del medio, a peculiaridades del agua en ensayo tales como la presencia de iones de metales pesados u otras sustancias tóxicas o a temperaturas naturales elevadas.

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, ponga sobre el aparato de filtración, previamente esterilizado, la membrana.
- 3.- Después de agitar convenientemente la muestra, filtre el volumen apropiado sobre la membrana.

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

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

- 4.- Cierre la bomba de vacío y retire la membrana. A continuación, tome ésta con las pinzas y colóquela encima del disco absorbente impregnado del medio que está 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.

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.

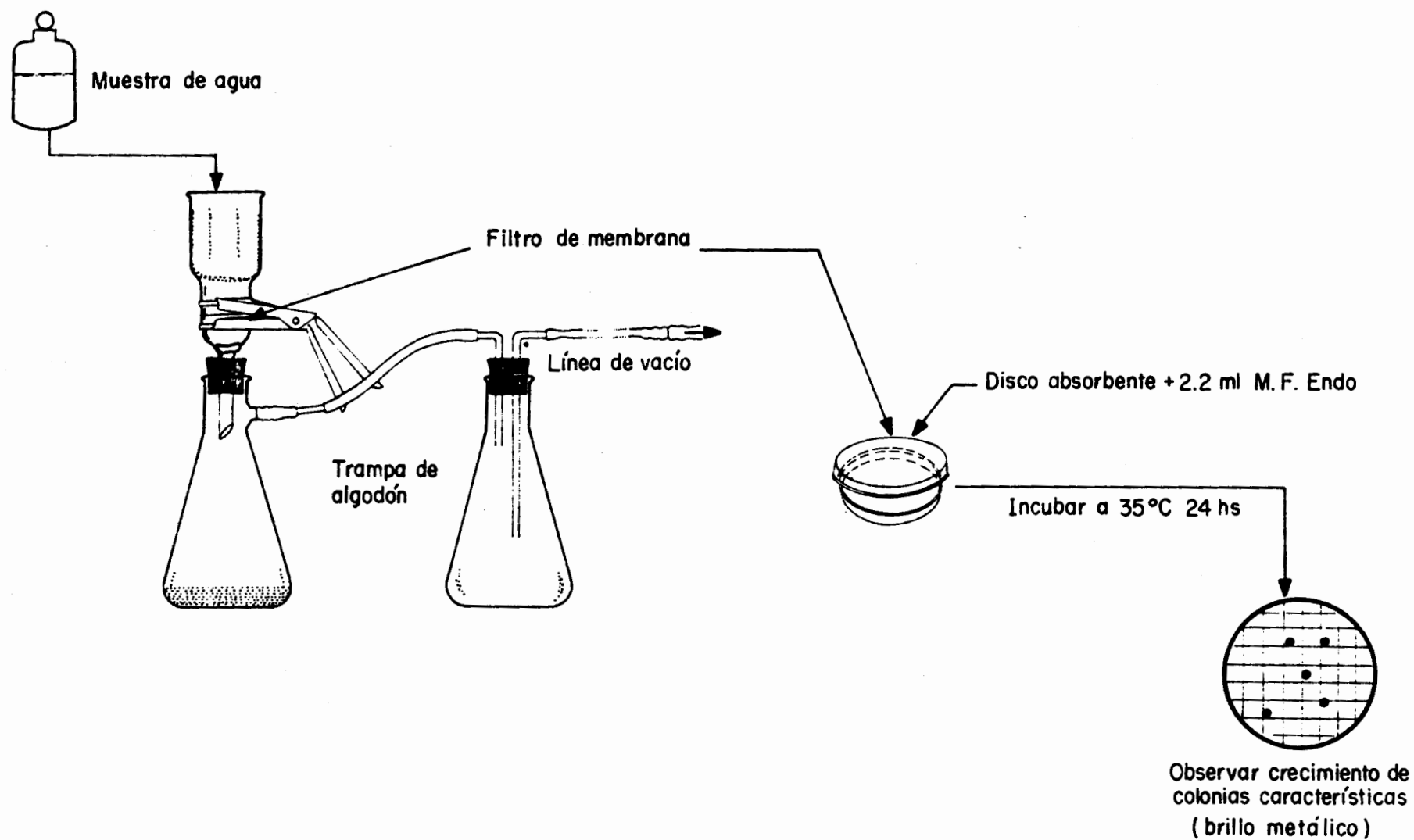


Fig 14.1 Determinación de coliformes por medio de la Técnica de Filtro de Membrana

PRACTICA 15

ANALISIS DE LIXIVIADOS Y COMPORTAMIENTO DE MICROORGANISMOS EN DIFERENTES TIPOS DE SUELOS

INTRODUCCION

Todos los desechos humanos y animales retornan a la tierra. Los microorganismos, juegan un papel fundamental en degradar las materias orgánicas de gran complejidad y transformarla en material inerte y mineral. Estos subproductos o nutrientes son aprovechados por los vegetales para su subsistencia y desarrollo.

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

El suelo tiene cinco constituyentes principales:

- a) Partículas minerales
- b) Residuos orgánicos
- c) Agua
- d) Gases
- e) Sistema biológico integrado por bacterias, hongos, algas, protozoos y virus.

Pocos ambientes tienen tanta variedad de microorganismos como el suelo, lo cual representa un obstáculo para calcular la población de una muestra de éste. Para tal fin, se utilizan técnicas 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. Sin embargo, en general podemos decir que ningún método por sí sólo revela la población microbiana absoluta.

- DESECHOS SOLIDOS

Los desechos sólidos causan problemas en el medio ambiente principalmente en lo que respecta 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 usados para la disposición final de los desechos sólidos se relacionan con:

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

El relleno sanitario, precisamente, aprovecha las propiedades del suelo (filtrabilidad y presencia de microorganismos) que degradan los desechos sólidos dispuestos en él. Es una de las técnicas más convenientes para la disposición de tales desechos y presenta la gran ventaja de que, comparativamente con las otras técnicas, los costos se reducen en forma apreciable y muestra condiciones ideales desde el punto de vista de la salud pública.

OBJETIVOS

Simular las condiciones existentes en un relleno sanitario. Después de un período, realizar un análisis del lixiviado cuantificando los microorganismos hallados. Filtrar el lixiviado haciéndolo pasar por diferentes medios. Establecer la eficiencia remocional de microorganismos con respecto a las condiciones iniciales y comparar los resultados obtenidos por cada uno de ellos (NMP y cuenta en placa).

PROCEDIMIENTO

- 1.- Con una muestra de basura de más o menos 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 de 332 ml para simular las condiciones reales de precipitación que hay en un relleno sanitario. Esto se hará durante un período de 60 días.**

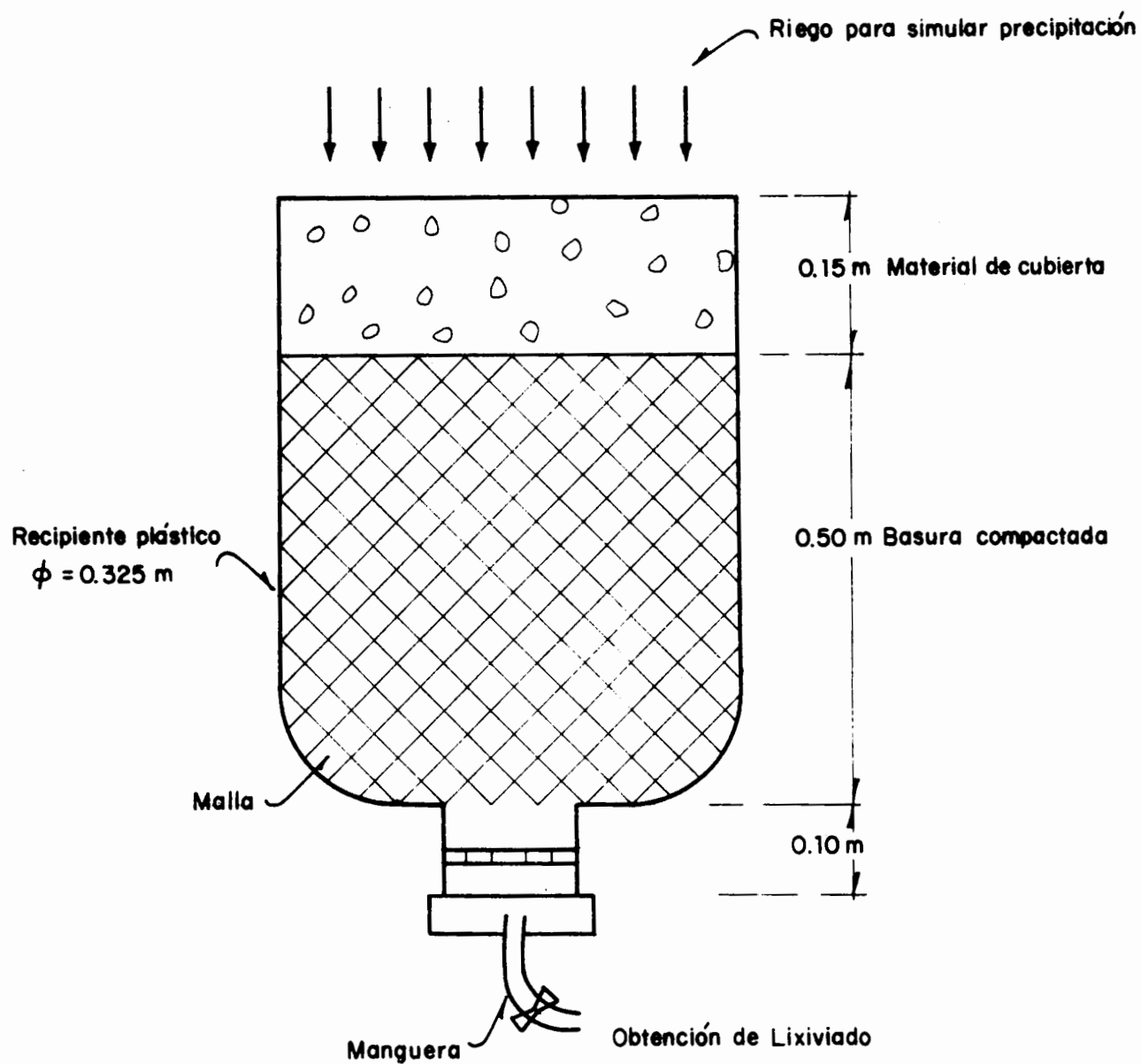


Fig 15.1 Modelo de simulación de un relleno sanitario

- 3.- El lixiviado que se obtenga a través de este proceso se irá desechando. El lixiviado final, o sea, el de después del período, será utilizado para el análisis y los pasos siguientes.
- 4.- De este lixiviado se harán pasar aproximadamente 250 ml por tres recipientes que contengan, cada uno, un medio filtrante distinto: arena, arena -tierra negra (50% - 50%) y tierra negra. Ver figura 15.2.

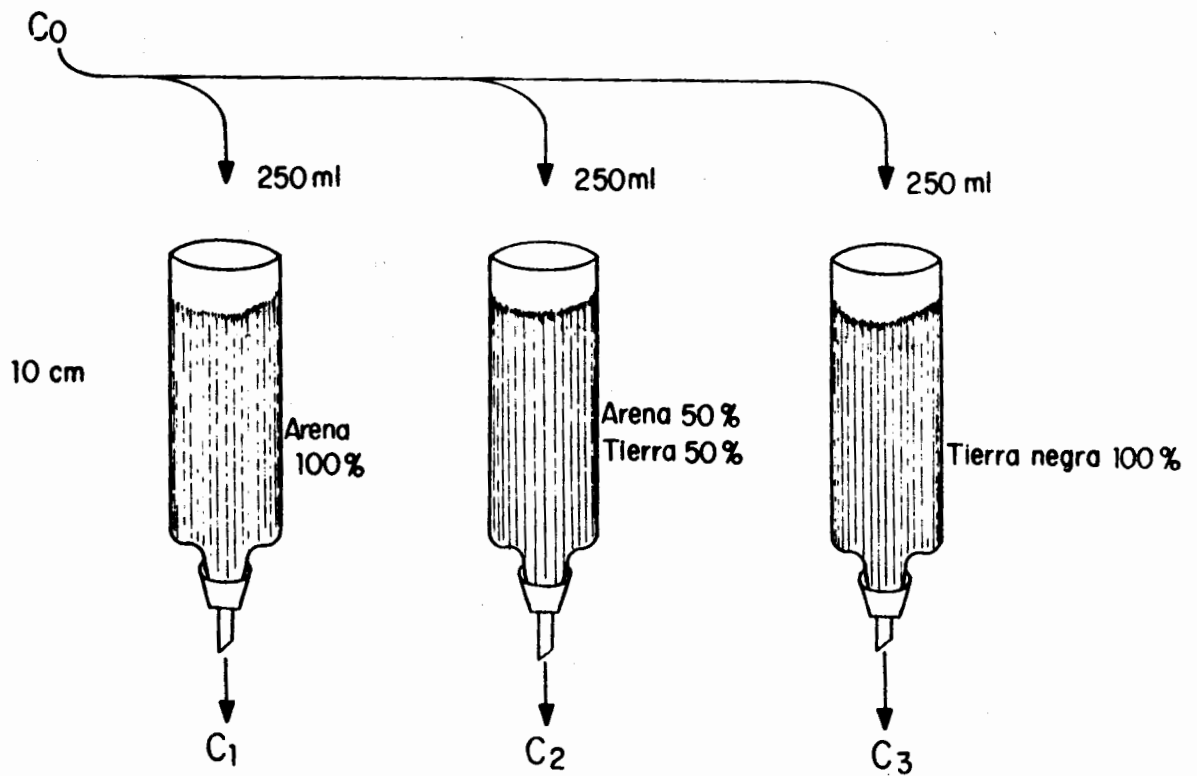
RESULTADOS

Tanto para la concentración inicial como para las muestras provenientes de filtrar por los diferentes medios (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 llevarán a cabo siguiendo el esquema 15.3 y se reportará empleando el formato de la tabla 15.1

C_0 = Concentración de lixiviado que entra



C_1, C_2, C_3 = Concentraciones finales del lixiviado filtrado

Fig 15.2 Columnas de filtración

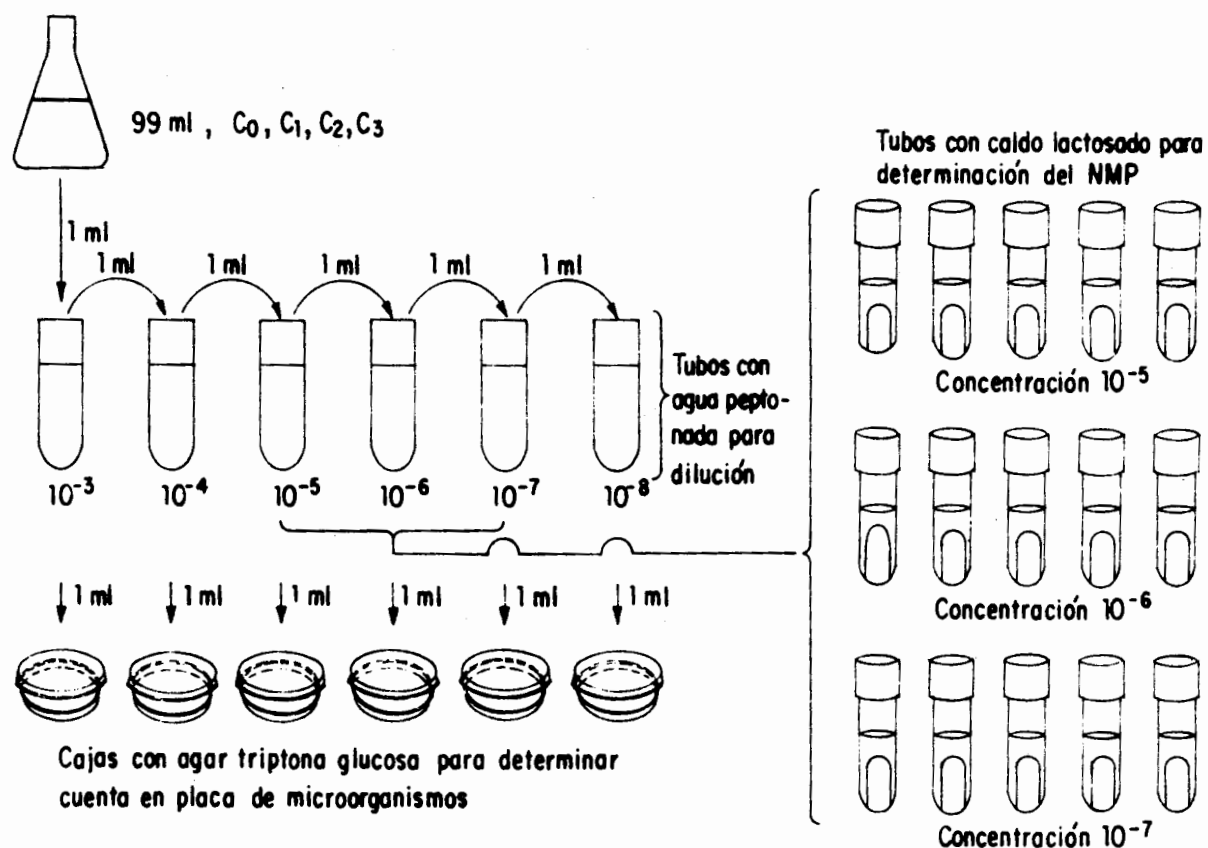


Fig 15.3 Procedimiento para análisis de lixiviados (C₀) y filtrados (C₁ , C₂ y C₃)

Tabla 15.1

Dilución Concentración	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 DE CULTIVO

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 (EMB).

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 total 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 absolutamente. 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 cabal 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

Suspender 23.0 g del polvo en 1 lt de agua destilada. Mezclar bien. Calentar suavemente agitando de cuando en cuando y hervir 1 ó 2 minutos hasta disolver completamente. 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)

Disolver 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. Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

CALDO ESCHERICHIA COLI

Tryptosa	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 caseína	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

Suspender 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

Disolver 8 g del polvo en 1 lt de agua destilada. Si es necesario, calentar. Esterilizar a 121 °C (15 lb de presión) durante 15 minutos.

CALDO PEPTONADO

Peptona	5.0 g
Dextrosa	5.0 g
Fosfato dipotásico (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 ($(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$)	1.0 g
Fosfato dipotásico (K_2HPO_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

Suspender 24.2 g de polvo en un litro de agua destilada.
Esterilizar en autoclave 15 minutos a 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 (K_2HPO_4)	4.375 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_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, disolver 48 g en 1 lt de agua destilada que contenga 20 ml de etanol. Calentar 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

Calentar y disolver el dicromato de potasio en agua, enfriar y agregar lentamente ácido sulfúrico concentrado hasta completar 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 debe quedar de color amarillo.

SOLUCION DE ALFA - NAFTOL

Alfa naftol purificado (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; añadir 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; después, mezclar las dos soluciones.

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 añadir 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 y 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 $(\text{NH}_4)_2 \text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	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.

ROHDE, 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.

Esta obra se terminó de imprimir en mayo de 1991 en los talleres de **Tesis Económicas Profesionales**, Campeche 156, Col. Roma. Tels.: 5 6 4 3 9 5 4 y 5 8 4 8 1 5 3, bajo la supervisión en la Sección Editorial de la Lic. Angélica Monroy López. El tiraje de esta edición fue de 200 ejemplares.

F/DEPFI/D-85/1991/EJ.5



711407