# MICROBIOLOGÍA APLICADA

## MANUAL DE LABORATORIO

María Teresa Castañeda Briones

Básicas

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Casa abierta al tiempo Azcapotzalco

# MICROBIOLOGÍA APLICADA

## MANUAL DE LABORATORIO

María Teresa Castañeda Briones

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Casa abierta al tiempo Azcapotzalco

División de Ciencias Básicas e Ingeniería
Departamento de Ciencias Básicas

# PREFACIO

La Microbiología es una ciencia que se encarga del estudio de los microorganismos, y ha logrado grandes avances como resultado de años de investigación, la cual está basada fundamentalmente en la observación y la experimentación.

Por lo anterior, considero que, para tener un mejor conocimiento y comprensión de la Microbiología, es absolutamente necesario contar con el apoyo del Laboratorio. La Microbiología tiene gran aplicación en diversas áreas tales como las siguientes: Médica, Agrícola, Industrial, Biotecnológica y Ambiental.

En esta última, cada vez está adquiriendo más importancia debido a la participación de los diferentes grupos de microorganismos en la problemática ambiental, no únicamente como contaminantes del ambiente e indicadores de contaminación, sino también por su gran influencia en la solución de diversos problemas de contaminación, ya que juegan un papel muy importante en procesos de Biorremediación por ejemplo en la biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos, metales, insecticidas o algún otro agente tóxico.

Para la elaboración de este Manual se seleccionaron técnicas de diferentes textos y Manuales de Microbiología, las cuales se organizaron y adecuaron al programa de la unidad de enseñanza aprendizaje (uea ) de Microbiología Aplicada que forma parte del Plan de Estudios de la Licenciatura de Ingeniería Ambiental de la UAM-A, por lo que este Manual está dirigido a los alumnos de la uea de Laboratorio de Microbiología Aplicada de dicha licenciatura. En él se incluyen prácticas de Microbiología Básica y de Microbiología Aplicada, haciendo énfasis en el análisis microbiológico del agua.

Con el desarrollo de las prácticas que integran este Manual el alumno se familiarizará con el uso del microscopio, preparación de extensiones y su tinción, preparación, esterilización y distribución de medios de cultivo, algunos métodos de control de los microorganismos, diferentes técnicas de aislamiento de microorganismos aerobios y anaerobios y su identificación, así como también con la determinación de diversos indicadores de contaminación fecal del agua y otras técnicas de laboratorio que permitirán conocer el grado de contaminación microbiológica en aire, agua y residuos sólidos.

De manera general se puede trabajar simultáneamente en 2 prácticas por sesión de laboratorio, por lo tanto, el tiempo dedicado al curso es el adecuado.

Para lograr lo anterior, tengo una recomendación muy importante para los alumnos: **"Leer las prácticas que se van a realizar en cada sesión, antes de llegar al Laboratorio"**, de tal forma que se pueda aprovechar más eficientemente

el tiempo. Igualmente les recomiendo que revisen las figuras y tablas, así como también los apéndices correspondientes lo cual les será de gran utilidad en el desarrollo de las prácticas.

Por otra parte quiero manifestar mi agradecimiento al I.Q. Jorge Ruíz Sánchez, quien me señaló algunos errores, los cuales se pudieron corregir oportunamente. Asimismo agradezco a mis hijos Ismael y Marisol y a la D.G. Blanca Hortensia Rodríguez Rodríguez por su valioso apoyo en la preparación del manuscrito original de este Manual.

MARIA TERESA CASTAÑEDA BRIONES.

| | | |
|---|---|---|
| 17. | Coliformes totales y fecales en agua de consumo humano | 110 |
| 18. | Investigación de coliformes totales y fecales en agua residual | 127 |
| 19. | Determinación de estreptococos fecales en agua | 137 |
| 20. | Determinación de clostridios sulfito reductores en agua | 144 |
| 21. | Recuento de indicadores de contaminación fecal en agua mediante filtración por membrana | 150 |
| 22. | Investigación de coliformes totales y fecales en desechos sólidos y composta | 163 |
| 23. | Determinación de bacterias sulfatorreductoras en agua | 170 |
| 24. | Investigación de protozoos y helmintos patógenos en agua | 173 |

| | **Pág.** |
|---|---|
| **APÉNDICE A :** Composición y preparación de medios de cultivo | 181 |
| **APÉNDICE B :** Preparación de colorantes | 205 |
| **APÉNDICE C:** Preparación de soluciones y reactivos | 211 |
| **BIBLIOGRAFÍA** | 219 |

## CONTENIDO

Prefacio .....V

Reglamento de laboratorio de microbiología.....VII

Equipo indispensable en el laboratorio de microbiología.....IX

Material indispensable en el laboratorio.....XI

| Práctica Núm. | Titulo | Pág. |
|---|---|---|
| 1. | El microscopio | 1 |
| 2. | Distribución de los microorganismos en la naturaleza | 14 |
| 3. | Preparaciones de extensiones o frotis y tinción simple | 22 |
| 4. | Tinción diferencial de Gram | 27 |
| 5. | Tinción de endosporas por la técnica de Schaeffer y Fulton | 31 |
| 6. | Tinción de flagelos bacterianos por el método de Leifson | 35 |
| 7. | Esterilización por calor seco y calor húmedo | 42 |
| 8. | Desinfección de agujas hipodérmicas por ebullición | 46 |
| 9. | Medios de cultivo | 49 |
| 10. | Antisepsia de la piel | 57 |
| 11. | Resiembra de tubo a tubo | 60 |
| 12. | Aislamiento de microorganismos a partir de un cultivo mixto y obtención de un cultivo axénico | 64 |
| 13. | Metabolismo bacteriano | 73 |
| 14. | Aislamiento de bacterias anaerobias formadoras de esporas a partir de suelo de jardín | 84 |
| 15. | Aislamiento e identificación de mohos del aire | 90 |
| 16. | Recuento de bacterias mesófilas aerobias en agua de consumo humano | 104 |

## REGLAMENTO DEL LABORATORIO Y ALGUNAS MEDIDAS DE SEGURIDAD DENTRO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

1. No se permitirá la entrada al laboratorio a los alumnos que lleguen 15 minutos después de la hora señalada.

2. Queda prohibida la entrada a personas ajenas al laboratorio.

3. Ningún alumno debe salir del laboratorio durante el tiempo que dure la práctica, sin previa autorización del profesor.

4. Por ningún motivo se permitirá a los alumnos trabajar en el laboratorio mientras no tengan puesta su bata blanca y limpia, así como también sus lentes de seguridad, cubreboca, cofia y guantes de cirujano estériles.

5. Al alumno que no venga provisto del material necesario que le corresponde, de acuerdo con la práctica a realizar durante las sesiones de laboratorio, no se le permitirá permanecer en el laboratorio.

6. No colocar objetos personales que no vayan a ocupar durante la sesión de laboratorio sobre la mesa de trabajo. Usar los cajones de sus gavetas.

7. No tirar basura o material no contaminado como algodón, papeles, cerillos u otro al suelo, ni guardarla en los cajones de las gavetas, ni en los vertederos; éstos deberán ser depositados en los botes destinados para ello.

8. Es muy importante lavarse las manos con agua y jabón antes de empezar a trabajar y al abandonar el laboratorio.

9. Antes de empezar y al terminar de trabajar, deberá limpiarse la mesa de laboratorio, primero con una franela húmeda para eliminar el polvo y enseguida con algodón humedecido en solución desinfectante.

10. Queda estrictamente prohibido comer, beber, fumar y en general llevarse objetos a la boca tales como el lápiz, bolígrafo o algún otro, dentro del laboratorio.

11. Queda estrictamente prohibido pipetear con la boca las muestras para análisis, soluciones ó reactivos.

12. Aun cuando en el laboratorio no se manejan microorganismos patógenos, pudiera en un momento dado estar presente alguno o algunos de ellos en cualquiera de las muestras a analizar, por lo cual es recomendable que los alumnos cuenten con las vacunas necesarias para evitar algún tipo de infección. De esto se hará cargo el propio alumno.

13. No se permitirá al alumno hablar dentro del laboratorio durante el desarrollo de las prácticas sin tener puesto el cubreboca, para evitar todo tipo de contaminación cruzada sobre todo en los cultivos puros.

14. No colocar tubos acostados sobre la mesa de trabajo, utilizar siempre una gradilla para ello.

15. En caso de romper o derramar material contaminado, verter sobre éste, solución de fenol al 5% y dejarla actuar por 15 minutos antes de limpiar. Notificar al profesor o al ayudante cuando esto suceda.

16. Mantener siempre separado el material sucio para esterilizar, material sucio para lavar y el material limpio, con su respectivo rótulo.

17. No lavar el material contaminado sin antes haberlo esterilizado.

18. Antes de esterilizar, ya sea en autoclave o en horno de calor seco, se deberá quitar al material todo tipo de etiquetas.

19. Al esterilizar en autoclave tubos, matraces o frascos con tapón de rosca, aflojar éstos ligeramente para lograr una mejor penetración del calor.

20. No conservar en incubación o en refrigeración frascos, tubos, cajas de Petri o algún otro material, sin rotularlos debidamente con el contenido, nombre del alumno o número de equipo y fecha, de lo contrario será desechado

21. No almacenar material innecesario en el refrigerador.

22. Al finalizar la sesión, cada alumno es responsable de la limpieza adecuada de su área de trabajo, así como de la tarja que usa.

23. Si un alumno rompe o extravía material, está obligado a reponerlo nuevo, debiendo mostrar la nota de compra correspondiente.

24. Los alumnos deberán leer previamente la o las prácticas que se realizarán durante cada sesión, debiendo presentar un diagrama de flujo de las mismas al llegar al laboratorio.

25. Los reportes de las prácticas concluidas deberán entregarse el día señalado para ello, dentro del horario de laboratorio, escritos a máquina o en computadora y en un fólder limpio. No escribir nada con lápiz.

26. Cada día de retraso en la entrega de los reportes, implicará un punto menos en la calificación.

**NOTA:**

El incumplimiento de este Reglamento repercutirá en la calificación de laboratorio.

## EQUIPO INDISPENSABLE EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

- Microscopios
- Autoclaves
- Horno esterilizador de calor seco
- Estufa para secado de material
- Horno de vacío
- Incubadoras
- Baño incubador a 44 °C (± 0.5°C) para coliformes fecales
- Baño de agua, con control de temperatura
- Refrigeradores
- Balanza granataria
- Balanza analítica
- Medidor de pH
- Campana de extracción de gases
- Campana de flujo laminar
- Incinerador para esterilizar asa bacteriológica
- Centrífuga de alta velocidad
- Centrífuga de baja velocidad
- Equipos de filtración Millipore
- Filtros *Seitz*
- Espectrofotómetro
- Bombas de vacío

- Cuentacolonias *Quebec*
- Jarras de anaerobiosis
- Parrillas de calentamiento con agitación magnética
- Agitadores Vortex
- Agitador orbital para matraces, botellas y tubos
- Fermentadores (biorreactores)
- Densímetro
- Turbidímetro
- Termómetros
- Picnómetros
- Lámpara de luz ultravioleta
- Rotavapor
- Licuadoras de 2 velocidades
- Muestreadores para agua
- Hidrómetro

## MATERIAL INDISPENSABLE EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA APLICADA

- Bata blanca y limpia
- Asa bacteriológica
- Portaobjetos con y sin excavación
- Cubreobjetos
- Pinzas de disección
- Pinzas para crisol
- Pinzas con punta plana, para membrana millipore
- Pinzas de Mohr
- Tijeras con punta roma
- Mechero Bunsen
- Mechero Fisher
- Manguera de látex
- Lámparas de alcohol
- Tripiés
- Telas de asbesto
- Baños María
- Gradillas para tubos de diferentes dimensiones
- Canastillas de polipropileno y de aluminio
- Cajas Petri de vidrio, de diferentes dimensiones
- Cajas Petri estériles, desechables
- Porta cajas Petri de acero inoxidable
- Tubos de ensayo de diferentes dimensiones
- Campanas Durham
- Tubos para centrífuga
- Matraces Erlenmeyer de diversos volúmenes
- Matraces Kitasato de 1 y 2 L
- Matraces volumétricos de diferentes volúmenes
- Vasos de precipitado de diferentes volúmenes
- Vasos para licuadora resistentes al autoclave
- Vidrios de reloj
- Probetas de diferentes volúmenes
- Buretas de diferentes volúmenes
- Soportes para bureta
- Pinzas para bureta
- Pipetas graduadas de 10, 5, 2 y 1 mL
- Pipetas volumétricas de diferentes volúmenes
- Pipetas Pasteur

- Micropipetas de diferentes volúmenes
- Pipeteros de aluminio o de acero inoxidable
- Propipetas de tres vías
- Soporte para realizar tinciones
- Embudos de separación
- Embudos de filtración rápida
- Papel filtro
- Membranas de filtración millipore (Tamaño de poro = 0.45 μm)
- Membranas de asbesto para filtro *Seitz* de diferente tamaño de poro
- Agitadores de vidrio
- Espátulas de diferentes tamaños
- Bisturí
- Tapones de hule
- Pisetas
- Botellas de *Roux*
- Botellas *Winkler*
- Frascos para reactivos de diferentes volúmenes, con tapón esmerilado
- Frascos gotero
- Frascos de boca ancha resistentes al autoclave, para toma de muestras
- Frascos de vidrio o de polipropileno resistentes al autoclave de 1 L y 300 mL
- Cápsulas de porcelana
- Crisoles *Gooch*
- Desecador
- Morteros
- Cerillos o encendedor
- Algodón
- Gasa (no estéril)
- Rollo de Masking tape
- Lápiz graso
- Marcador indeleble
- Caja de colores
- Tapa de un frasco o un compás para dibujar círculos.
- Detergente
- Jabón y jabonera
- Escobillones para lavar tubos de 30 x 200, 18 x 150 y 13 x 100 mm
- Fibra *Scotch Brite* (verde) con esponja, para lavar cajas Petri
- Caja de aplicadores
- Franela de cualquier color (60 x 50 cm aprox.)
- Rollo de papel sanitario
- Papel aluminio

- Papel parafilm
- Papel de estraza para envolver material
- Toallas de papel
- jeringas
- Cubrebocas
- Guantes de cirujano estériles
- Cofias
- Lentes de seguridad
- Libreta de pasta gruesa de 100 hojas forma francesa (Bitácora)

**NOTA:**
Del listado anterior, los alumnos deberán de proveerse de algún material en forma individual, otro por equipo y el resto será proporcionado en el laboratorio:

**Individual:**

- Bata blanca y limpia
- Asa bacteriológica
- Cerillos o encendedor
- Cubrebocas
- Guantes de cirujano estériles
- Cofias
- Lentes de seguridad
- 1 Caja de colores
- 1 Tapa de un frasco o un compás para dibujar círculos
- Libreta de pasta gruesa de 100 hojas forma francesa (Bitácora)

**Por equipo:**

- 1 Caja de cubreobjetos
- 1 Pinzas de disección
- 1 Pinzas con punta plana, para membrana millipore
- 1 Tijeras con punta roma
- 1 Propipeta de tres vías
- 3 Frascos gotero de 60 mL
- 3 Frascos de boca ancha resistentes al autoclave, para toma de muestras
- 500 g de Algodón
- 1 Paquete de Gasa (no estéril)

- 2 Rollos de Masking tape
- 1 Lápiz graso
- 1 Marcador indeleble
- 1 Kg de detergente
- 1 Jabón y jabonera
- Escobillones para lavar tubos de 30 x 200, 18 x 150 y 13 x 100 mm, 1 de cada uno.
- 1 Fibra *Scotch Brite* (verde) con esponja, para lavar cajas Petri
- 1 Franela de cualquier color (60 x 50 cm aprox.)
- 1 Rollo de papel sanitario
- 1 Kg de papel de estraza para envolver material
- 3 Paquetes o rollos de toallas de papel para secarse las manos.
- 3 Jeringas desechables (de 10, 5 y 3 mL)

# PRÁCTICA Núm. 1

# EL MICROSCOPIO

## I. OBJETIVO

Conocer sus partes y su función, así como el cuidado, manejo y utilidad en el Laboratorio de microbiología.

## II. INTRODUCCIÓN

El microscopio es indispensable en el Laboratorio de Microbiología para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como su reacción a diferentes colorantes, lo cual junto con otros criterios, permitirá su identificación, por lo tanto, es importante conocer su adecuado manejo.

Anthony van Leeuwenhoek, en 1676, gran apasionado en pulir lentes que utilizaba para examinar gran variedad de materiales, fue el primero en observar bacterias y protozoarios en agua de lluvia, en infusiones diversas y en su sarro dental.

La máxima amplificación que logró Leeuwenhoek en los diversos microscopios que construyó fue de 300 diámetros.

La perfección del moderno microscopio compuesto facilita el estudio de la morfología de microorganismos y de algunas de las grandes estructuras de la célula bacteriana.

A finales del siglo XIX surgieron avances importantes en microscopía, período de gran progreso en Microbiología.

## TIPOS DE MICROSCOPIO

### Simple

Los primeros microscopios, construidos por Leeuwenhoek alrededor de 1675, eran simples, es decir, contenían sólo una lente o lupa.

### Compuesto

Tiene varias lentes combinadas, capaces de producir gran aumento (Figura 1.1).

## MICROSCOPÍA ÓPTICA

Se usa para aumentar el tamaño de la imagen aparente de los objetos, lo cual permite observar los detalles estructurales de los microorganismos. Con la microscopía óptica se pueden lograr aumentos de 100 a 1,000 diámetros y, en algunos casos, hasta 2,000, según el tipo de luz que se utilice y la forma de iluminar el objeto en estudio o preparación.

Los microscopios ópticos pueden ser de varios tipos, siendo el microscopio óptico de campo claro, el más utilizado en microbiología. En la microscopía de campo claro, el campo microscópico está brillantemente iluminado y los objetos en estudio aparecen más oscuros en el fondo.

El microscopio óptico normal que se usa para observar bacterias y otros organismos celulares es un microscopio compuesto, el cual está provisto de una fuente luminosa, una lente condensadora de luz que la dirige hacia el objeto a observar y dos juegos de lentes que ayudan a la amplificación de la imagen.

A través de la refracción o reflexión de los rayos luminosos mediante el sistema de lentes del microscopio, se forma la imagen del objeto, que es más grande que el objeto mismo, permitiendo el examen de sus estructuras en detalle.

Existen varios aditamentos que utilizados en el microscopio óptico ordinario, aumentan mucho su rendimiento como instrumento de observación, por ejemplo microscopio en campo oscuro (ultramicroscopio), microscopio de contraste de fases, microscopio de fluorescencia, microscopio de luz ultravioleta, microscopio de interferencia, microscopio de contraste de interferencia diferencial de nomarski.

## AMPLIFICACIÓN

La capacidad amplificadora de un microscopio compuesto es el producto del aumento individual de los oculares y los lentes objetivos. Un microscopio típico que se usa en bacteriología tiene objetivos con poder de resolución de 10X, 40X y 100X y ocular de 10X, por lo cual es capaz de amplificar la imagen de la muestra 100, 400 y 1000 veces.

En un aumento de 1000X, las bacterias y microorganismos grandes se pueden visualizar muy bien, pero los virus y muchos de los detalles finos de las estructuras bacterianas no se pueden ver.

## PODER DE RESOLUCIÓN

La resolución se define como el espacio de máxima aproximación entre dos puntos en el que aún se pueden observar claramente como dos entidades independientes, es decir, es la distancia entre dos entidades estructurales de un objeto en la cual todavía se pueden observar como estructuras separadas en la imagen amplificada.

El poder de resolución de un microscopio está sujeto a la longitud de onda de la luz y a la propiedad de las lentes conocidas como la apertura numérica (AN). El límite del poder de resolución de un microscopio es aproximadamente igual a 0.61/AN, que para un microscopio óptico es de alrededor de 200 nm (nanómetros).

A menor longitud de onda de la luz y AN de las lentes, será mejor el poder de resolución del microscopio. Por lo tanto, queda claro que el poder de resolución de los microscopios ópticos se encuentra restringido por AN que se obtenga de los sistemas de lentes y las longitudes de onda del espectro de luz visible.

## APERTURA NUMÉRICA

Esta expresión, que suele abreviarse AN, indica la cantidad de luz que entra en un objetivo desde un punto del campo del microscopio. Tal valor es de suma importancia, ya que, como se dijo anteriormente, de él depende el poder de resolución, la propiedad más importante de un objetivo.

La AN de una lente depende del índice de refracción (N) del medio que llena el espacio entre el objeto y la parte frontal del objetivo, y del ángulo ($\mu$) de los rayos de luz más oblicuos que puedan entrar al objetivo. La fórmula para calcular la AN es:

$$AN = N \times \text{sen}\ \mu/2$$

El aire tiene un índice de refracción de 1.0, que limita la resolución que se puede obtener, pero se puede incrementar la AN poniendo aceite de inmersión entre el espécimen y el objetivo, aumentando así el poder de resolución del microscopio.

El aceite de inmersión tiene un índice de refracción de 1.5, lo que aumenta considerablemente la AN y esto mejora el poder de resolución del microscopio.

## MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

Con el uso del microscopio electrónico la amplificación de la imagen se obtiene mediante un haz de electrones el cual sustituye a la luz, y un campo magnético que hace las veces de lentes, lográndose aumentos de 200,000 a 400,000 diámetros.

Debido a sus posibilidades para obtener imágenes claras de los objetos más diminutos, ha permitido contribuciones de la mayor importancia, sobre todo en el estudio de la constitución y ciclos vitales de los virus filtrables.

El poder de resolución del microscopio electrónico es mucho mayor que el del microscopio óptico, pudiéndose incluso observar estructuras moleculares como proteínas y ácidos nucleicos, pero debido a que los haces electrónicos poseen bajo poder de penetración, es necesario emplear técnicas especiales para la obtención de cortes ultra finos que permitan la observación de las muestras.

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos:

El microscopio electrónico de transmisión (MET) y el microscopio electrónico con barrido (MEB) (Figura 1.2).

Para el estudio de las estructuras internas de las células es esencial un MET.

En el MET se utilizan electrones en lugar de rayos de luz, y la función de las lentes la realizan electromagnetos, operándose en todo momento a alto vacío.

Cuando sólo se pretende estudiar las estructuras externas de una muestra, no son necesarios cortes ultrafinos, pudiéndose realizar la observación directa en MET después de aplicar una tinción negativa. También se puede usar el MEB.

Todos los microscopios electrónicos tienen cámaras incorporadas que permiten fotografiar las muestras y obtener microfotografías electrónicas.

## MÉTODOS DE MICROSCOPÍA

### Examen de organismos vivos

La forma más simple de examinar las bacterias y otros microorganismos vivos es suspenderlos en agua u otro líquido, colocar una gota de esta suspensión en un portaobjetos ordinario y encima un cubreobjetos, utilizando para su observación al

microscopio los objetivos seco débil y seco fuerte. Existen otros métodos como son el de gota pendiente y el microcultivo.

**Examen de bacterias teñidas**

La forma y estructura de las bacterias se revelan con más claridad cuando son desecadas sobre un portaobjetos y posteriormente coloreadas o examinadas contra un fondo teñido. Existen diversas técnicas de tinción.

## PARTES DEL MICROSCOPIO COMPUESTO DE CAMPO CLARO Y SU FUNCIÓN

### SISTEMA MECÁNICO

**Base, soporte, brazo y cuerpo del tubo**

Sirven para mantener en posición las partes ópticas esenciales. Estas partes son gruesas y fuertes, para disminuir la vibración.

**Tubo intercambiable**

Se encuentra insertado en la parte superior del cuerpo del tubo. Soporta el ocular y su función es ajustar la longitud mecánica del tubo, es decir, la distancia entre la lente del ocular que está arriba y la unión del objetivo al revólver, que está abajo.

**Platina**

Parte del microscopio donde se coloca la muestra que va a ser examinada.

**Pinzas de la platina**

Sirven para sujetar la muestra a examinar.

**Tornillos para desplazar la platina**

Sirven para mover la muestra que está sobre la platina, hacia arriba, abajo, derecha o izquierda, lo cual facilita la localización del objeto hasta enfocar el campo adecuado, así como también permite la revisión de toda la preparación.

**Revólver**

Es el disco que soporta a los objetivos, éste se gira para colocar el objetivo requerido bajo el tubo.

**Tornillos macrométrico y micrométrico**

Sirven para enfocar, logrando que la muestra se vea nítida y clara, ya que permiten subir y bajar todo el cuerpo del tubo junto con sus lentes y en microscopios modernos, junto con la platina.

El tornillo macrométrico permite un enfoque aproximado y el micrométrico el enfoque exacto y preciso.

## SISTEMA ÓPTICO

**Fuente de luz**

Se encuentra colocada debajo del objeto; emite la luz que pasa por el condensador, para después iluminar la preparación.

Algunos microscopios tienen integrado a la lámpara un diafragma, el cual se abre o cierra para regular la intensidad de la luz; en otros únicamente se regula el voltaje.

**Condensador**

Antes de que la luz alcance la muestra en la platina, se condensa y enfoca a través de una gran lente condensadora que se halla bajo la platina.

**Diafragma iris**

Sirve para controlar la luz a través del condensador, regulando el paso de luz a la preparación para dar nitidez a la imagen.

**Objetivos**

Son las lentes que tiene como función delimitar el tamaño de la imagen. La mayoría de los microscopios tienen tres objetivos que proporcionan diferentes aumentos:

**♦Objetivo de pequeño aumento o "seco débil"**

Útil para observar microorganismos grandes, por ejemplo Protozoarios. Abarca un campo microscópico con una superficie mayor. Este objetivo está marcado con un "3" ó "2/3", que significa 2/3 de pulgada ó 16 mm.

También está marcado como 10X. Tiene una lente en el extremo mucho más grande que cualquiera de los otros objetivos.

**♦Objetivo de gran aumento o "seco fuerte"**

Éste se usa para el examen de microorganismos vivos suspendidos en gotas de agua u otros líquidos. Está marcado con "6" ó "1/6" que significa 1/6 de pulgada o 4 mm. También está marcado como 45X ó 50X. La lente del extremo es de menor tamaño que la del seco débil.

**♦Objetivo de inmersión en aceite**

Éste es indispensable para el examen de frotis de bacterias, teñidos. La lente visible del extremo es mucho más corta que la de los objetivos secos.

Este objetivo está marcado **"oil inmer"** u **"homog inmer"** que significa inmersión homogénea. También está marcado "1/12" (1/12 de pulgada, 1.9 mm, 1.8 mm) y con 97X ó 100X.

Las marcas 10X, 45X y 97X con que suelen estar marcados los objetivos del microscopio corresponden a la potencia amplificadora, y las letras "N.A." a la apertura numérica.

Mientras mayor sea la cifra "N.A.", mayor será el detalle que revele el objetivo.

Las cifras 16 mm, etc., en los objetivos, se refieren a lo que se llama distancia focal equivalente, o sea, nos da una idea de la distancia que deberá haber entre el extremo del objetivo y la muestra al enfocarse.

Cuando el microscopio es parafocal, las distintas lentes están ajustadas de tal manera que al enfocar el objeto de estudio con una lente, así permanece al cambiar a otros objetivos. De esta manera, se puede enfocar con el objetivo de menor aumento y cambiar a los objetivos de mayor aumento sin volver a enfocar.

## Oculares

Son tubos cortos, cada uno con dos lentes que se encuentran insertados en los tubos intercambiables. La función de éstos es amplificar la imagen del objeto formado por el objetivo y permite que ésta sea percibida por el ojo.

Los oculares están marcados "5X", "10X", etc. indicando que amplían la imagen del objetivo 5 veces, 10 veces, etc.

Cuando se utiliza el ocular 10X con el objetivo de pequeño aumento (10X) da una amplificación final de 100 veces.. El de 50X dará una amplificación final de 500 veces y el de 100X una amplificación final de 1000 veces.

## CUIDADO Y MANEJO DEL MICROSCOPIO

1. Para transportar el microscopio a la mesa de trabajo deberá tomarse del brazo con la mano derecha y de la base con la mano izquierda y en posición vertical.

2. Antes y después de usarlo, limpiar perfectamente la fuente de luz del microscopio, parte superior del condensador, oculares y objetivos con vaho y frotando suavemente con papel seda o con un pincel suave libre de grasa. Si no basta el agua del vaho, puede usarse una pequeñísima cantidad de éter muy puro, pero nunca alcohol ni otros disolventes, porque pueden disolver el pegamento de las lentes.

3. Limpiar el sistema mecánico con un paño que no suelte pelusa, perfectamente limpio y humedecido con agua destilada y después secar completamente.

4. Mantener el microscopio retirado de la orilla de la mesa.

5. No encender la fuente de luz, sino hasta que se vaya a usar.

6. Evitar girar el revólver de los objetivos sin antes bajar la platina. Recordar que el objetivo 45X es más largo que el de 10X y más todavía que el de inmersión, por lo que deberá tenerse cuidado, pues si llegan a rozar la platina, ésta los inutilizará permanentemente.

7. Colocar la muestra sobre la platina y girar el revolver para colocar el objetivo que se va a usar haciéndolo en la posición correcta mientras que se observa el material.

8. Ver por el ocular y controlar la cantidad de luz adecuada, moviendo el condensador y diafragma.

9. Para enfocar con el objetivo seco débil (10X), subir al máximo la platina con el uso del tornillo macrométrico, sin forzarlo, luego enfocar primero con el tornillo macrométrico y una vez que se ha localizado el campo, usar el tornillo micrométrico para enfocar con mayor precisión, ajustando la distancia interpupilar (distancia entre los ojos).

10. Cuando se vaya a utilizar el objetivo seco fuerte (45X), hacer primero el enfoque de la preparación con el objetivo seco débil, luego, girar el revólver de tal manera que el siguiente objetivo sea el seco fuerte, observar lateralmente, cuidando que la lente no choque con la preparación. Ajustar el enfoque usando el tornillo micrométrico.

11. Con respecto al objetivo de inmersión, si se cambia de un objetivo seco a éste, hay que tener mucho cuidado, ya que la distancia focal es muy corta y habrá que emplear únicamente el tornillo micrométrico y no el macrométrico debido a que se puede dañar la preparación y la lente del objetivo.

12. Para utilizar el objetivo de inmersión en aceite (100X), es recomendable:

    a) Bajar la platina del microscopio antes de poner el objetivo en posición.

    b) Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación. No usar aceite en exceso, ya que daña el cemento de las lentes.

    c) Viendo por fuera del microscopio, subir la platina con el tornillo macrométrico hasta que toque la gota de aceite. A partir de ese momento el objetivo estará prácticamente dentro de su distancia focal. Enfocar la preparación con movimientos finos del tornillo micrométrico.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Microcultivo
- Preparaciones teñidas
- Aceite de inmersión
- Papel seda o pincel suave.
- Papel absorbente (papel filtro o papel sanitario)
- Paño de lino o de otro material que no suelte pelusa.
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

1. Siguiendo las indicaciones para el manejo del microscopio:

   - Observar una preparación teñida, con el objetivo de inmersión.
   - Observar un microcultivo, primero con el objetivo seco débil y después con el seco fuerte.

2. Dibujar lo observado.

**MICROCULTIVO:**

***Seco fuerte***

***Seco débil***

**PREPARACIÓN TEÑIDA:**

***Objetivo de inmersión***

## V. CUESTIONARIO

1. Hacer un esquema del recorrido de la luz a través de un microscopio óptico compuesto de campo claro.

2. Consultar el fundamento de: microscopía electrónica, microscopía en campo oscuro, microscopía de luz ultravioleta, microscopía de contraste de fases y microscopía por fluorescencia.

3. Mencionar ejemplos de la utilidad de las anteriores microscopías.

4. Describir brevemente los tipos de microscopio electrónico.

5. Consultar dos técnicas de preparación de muestras biológicas para ser observadas con microscopio electrónico.

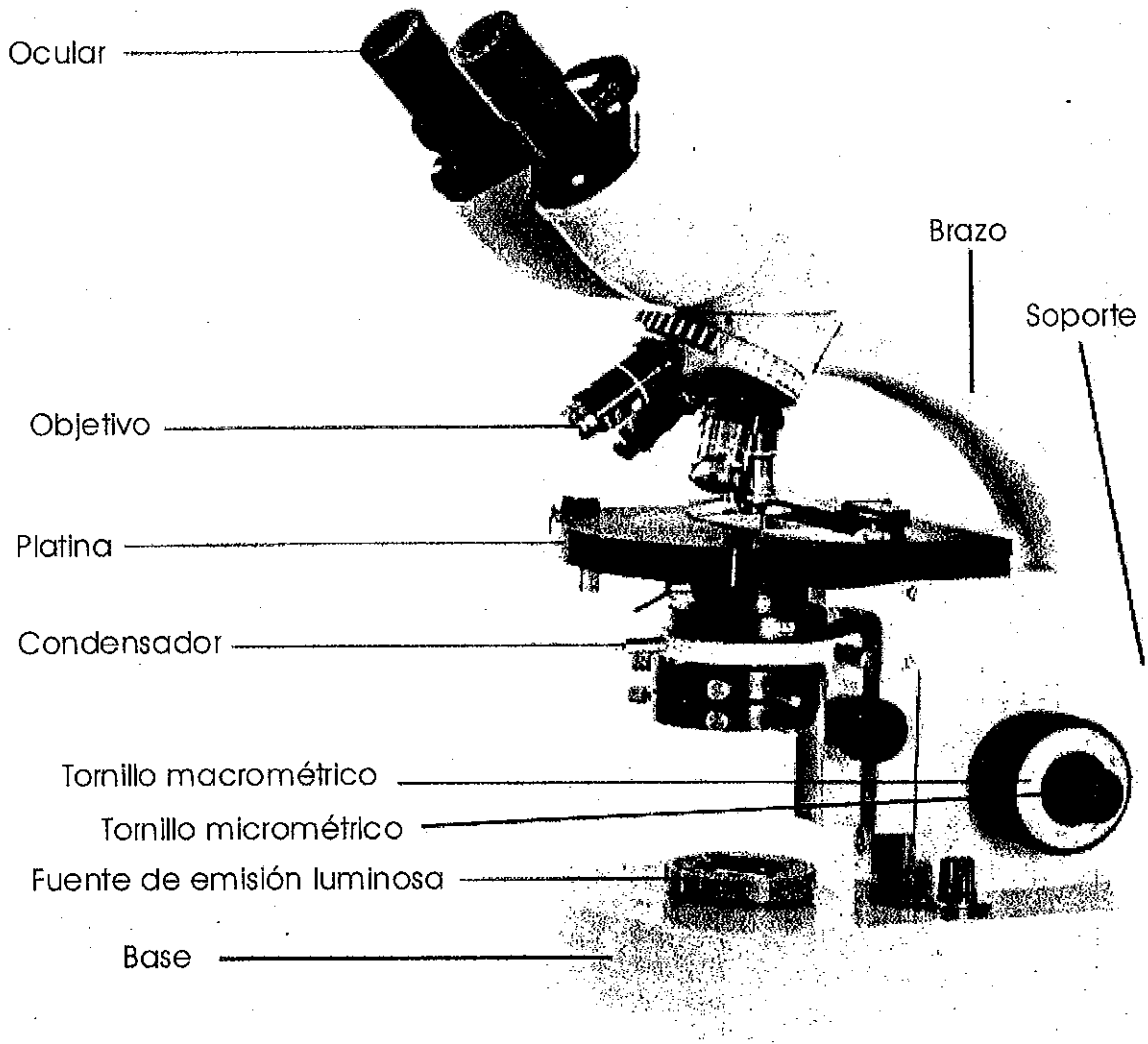



**Figura 1.1 Microscopio óptico compuesto**

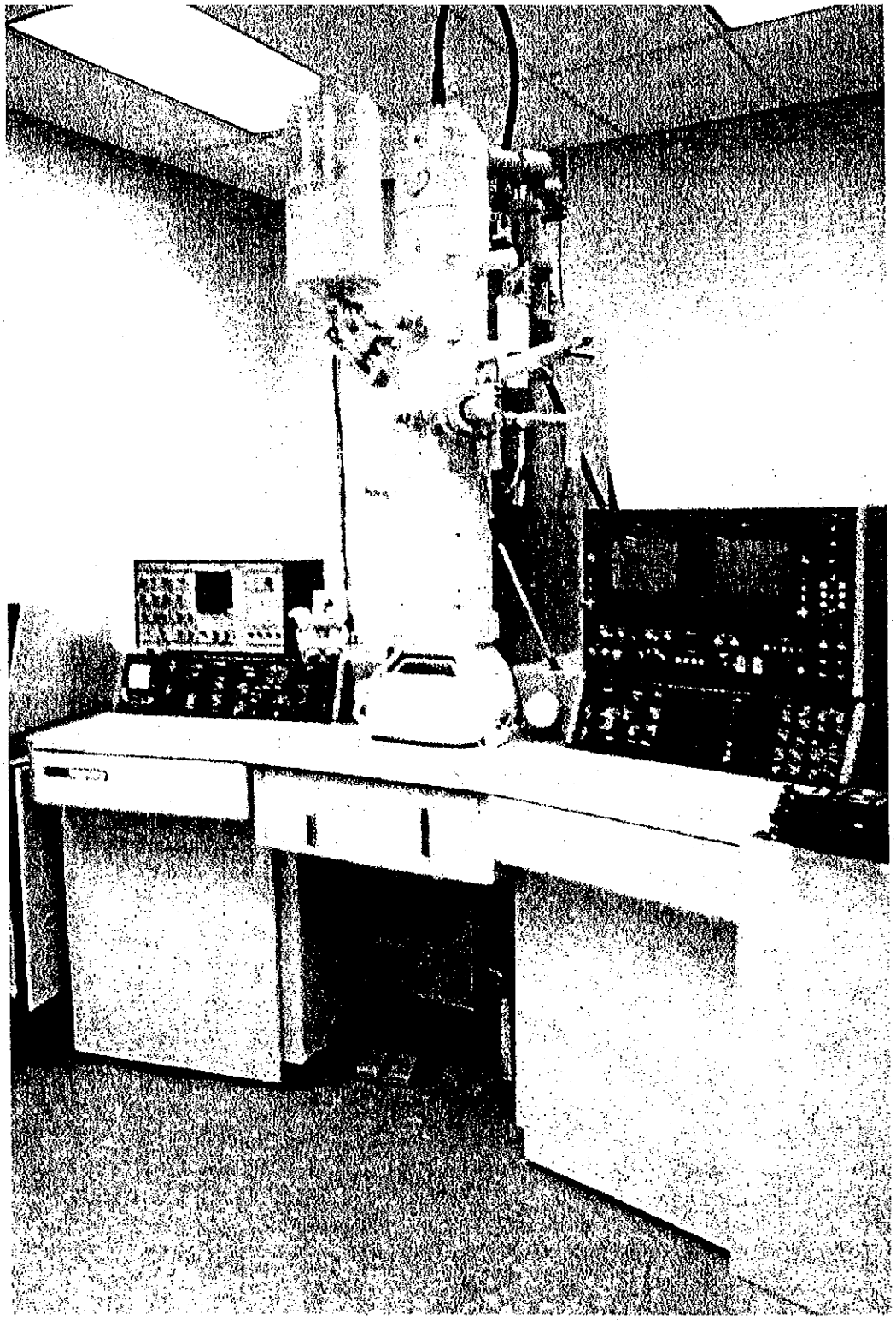


**Figura 1.2. Microscopio electrónico**

# PRÁCTICA Núm. 2
# DISTRIBUCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA

## I. OBJETIVO

Demostrar la presencia de diversos tipos de microorganismos en la naturaleza.

## II. INTRODUCCIÓN

El Reino Protista, definido en el sistema de clasificación de Haeckel (1866), comprende a las bacterias, hongos, algas y protozoos (Figuras 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4).

El término microorganismo comprende además de los grupos anteriores a los virus, que son considerados como entidades microscópicas no vivas.

Todos éstos presentan diversas formas y tamaños, pero se caracterizan porque para observarlos y estudiarlos como organismos individuales, se requiere el uso del microscopio.

Los microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sus hábitats naturales son extremadamente diversos. Prácticamente se encuentran en todas partes: en el agua, en el aire, en el suelo, en los alimentos, algunos pueden vivir en el interior de plantas y animales, sobre la piel de humanos, y en general sobre cualquier material que les proporcione materias nutritivas si las condiciones de humedad y temperatura son favorables para su desarrollo y multiplicación.

Hay muchos hábitats donde, debido a las extremas condiciones físicas o químicas, no se encuentran organismos superiores, sin embargo, en ellos pueden existir microorganismos que en algunos casos, incluso crecen mejor ahí.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Frasco gotero conteniendo agua estancada
- Frasco gotero conteniendo suspensión de suelo de jardín
- Alimento contaminado por hongos (verdura, fruta, pan, tortilla, etc.).
- Frasco gotero conteniendo agua destilada
- 3 portaobjetos
- 3 cubreobjetos
- Asa bacteriológica

- Papel seda o pincel suave
- Cerillos o encendedor
- Mechero Bunsen
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

### PARTE A

1. Poner en el centro de un portaobjetos limpio, una gota del agua estancada.

2. Colocar sobre la gota de agua un cubreobjetos, cuidando que no se formen burbujas de aire.

3. Observar al microscopio utilizando primero el objetivo seco débil y posteriormente el seco fuerte.

4. Dibujar lo observado.

5. Repetir lo anterior para la suspensión de suelo.

### PARTE B

1. Poner en el centro de un portaobjetos limpio una gota de agua destilada.

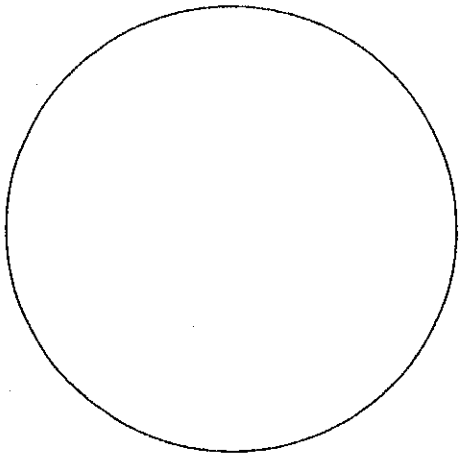
2. Tomar con el asa bacteriológica, en forma de ángulo recto y en condiciones asépticas - esterilizar el asa calentándola al rojo vivo sobre la flama del mechero antes y después de hacer la preparación -, una pequeña porción de lama del alimento y suspenderla en la gota de agua.

3. Colocar un cubreobjetos sobre la preparación.

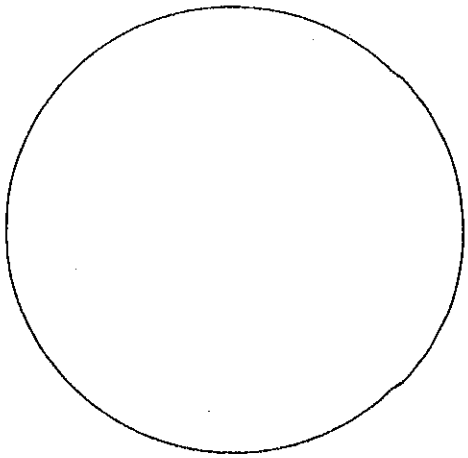
4. Observar al microscopio primero con el objetivo seco débil y posteriormente con el seco fuerte.

5. Dibujar lo observado:

**AGUA ESTANCADA:**

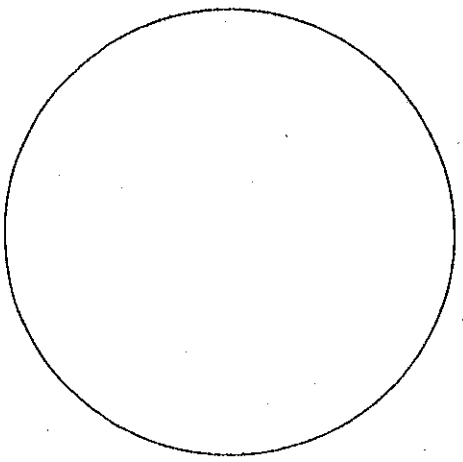


***Seco débil***

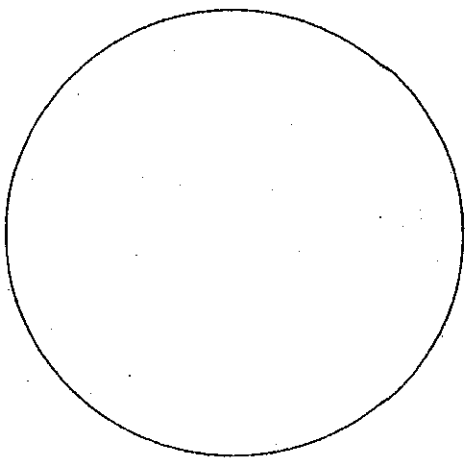


***Seco fuerte***

**SUSPENSIÓN DE SUELO DE JARDÍN:**

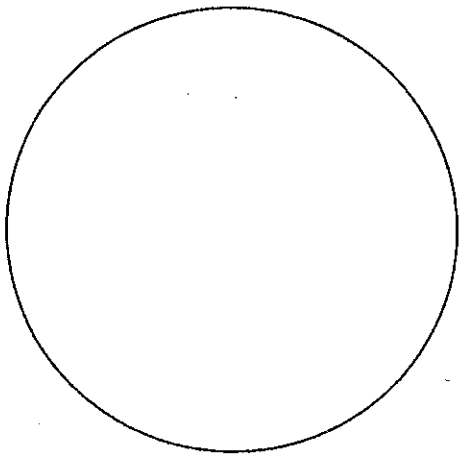


***Seco débil***

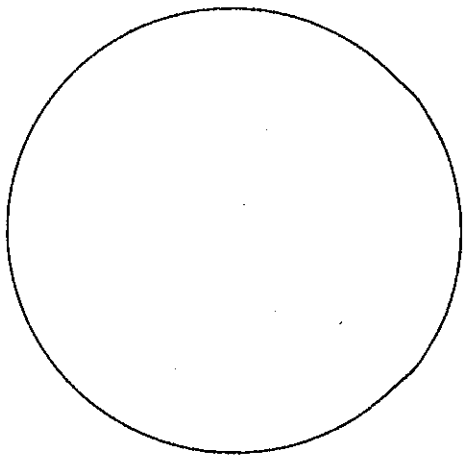


***Seco fuerte***

**ALIMENTO CONTAMINADO POR HONGOS:**



***Seco débil***



***Seco fuerte***

## V. CUESTIONARIO

1. ¿A qué se debe la amplia distribución de los microorganismos?
2. ¿En qué forma pueden transferirse los microorganismos de un lugar a otro?
3. ¿Qué característica común poseen los microorganismos?
4. ¿Qué propiedades de un microorganismo determinan su carácter útil ó perjudicial?
5. ¿Qué importancia tiene la distribución de los microorganismos en la Ingeniería Ambiental?

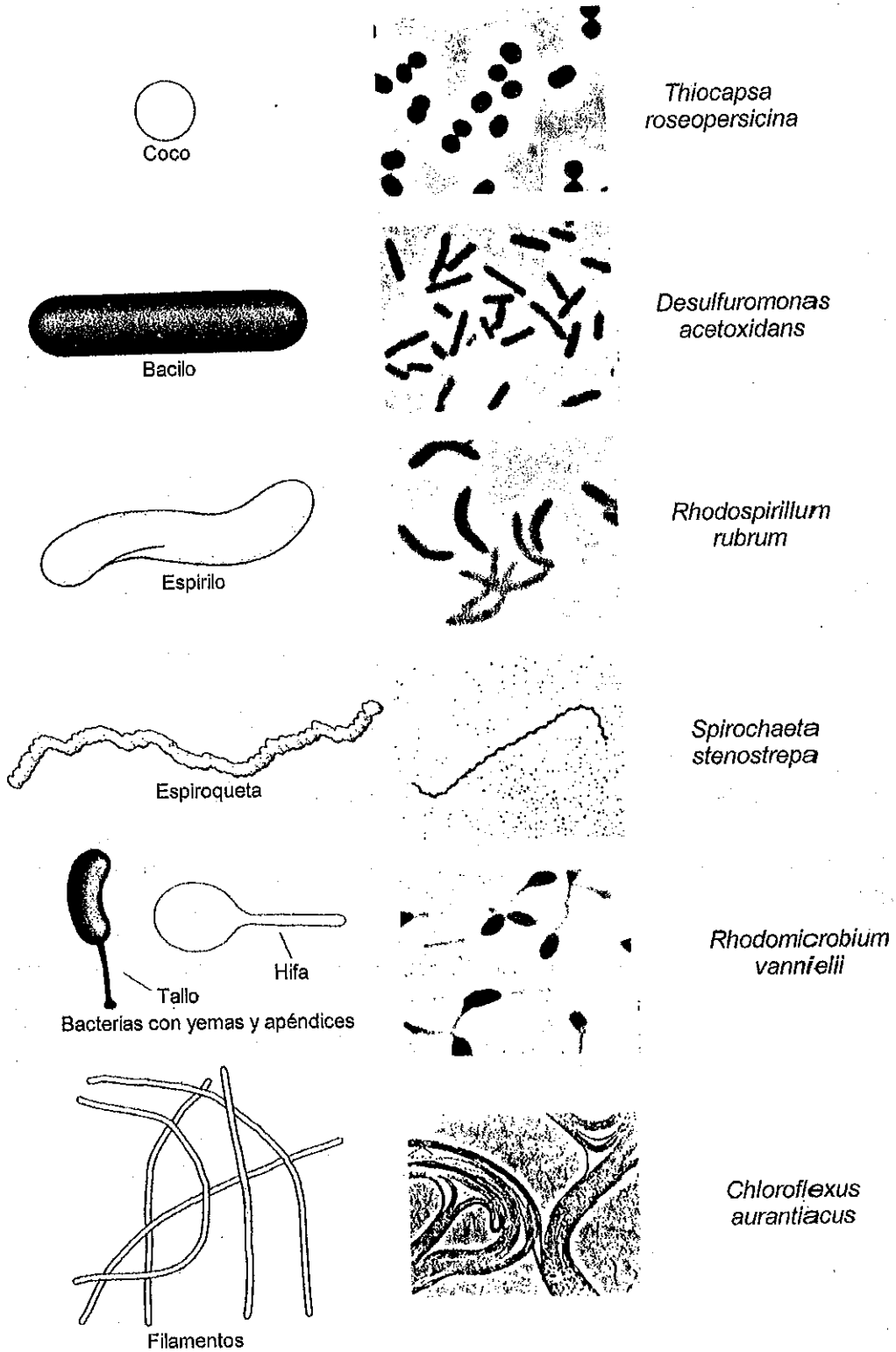



**Figura 2.1 Morfología celular representativa de procariotas**

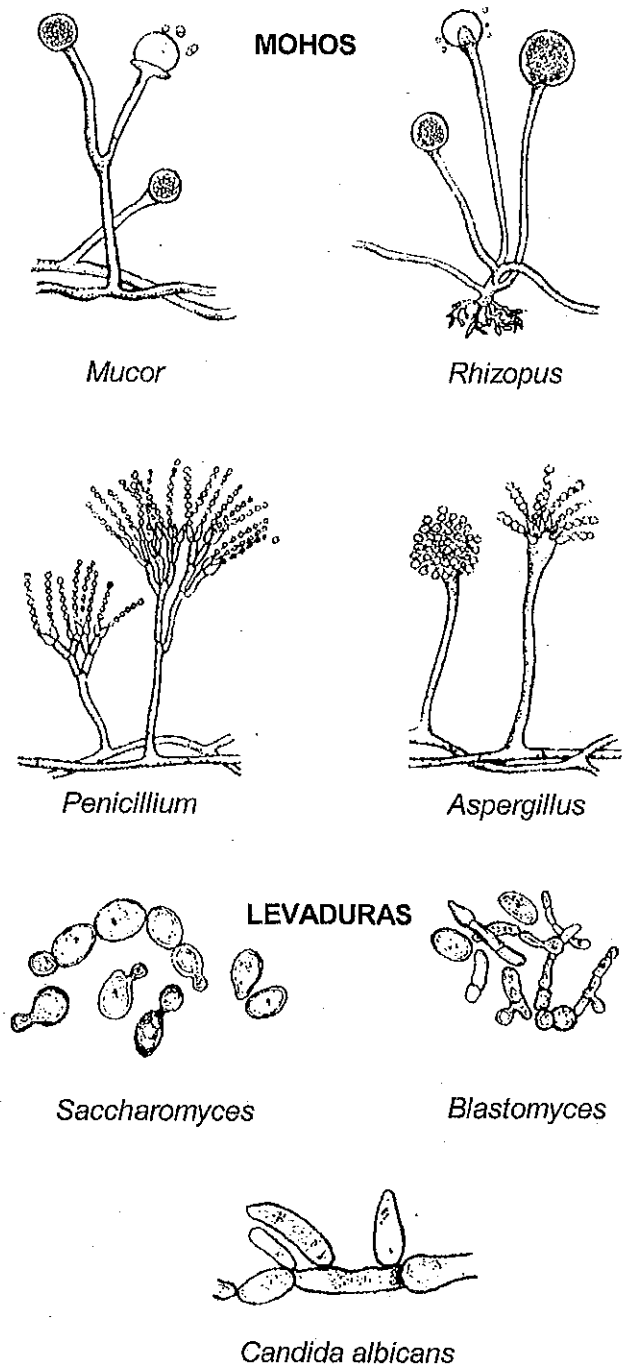



**Figura 2.2 Morfología de algunos hongos: mohos y levaduras**

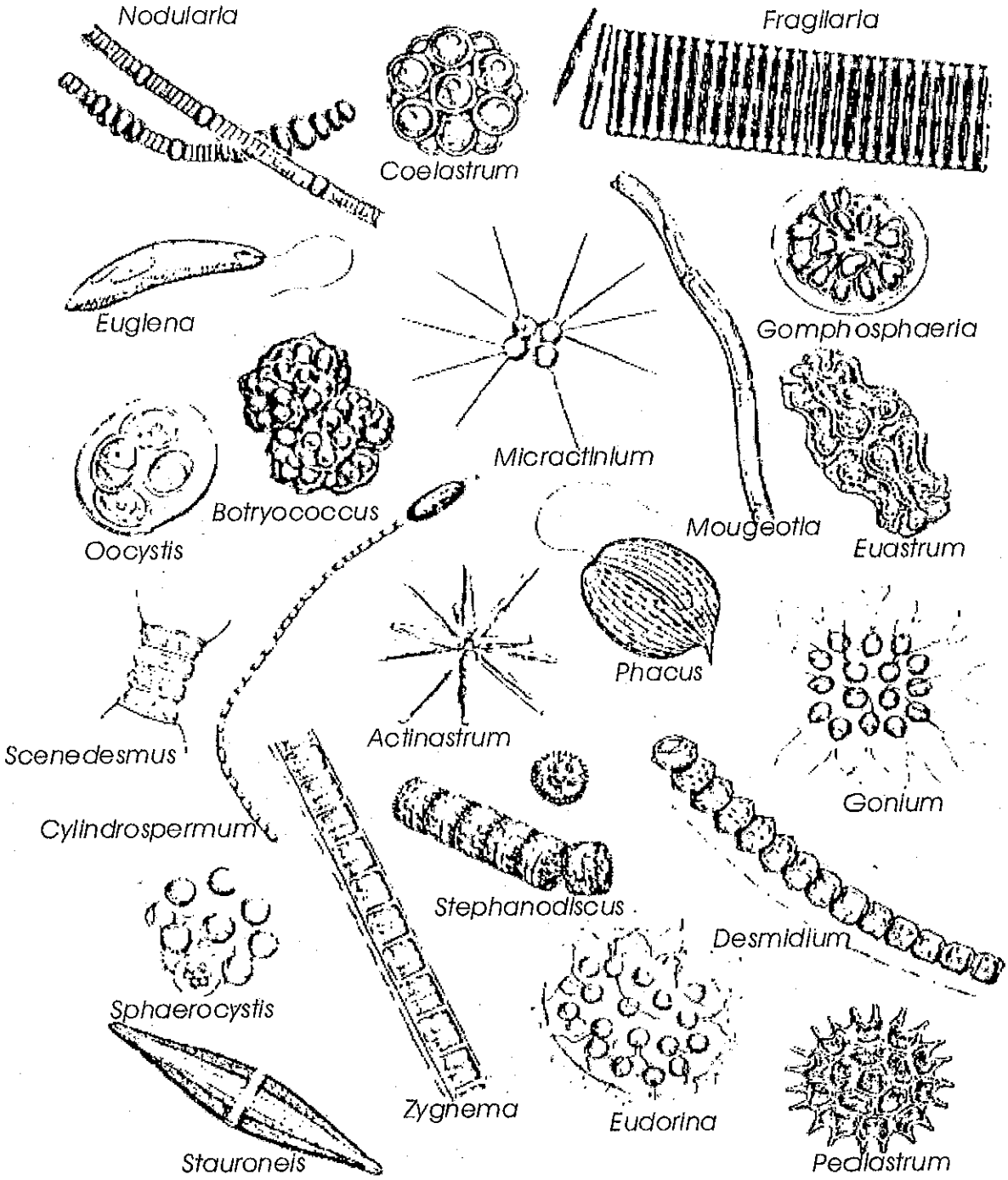



**Figura 2.3 Algas del plancton y otras algas de aguas superficiales**

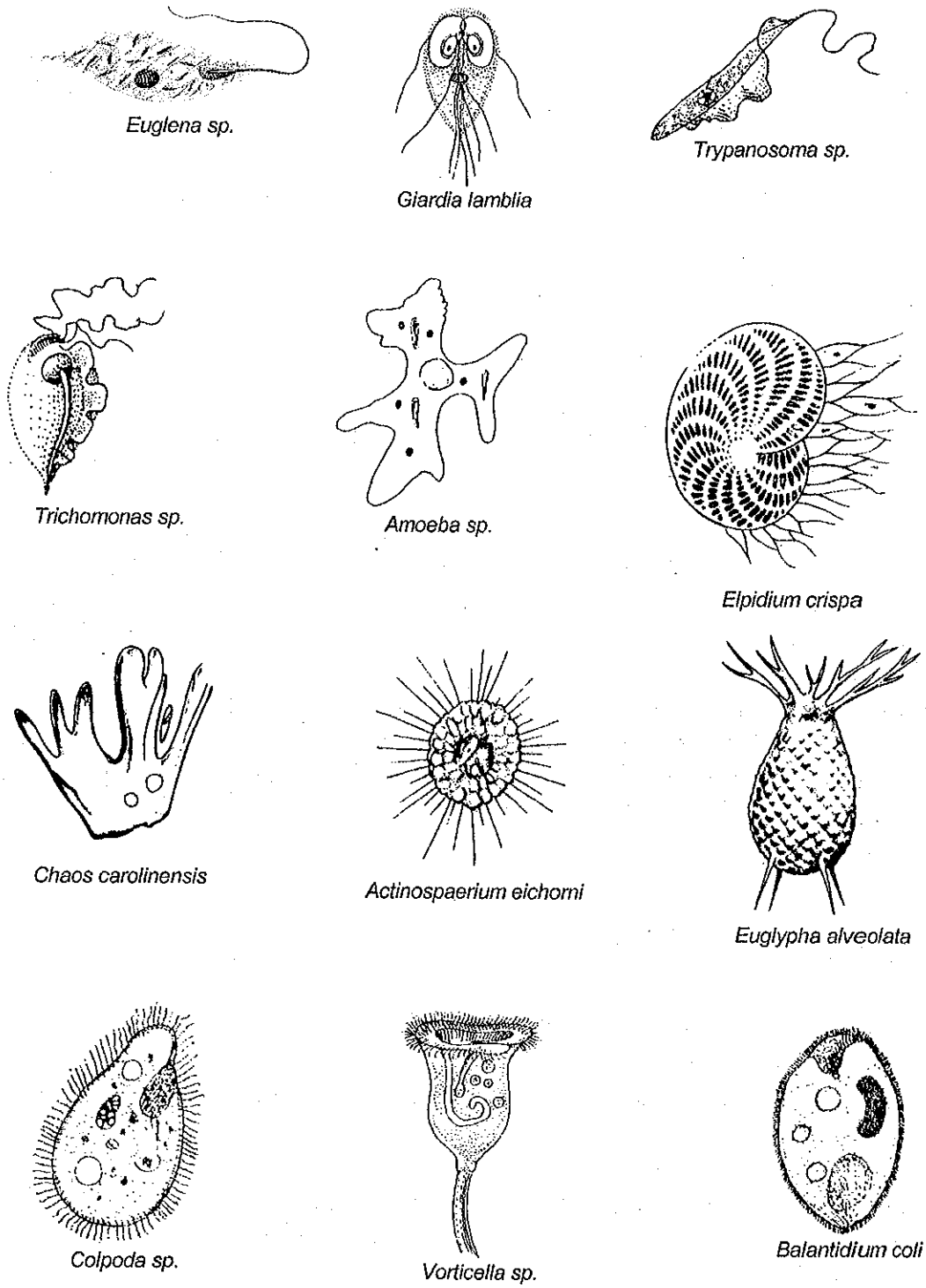



**Figura 2.4 Diversos géneros de protozoarios**

# PRÁCTICA Núm. 3
# PREPARACIÓN DE EXTENSIONES O FROTIS Y TINCIÓN SIMPLE

## I. OBJETIVO

Conocer el procedimiento para preparar extensiones ó frotis y los diferentes métodos de tinción, así como su utilidad en el estudio microscópico de los microorganismos.

## II. INTRODUCCIÓN

Un procedimiento útil para el examen de muestras es el estudio microscópico de preparaciones fijas - extensiones o frotis - preparados a partir de ellas y coloreadas por el método adecuado. Esto permite eliminar el movimiento que presentan los microorganismos en las preparaciones en fresco. La retención de colorantes por las bacterias permite su fácil observación bajo el microscopio.

La forma más común de preparar un frotis es extender con el asa bacteriológica un poco de muestra sobre un portaobjetos desengrasado pero también se puede hacer con un hisopo o presionando el portaobjetos sobre la muestra: "*impronta*".

Dependiendo del tipo de microorganismo o estructura del mismo que se desee observar es el tipo de tinción que se emplea. Por ejemplo: tinción simple, diferencial de Gram, negativa, para cápsulas (Método de Anthony), para flagelos, para endosporas, para núcleo, para bacterias ácido alcohol resistentes (tinción de Ziehl Neelsen), entre otras.

### Tinción simple

Se denomina así, porque sólo se utiliza un colorante.

Con este tipo de coloración solo se pretende observar la morfología de los microorganismos.

Las técnicas de coloración simple pueden ser **positivas** cuando el colorante es fijado por las células apareciendo los microorganismos de color oscuro o coloreado sobre un fondo luminoso o claro, y son **negativas** cuando los microorganismos no fijan el colorante, en cuyo caso el fondo es el que se tiñe y los microorganismos aparecen brillantes sobre fondo oscuro.

Para hacer las tinciones positivas se utilizan colorantes, que son compuestos coloridos que al combinarse con otras sustancias les imparten color; están formados por un grupo cromóforo que es la parte de la molécula responsable del color, y un grupo auxócromo tales como grupos amino e hidroxilo que ayudan a fortalecer a los cromóforos, ya que al formar sales le permite disociarse y combinarse.

Las propiedades ácidas o básicas de los colorantes permiten su clasificación en:

**♦Ácidos**

Estos ionizan en soluciones acuosas para producir un núcleo colorante con carga (-), es decir el grupo iónico que imparte el color (cromóforo) tiene carga negativa, o sea, es un anión. Estos colorantes tiñen material citoplasmático, no son muy usados en microbiología. Por ejemplo: eosina, rojo congo, fucsina ácida

**♦Básicos**

En los que el ion que lleva el color (cromóforo) tiene carga (+). Estos colorantes tienen afinidad por el material nuclear y otros componentes. Estos son los más usados en microbiología, ya que debido a la gran cantidad de ribosomas que contienen ácido ribonucleico en todo el protoplasma de la célula bacteriana, éstas se tiñen fácilmente. Por ejemplo: azul de metileno, fucsina básica, cristal violeta.

**♦Neutros**

Se obtienen cuando se mezclan colorantes ácidos y básicos, donde la carga eléctrica de éstos es cero. P. ej. Giemsa, derivado de sal de amonio y eosina.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 4 portaobjetos
- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Lápiz graso
- Papel absorbente (papel filtro o papel sanitario)
- Papel seda o pincel suave

- Aceite de inmersión
- Cristal violeta
- Azul de metileno
- Verde de malaquita
- Safranina
- Cultivo en medio sólido
- Cultivo en medio líquido
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

### A. Preparación de extensiones o frotis

- Se deberán emplear portaobjetos perfectamente limpios y sin raspaduras para evitar interferencias en la observación.

- Las extensiones deberán ser finas y uniformes para permitir el paso de la luz a través de ellas y facilitar su observación (Figura 3.1).

- Preparar 2 extensiones a partir de cada cultivo:

1. Flamear el portaobjetos para desengrasarlo.

2. Si el cultivo es sólido, colocar una gota de agua en el centro del portaobjetos, y con el asa bacteriológica estéril, tomar una pequeña cantidad de material, emulsionar y extender uniformemente en una superficie aproximada de 1 $cm^2$.

3. Si la muestra es líquida, tomar directamente el material con el asa estéril y extenderlo uniformemente sobre la superficie indicada anteriormente.

4. Dejar secar la extensión al aire.

5. Una vez seca la extensión, fijarla al calor suave, pasando rápidamente el portaobjetos sobre la flama del mechero, sin calentar demasiado, unas 10 veces.

### B. Tinción

1. Cubrir la extensión debidamente preparada con la solución colorante.

2. Dejar actuar el colorante por 1 minuto.

3. Lavar con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante.

4. Dejar secar al aire o presionando el portaobjetos entre 2 capas de papel absorbente, como papel filtro o papel sanitario.

5. Una vez seca la extensión, colocar sobre ella una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio con el objetivo de inmersión.

6. Dibujar lo observado:

***Cultivo en medio sólido***

***Cultivo en medio líquido***

## V. CUESTIONARIO

1. Consultar las estructuras químicas de 2 colorantes ácidos y 2 básicos.

2. ¿Qué significa "fijar" la extensión y qué sucede durante este proceso? Mencionar otros 2 métodos de fijación.

3. ¿Qué característica presenta el aceite de inmersión?

4. ¿Por qué es necesario teñir las extensiones?

5. Consultar otras 2 técnicas para la preparación de extensiones.

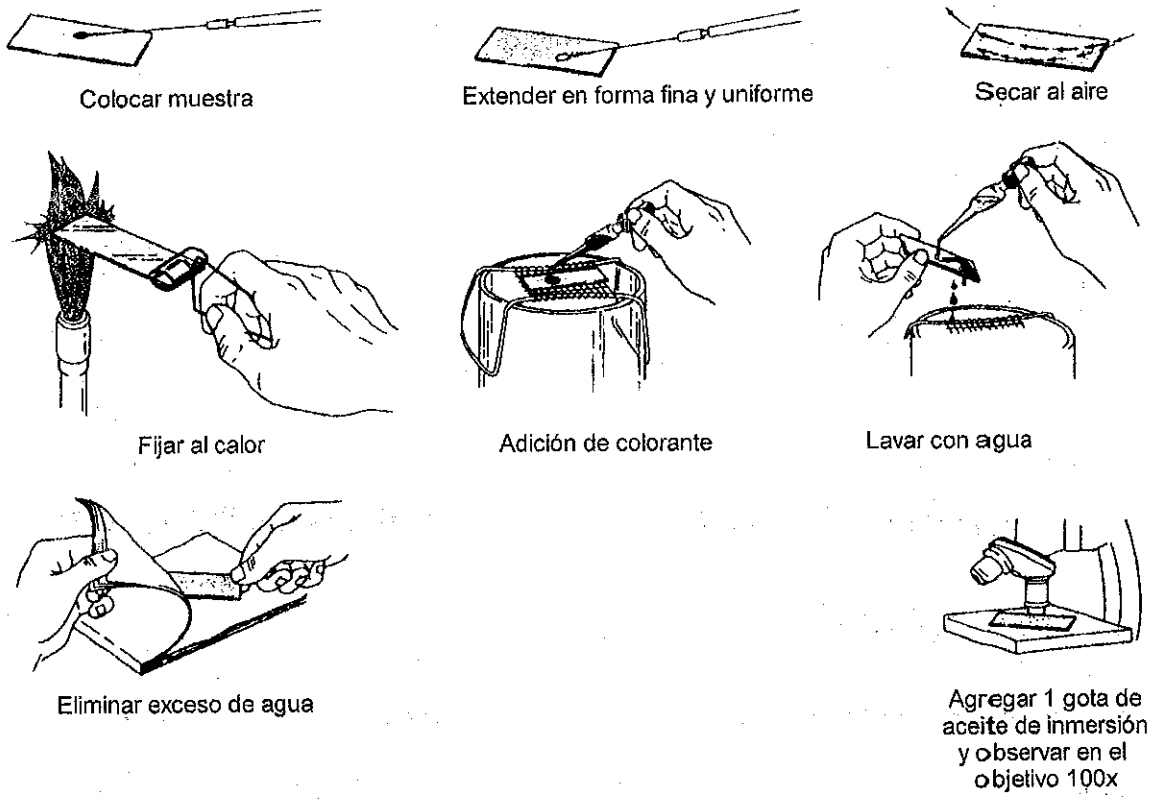



**Figura 3.1 Preparación de una extensión o frotis y tinción simple**

# PRÁCTICA Núm. 4
# TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM

## I. OBJETIVO

Distinguir las bacterias Gram positivas de las Gram negativas.

## II. INTRODUCCIÓN

La técnica de coloración de Gram es de gran utilidad en Bacteriología, ya que permite diferenciar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Casi la mitad de las bacterias, son Gram positivas y el resto Gram negativas.

El método fue descubierto por Christian Gram (Danés), en 1884, quien observó que en cortes histológicos que contenían bacterias coloreadas con violeta de genciana y tratadas con solución acuosa de yodo, con el empleo de alcohol este colorante podría ser removido del corte histológico, pero no de las bacterias.

Posteriormente descubrió que no todas las bacterias retenían al violeta de genciana sino que algunas eran decoloradas por acción del alcohol. A las primeras las llamó **Gram positivas** y a las segundas **Gram negativas.** Éstas que quedan incoloras son teñidas luego mediante el empleo de un colorante de contraste como la safranina, para hacer posible su observación.

Hay bacterias cuya composición las sitúa en el límite entre Gram positivas y Gram negativas y por lo tanto reaccionan de maneras diferentes, por lo cual se denominan Gram variables, pero su verdadero carácter de Gram puede establecerse en cultivos muy jóvenes obtenidos en medios específicos como agar sangre y controlando cuidadosamente todas las condiciones incluyendo, desde luego, los detalles de la manipulación.

Finalmente, los factores que afectan a la pared celular como el envejecimiento o el daño físico, alteran el Gram de las bacterias positivas lo mismo que el medio ácido.

Existen muchas modificaciones de esta coloración, pero el fundamento es el mismo.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Gradilla
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Lápiz graso
- Papel absorbente (papel filtro o papel sanitario)
- Papel seda o pincel suave
- Aceite de inmersión
- Cristal violeta
- Lugol
- Alcohol al 95%
- Safranina
- Cultivos bacterianos: **A**, **B** y **C**
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

1. Preparar 3 extensiones en la forma ya indicada.

2. Cubrir la extensión con cristal violeta y dejar actuar durante un minuto.

3. Lavar con agua corriente, cuidando que no se arrastre la preparación y sacudir para eliminar el exceso de agua.

4. Cubrir la extensión con solución de lugol y dejar actuar por un minuto.

5. Lavar con agua corriente.

6. Decolorar con alcohol al 95 ó 96%, aproximadamente 10 segundos o hasta observar el alcohol transparente.

7. Lavar con agua corriente.

8. Cubrir la extensión con safranina y dejar actuar por 1 minuto.

9. Lavar con agua corriente.

10. Secar la preparación al aire o colocándola entre 2 capas de papel absorbente.

11. Colocar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

**INTERPRETACIÓN:**

- Las bacterias **Gram positivas** retienen el cristal violeta y se teñirán en **azul** o **morado.**
- Las **Gram negativas** se tiñen en **rojo** o **rosa.**

12. Dibujar lo observado:

*Cultivo **A***

*Cultivo **B***

*Cultivo **C***

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es el fundamento de la tinción diferencial de Gram?

2. Explicar la función que desempeñan el lugol y el alcohol en esta coloración.

3. Escribir el nombre científico (género y especie), de 5 bacterias Gram positivas y 5 Gram negativas.

4. Describir la técnica de otra tinción diferencial.

5. Explicar: ¿Por qué algunos microorganismos Gram positivos en un cultivo joven pueden volverse Gram negativos cuando éste envejece?

# PRÁCTICA Núm. 5
# TINCIÓN DE ENDOSPORAS POR LA TÉCNICA DE SCHAEFFER Y FULTON

## I. OBJETIVO

Demostrar mediante tinción y observación microscópica la presencia de esporas en las bacterias.

## II. INTRODUCCIÓN

Existen diversos tipos de esporas microbianas, pero la espora bacteriana tiene especial importancia ya que son organelos de gran resistencia que se producen en el interior de la célula, por lo que reciben el nombre de **endosporas.**

La endospora es una estructura compuesta, de dipicolinato de calcio en el centro, dentro de su compleja cubierta que consta de siete capas que contienen mureína.

Pocos géneros de bacterias son capaces de formar endosporas, siendo los principales: ***Bacillus*** y ***Clostridium.***

La esporulación de una bacteria no es debida a condiciones desfavorables del medio, sino que se forman en cierto período del desarrollo de la célula.

La función de las endosporas no es la reproducción, ya que de un bacilo que forma una espora sólo surge una bacteria por su germinación.

Tanto el tamaño, como la forma y posición de la espora en la célula bacteriana son caracteres relativamente constantes de cada especie, ya que poseen cierto valor para distinguir entre sí los diferentes tipos de bacterias esporuladas.

La posición de la espora en la célula puede ser central, sub-terminal o terminal y de forma redonda u ovalada (Figura 5.1).

La espora puede también ser más grande que el diámetro de la bacteria o menor que éste.

Las endosporas bacterianas son muy resistentes y refractarias a la desecación, a los agentes químicos y sobre todo a temperaturas elevadas, ya que pueden sobrevivir expuestas a altas temperaturas durante largos períodos, a diferencia de las bacterias vegetativas normales que mueren con breves exposiciones.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Cultivo de *Bacillus subtilis*
- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Tripié
- Soporte para efectuar tinciones
- Cerillos o encendedor
- Papel absorbente (papel filtro o papel sanitario)
- Papel seda o pincel suave
- Lápiz graso
- Portaobjetos
- Gradilla
- Aceite de inmersión
- Verde de malaquita al 5% en agua destilada
- Safranina al 0.5% en agua destilada
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

1. Preparar una extensión a partir del cultivo bacteriano.

2. Colocar la extensión sobre un soporte y agregar suficiente solución de verde de malaquita al 5%.

3. Flamear la extensión pasando por debajo de ésta el mechero Bunsen o la lámpara de alcohol hasta observar una ligera emisión de vapores, por espacio de minuto y medio, evitando que se evapore totalmente el colorante.

4. Lavar enérgicamente al chorro del agua, hasta eliminar el exceso de colorante.

5. Cubrir la preparación con solución de contraste, safranina al 5%, y dejar actuar el colorante durante un minuto y medio.

6. Lavar al chorro del agua hasta eliminar el exceso de colorante.

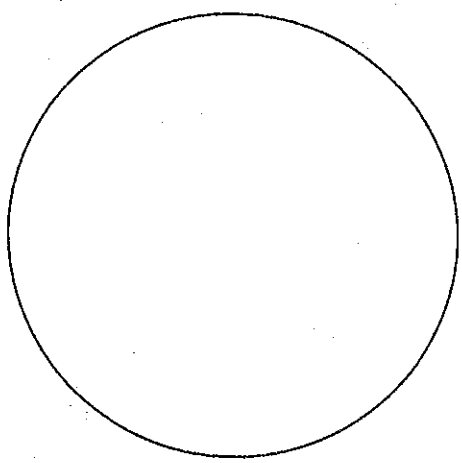
7. Secar al aire o utilizando papel absorbente.

8. Observar al microscopio con objetivo de inmersión en aceite.

**INTERPRETACIÓN:**

- Las **esporas** deberán estar teñidas de color **verde** y **los cuerpos bacilares** en **rojo.**

9. Dibujar lo observado:



***Objetivo de inmersión***

## V. CUESTIONARIO

1. Mencionar otros métodos de coloración de esporas.

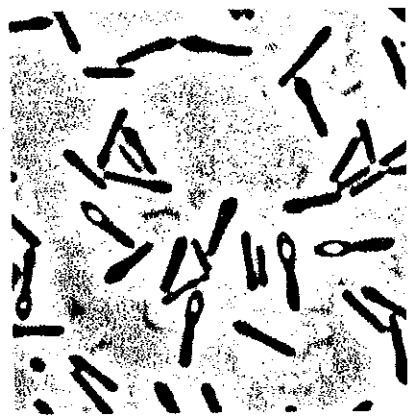
2. ¿A qué se debe la resistencia térmica de la endospora?

3. ¿Qué importancia tienen las endosporas?

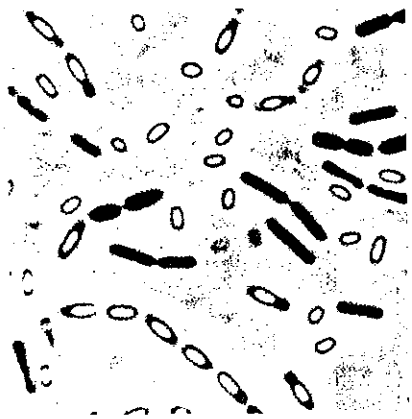
4. ¿Explicar cómo pueden ser destruidas las endosporas?

5. Mencionar las principales características de los géneros *Bacillus* y *Clostridium.*

a)



b)



c)

**Figura 5.1 Posición de endosporas en las bacterias: a) terminal, b) subterminal c) central**

# PRÁCTICA Núm. 6
# TINCIÓN DE FLAGELOS BACTERIANOS POR EL MÉTODO DE LEIFSON

## I. OBJETIVO

Demostrar la presencia de flagelos mediante tinción y observar la movilidad que presentan algunas bacterias, diferenciándola del movimiento browniano.

## II. INTRODUCCIÓN

Muchos microorganismos son móviles, desplazándose de un lugar a otro para obtener nutrientes, crecer y reproducirse.

Muchas de las bacterias poseen esta capacidad, debido a la presencia de unos órganos de locomoción denominados flagelos.

Estos son filamentos simples químicamente compuestos de proteína conocida como flagelina. Tienen su origen en el protoplasma de la célula bacteriana y su espesor es alrededor de 0.01 micrones.

El número y disposición de los flagelos es variable en las diferentes bacterias, pero generalmente es constante para cada especie.

Algunas tienen solamente un flagelo, otras dos o más y pueden ser polares o perítricos - alrededor del cuerpo de la célula - (Figura 6.1).

Las bacterias flageladas cuando están suspendidas en una gota de líquido son activamente móviles. Sin embargo, es muy importante distinguir entre el movimiento real debido a los impulsos originados por los flagelos permitiendo el desplazamiento de la bacteria dentro del campo microscópico y el llamado movimiento browniano que se produce siempre que se suspenden en un líquido, partículas pequeñas y que presentan las bacterias inmóviles debido al bombardeo molecular sobre la superficie de la célula.

Los flagelos pueden ser teñidos, pero debido a su diámetro tan pequeño, se requieren técnicas especiales.

Los flagelos de organismos eucarióticos, como algas y protozoarios, son mucho más gruesos y pueden observarse en preparaciones en fresco o con tinciones simples.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Suspensión bacteriana
- Solución salina o agua destilada estéril
- 1 Portaobjetos excavado
- 1 Portaobjetos normal perfectamente limpio y desengrasado con mezcla crómica
- 1 Cubreobjetos perfectamente limpio y desengrasado
- Pipetas Pasteur estériles
- Gradilla
- Asa bacteriológica
- Lápiz graso
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Aplicadores
- Vaselina
- Papel absorbente (papel filtro o papel sanitario)
- Papel seda o pincel suave
- Colorante de Leifson
- Mezcla crómica
- Aceite de inmersión
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

### A. OBSERVACIÓN AL FRESCO EN GOTA PENDIENTE

1. Depositar en condiciones asépticas tres o cuatro asadas de la suspensión bacteriana en el centro del cubreobjetos limpio y libre de grasa. También se puede usar una pipeta Pasteur estéril para este fin, procurando que la gota quede lo suficientemente grande para facilitar la observación.

   **NOTA:**

   Los cubreobjetos se pueden limpiar frotándolos cuidadosamente entre los dedos con agua y jabón y enjuagándolos en agua caliente. Luego sumergirlos en alcohol y secarlos con un trapo limpio, sin pelusa. Finalmente, el calentamiento suave a la flama quitará los últimos restos de grasa.

2. Cuando se trata de un cultivo sólido, colocar una gota de solución salina o agua destilada estéril en el centro del cubreobjetos limpio y emulsionar una pequeña cantidad del material. Se puede hacer una pequeña marca cerca de la gota en el cubreobjetos para facilitar la observación.

3. Poner un poco de vaselina alrededor de la concavidad del portaobjetos utilizando para ello un aplicador.

4. Invertir y colocar el portaobjetos sobre el cubreobjetos que contiene la gota de la suspensión bacteriana cuidando que quede bien centrado para que la excavación quede directamente encima de la gota. **La gota no debe tocar el portaobjetos.**

5. Presionar suavemente cubreobjetos y portaobjetos para que se adhieran perfectamente.

6. Invertir rápidamente. La gota que contiene el material a examinar pende del cubreobjetos sobre la excavación del portaobjetos (Figura 6.2).

7. Observar al microscopio con el objetivo seco débil y enseguida con el seco fuerte. Al localizar la marca hecha en el cubreobjetos, el borde de la gota se encontrará fácilmente.

8. Determinar si hay movilidad real - desplazamiento de las células de un lado a otro dentro del campo microscópico -, o movimiento browniano.

9. Si se desea observar células individuales, colocar una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y observar con objetivo de inmersión.

## B. TINCIÓN DE FLAGELOS

1. Hacer un círculo en un portaobjetos perfectamente limpio para lo cual previamente fue sumergido en mezcla crómica durante 24 horas, lavado posteriormente con agua destilada, enjuagado con alcohol y secado con un trozo de tela limpio. Desengrasarlo pasando por una flama varias veces.

2. Colocar dentro del círculo, con pipeta Pasteur, una gotita de la suspensión bacteriana e inclinar el portaobjetos a uno y otro lado para extender la muestra.

3. Fijar la preparación al aire ya que si esta operación se hace usando la flama del mechero se pueden destruir los flagelos.

4. Humedecer la preparación con el colorante de Leifson y dejarla en reposo a temperatura ambiente durante 10 minutos en tiempo caluroso, o en la incubadora en tiempo frío.

5. Lavar con agua corriente.

6. Secar y observar con objetivo de inmersión.

**INTERPRETACIÓN:**

- Los **flagelos** se tiñen bien de color **rojo** en aquellas bacterias que no presentan flagelos extremadamente delicados.

7. Dibujar las observaciones hechas:

*Observación **A***

*Observación **B***

## V. CUESTIONARIO

1. Dar la clasificación de las bacterias de acuerdo al número y localización de sus flagelos.

2. Dibujar la estructura de un flagelo bacteriano.

3. Consultar otro método de tinción para flagelos.

4. Diferenciar los flagelos bacterianos de los de células eucarióticas.

5. ¿De qué otra manera se puede demostrar la movilidad de una bacteria?

**Figura 6.1 Diferente número y disposición de flagelos en bacterias**

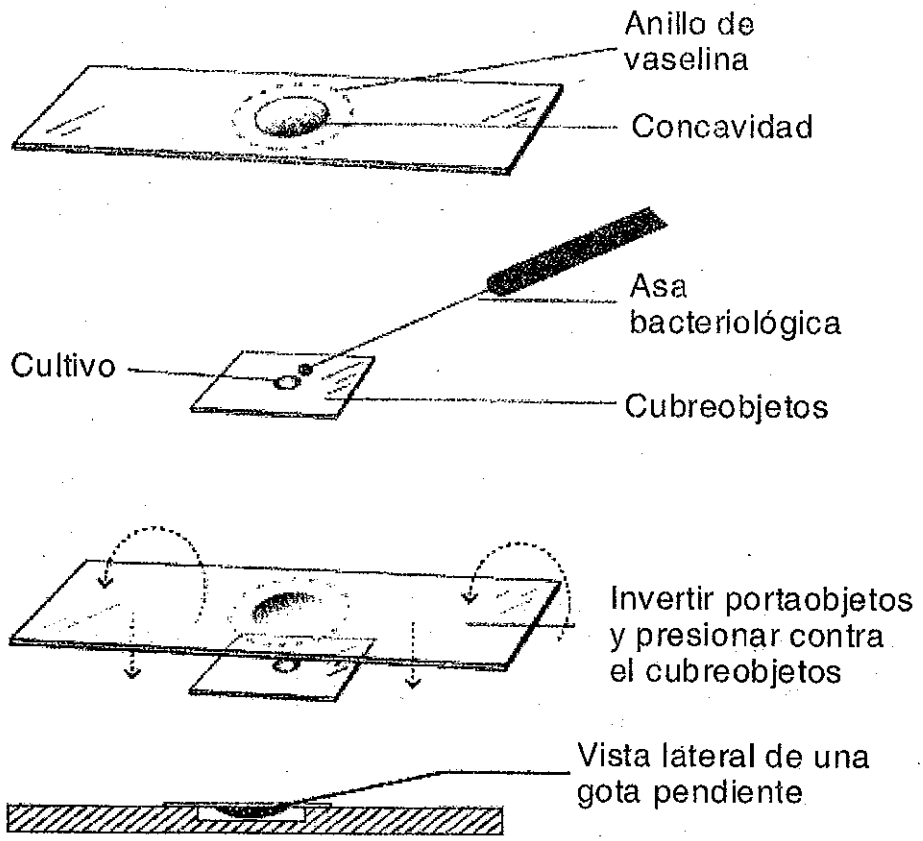



**Figura 6.2 Preparación de una muestra de gota pendiente**

# PRÁCTICA Núm. 7
# ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO Y CALOR HÚMEDO

## I. OBJETIVO

Demostrar la diferencia del efecto del calor seco y húmedo, usando como indicador la viabilidad de una bacteria.

## II. INTRODUCCIÓN

Existen diversos métodos físicos de esterilización y de inhibición del crecimiento microbiano, como pueden ser el calor, la filtración y la radiación, pero el más ampliamente usado es el calor, ya sea húmedo o seco, los cuales tienen diferente penetrabilidad.

Conforme aumenta la temperatura por encima de la temperatura máxima de crecimiento, se producen efectos letales en los microorganismos.

La muerte de las bacterias por el calor húmedo es consecuencia de la desnaturalización de sus proteínas, en tanto que en una atmósfera seca se debe a la oxidación de los constituyentes de la célula.

Los enlaces intracelulares e intermoleculares (puentes de hidrógeno), de las proteínas de los cuales depende su funcionalidad, son más lábiles cuando las proteínas están hidratadas que cuando no lo están, de tal manera que el "calor húmedo" es más efectivo en la desnaturalización de enzimas y otros componentes proteínicos importantes para la célula que el "calor seco".

Es por eso que se dice que el calor húmedo tiene mayor "penetrabilidad" que el calor seco.

El calor, de cualquier forma, es utilizado extensamente como un agente letal bacteriano y se puede aplicar a numerosos instrumentos, materiales y substancias, con el propósito de matar a las bacterias que ellos contengan.

Este proceso se llama **"esterilización"** y al material, cultivo o medio de cultivo sometido a éste, se le denomina entonces **"estéril"**, es decir, desprovisto de toda forma viviente.

El calor puede ser generado en diversos aparatos y por lo tanto se puede esterilizar por calor húmedo y por calor seco.

En ambos casos hay numerosos factores que condicionan la efectividad del proceso: cantidad de agua, temperatura, presión, tiempo de contacto, superficie de esterilización, pH, "edad" de las bacterias, presencia o no de esporas, composición del medio de suspensión, etc.

Las células vegetativas y las endosporas bacterianas de un mismo organismo varían considerablemente en cuanto a su resistencia al calor.

La muerte de los microorganismos es más rápida a pH ácido.

Las concentraciones elevadas de azúcares, proteínas o grasas disminuyen la penetración del calor y habitualmente aumentan la resistencia de los organismos al calor, mientras que las elevadas concentraciones de sal pueden incrementar o bien reducir la resistencia al calor, dependiendo del organismo.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 2 tubos de ensayo conteniendo cada uno un hisopo contaminado con cultivo de *Bacillus subtilis,* bacteria esporulada
- 2 tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo estéril
- Gradilla
- Canastilla para colocar los tubos rotulados con "autoclave"
- Vaso de precipitados para colocar los tubos rotulados con "horno"
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Masking tape
- Asa bacteriológica
- Autoclave
- Horno de calor seco

## IV. TÉCNICA

1. Rotular los dos tubos conteniendo un hisopo previamente contaminado con un cultivo de *Bacillus subtilis* (bacteria esporulada), uno con la palabra **horno** y el otro con la palabra **autoclave**, anotando además el nombre del alumno o número de equipo, para su identificación.

2. Colocar los tubos en el autoclave o en el horno de calor seco según el rótulo, para su esterilización, utilizando en ambos casos una temperatura de 121 °C y un tiempo de 15 minutos.

3. Después de este período, sacar los tubos y añadirles, en condiciones asépticas, caldo nutritivo estéril.

4. Incubar a 37 °C, por 24-48 horas.

5. Después de este período observar si hubo o no desarrollo en los tubos, el cual se manifiesta mediante turbidez del medio.

6. Anotar los resultados y sacar conclusiones en cuanto a la diferencia del efecto del calor seco y del calor húmedo.

**MANEJO DEL AUTOCLAVE:**

1. Asegurarse de que haya un buen nivel de agua en el autoclave. Si no hay suficiente, agregarla hasta que casi llegue a la parrilla inferior.

2. Introducir el material que se va a esterilizar procurando que quede bien colocado para evitar algún problema y cerrar la puerta ajustándola bien. Debe quedar herméticamente cerrado.

3. Abrir la válvula de salida de vapor y encender la fuente de calor del autoclave.

4. A medida que suba la temperatura del agua (ver el termómetro), empezará a salir una mezcla de vapor-aire por la válvula de salida de vapor, dejar que escape esta mezcla hasta que sólo salga un flujo continuo de vapor y el aire haya sido eliminado; a ésto se le llama purgar el autoclave.

5. Una vez purgado el autoclave, cerrar la válvula de salida de vapor y dejar que la presión suba hasta 15 libras por pulgada cuadrada (vigilar el manómetro), lo que proporciona una temperatura de 121 °C. Recordar que no es la presión del autoclave lo que mata a los microorganismos sino la elevada temperatura que puede alcanzarse cuando el vapor de agua se somete a presión.

6. En ese momento empezar a contar el tiempo.

7. Transcurridos 15 minutos a 15 libras de presión, apagar la fuente de calor y dejar que el autoclave se enfríe sólo (no abrir la válvula de salida de vapor), hasta que la presión haya bajado a 0 libras.

8. Abrir el autoclave y sacar el material.

## MANEJO DEL HORNO DE CALOR SECO:

1. Para efectos de esta práctica, - ya que para efectuar la esterilización con este equipo las instrucciones verdaderas son otras -, encender el horno eléctrico y con el uso del termostato, elevar la temperatura hasta que llegue a 121 °C y mantener ésta constante.

2. Introducir el material a esterilizar y cerrar la puerta.

3. Empezar a contar 15 minutos de exposición a esa temperatura.

4. Después de este período, apagar el horno, abrir la puerta y sacar el material. Si aún está caliente, usar un guante de asbesto.

## V. CUESTIONARIO

1. Describir un autoclave y un horno de calor seco.

2. ¿Qué tipo de material se puede esterilizar en el horno de calor seco y en el autoclave? Dar ejemplos.

3. ¿Cuál es la temperatura y el tiempo que se requieren para lograr la esterilización en el horno de calor seco?

4. ¿Por qué es necesario ajustar el tiempo y la temperatura para lograr la esterilización?

5. ¿En qué consisten los métodos de arnoldización y pasteurización?

# PRÁCTICA Núm. 8
# DESINFECCIÓN DE AGUJAS HIPODÉRMICAS POR EBULLICIÓN

## I. OBJETIVO

Medir el tiempo letal térmico y conocer la importancia de la eliminación de microorganismos por ebullición y su aplicación.

## II. INTRODUCCIÓN

Frecuentemente se usa en medicina el método de desinfección de instrumentos por sumersión en agua u otros líquidos a altas temperaturas. Con el objeto de utilizar correctamente este método, es conveniente comprender algo de su dinámica.

Se llama **tiempo letal térmico** al tiempo necesario para obtener la eliminación de microorganismos a una temperatura dada.

Se llama **punto letal térmico** a la temperatura necesaria para obtener eliminación de microorganismos en un tiempo fijo.

En esta práctica sólo se realizará el primero, ya que es el más útil.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 1 Caja de Petri conteniendo 5 agujas hipodérmicas contaminadas con *Escherichia coli* (una bacteria no esporulada)
- 1 Caja de Petri conteniendo 5 agujas hipodérmicas contaminadas con *Bacillus subtilis* (una bacteria esporulada)
- 10 tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo estéril
- Pinzas de disección
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Masking tape
- Tripié
- Tela de asbesto
- Vaso de precipitado de 500 mL
- Gradilla
- Termómetro
- Reloj o cronómetro

## IV. TÉCNICA

1. Marcar una serie de 5 tubos conteniendo caldo nutritivo, como *E. coli:* Testigo, 5', 10', 15', 20' y otra como *B. subtilis:* Testigo, 5', 10', 15' y 20'.

2. Tomar con la pinza flameada, una aguja contaminada con *E. coli* y depositarla en el tubo de ensayo marcado como testigo (éste será el tubo testigo de viabilidad de las bacterias).

3. Poner en el vaso de precipitados agua destilada y calentarla hasta ebullición suave (> 90 ºC).

4. El resto de las agujas contaminadas con *E. coli,* verterlas en el líquido en ebullición, todas al mismo tiempo. En este instante empezar a contar el tiempo.

5. Sacar a los 5' la primera aguja y depositarla inmediatamente en el tubo con caldo estéril marcado con 5'.

6. Sacar a los 10 minutos la segunda aguja y depositarla inmediatamente en el tubo con caldo estéril marcado con 10'. Efectuar la misma operación a los 15' y 20'.

7. Repetir el experimento con las agujas contaminadas con *Bacillus subtilis.*

8. Incubar 24 - 48 horas a 37 °C.

9. Observar después de este período si la bacteria se desarrolló o no.

10. Anotar resultados y generar conclusiones.

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Qué tiempo fue requerido para inactivar a *E. coli*?

2. ¿Qué tiempo fue requerido para inactivar a *B. subtilis*?

3. Con base a los resultados anteriores, generar conclusiones.

4. Explicar el fundamento de la esterilización con el uso de radiaciones ionizantes y no ionizantes.

5. Describir dos equipos y tipos de membranas empleadas en el método de esterilización por filtración.

# PRÁCTICA Núm. 9
# MEDIOS DE CULTIVO

## I. OBJETIVO

Conocer la clasificación, preparación y esterilización de los medios de cultivo así como su distribución en diferentes recipientes.

## II. INTRODUCCIÓN

Un medio de cultivo es cualquier "material o sustrato" que proporcione substancias nutritivas que permitan el desarrollo y reproducción de microorganismos.

Estos pueden ser líquidos, sólidos o semisólidos (Apéndice A).

## CLASIFICACIÓN DE MEDIOS

Los medios de cultivo pueden clasificarse en:

### Naturales.

Están constituidos por substancias naturales, tales como papa, leche, huevos, sangre, etc.

### Sintéticos

Están compuestos de substancias que son manipuladas por el hombre en el laboratorio.

Estos a su vez se clasifican en:

- **Composición química definida**

  Preparados exclusivamente con substancias de composición química conocida.

- **Composición química indefinida.**

  Hecho con substancias químicas cuyos componentes no pueden analizarse o es difícil establecer su composición.

Un medio ampliamente usado en bacteriología es el caldo nutritivo, que no es más que una infusión de carne magra (sin grasa, tendones, aponeurosis, etc.). La carne puede ser de cualquier músculo incluyendo el corazón. En ocasiones y con el objeto de que tenga más productos nutritivos, se le agregan infusiones de cerebro, hígado, etc., que contienen ciertos factores nutritivos en mayor cantidad.

También son muy usados los caldos peptonados, en los cuales la carne o leche es sometida a hidrólisis ácida o enzimática, obteniéndose entonces péptidos y aún aminoácidos en diversas proporciones incrementando de esta manera estos componentes que son más fácilmente metabolizados.

Los caldos nutritivos pueden solidificarse con diversos agentes capaces de ser convertidos de "sol" a "gel" y viceversa. Uno de los más usados es un polisacárido complejo inatacable por las bacterias, muy higroscópico y que es extraído de ciertas algas rojas que existen en el Océano Pacífico. Este producto se llama **agar.** Una cantidad de 1.5 g agregados a 100 mL de caldo es suficiente para convertirlo en una masa de consistencia gelatinosa, más bien dura.

Para que el agar sea disuelto necesita temperaturas de casi 100°C y al irse enfriando permanece en esta forma de "sol" hasta los 40°C. Por debajo de esta temperatura se transforma en una masa sólida ("gel") que es estable así por tiempo indefinido.

También se cuenta con medios de cultivo semisólidos que son aquellos medios líquidos a los que se adiciona agar en bajas concentraciones: 0.4 a 0.8%. Éstos son útiles para determinar la movilidad de los microorganismos.

**Medios selectivos**

Estos han sido diseñados de tal manera que inhiban el desarrollo de un grupo de organismos, mientras que permiten el desarrollo de otro grupo proveniente de una flora mixta.

La inhibición puede deberse a la alteración del pH de un medio sólido. También se pueden incluir en un medio sólido substancias inhibidoras que dejen crecer ciertos tipos de bacterias pero no otras, sensibles a tal agente, teniendo entonces un medio que puede ser moderada o altamente selectivo, por ejemplo S-110

(Estafilococo 110), S.S. (*Salmonella-Shigella*) y S.D.A (agar de Sabouraud dextrosa), los cuales a la vez son diferenciales y selectivos.

**Medios enriquecidos**

Son aquellos a los que se les pueden agregar substancias para enriquecerlo, como por ejemplo gelosa nutritiva a la que se le agrega sangre, se denomina agar sangre, el cual puede ser utilizado en el aislamiento de bacterias muy exigentes en sus requerimientos nutricionales.

También se puede estudiar en este medio la acción de productos solubles bacterianos como las hemolisinas, en cuyo caso la colonia está rodeada de una aureola clara, donde estas enzimas han destruido los glóbulos rojos. Son ejemplos de medios enriquecidos: medio de suero de Loeffler para bacilos diftéricos, medio de Lowenstein-Jensen, para bacilos tuberculosos, caldo selenito cisteína y caldo tetrationato.

**Medio diferencial**

Es aquel en el que se ha añadido alguna clase de indicador, generalmente un colorante, que permite diferenciar entre distintas reacciones químicas que se producen durante el crecimiento Ej. E.M.B. (eosina-azul de metileno), que se utiliza para el aislamiento de enterobacterias Gram negativas. La presencia del azul de metileno inhibe a las bacterias Gram positivas.

**Medios de ensayo**

Son aquellos útiles en la identificación y clasificación de los microorganismos de acuerdo a sus actividades metabólicas particulares. Por ejemplo agar con harina de maíz para ayudar a identificar a *Candida albicans*; leche con indicador para observar la actividad proteolítica y fermentativa, así como la reducción del indicador.

**Medios deshidratados**

Son los que se encuentran en el comercio en forma de polvos secos.

La mayoría de los medios comúnmente utilizados en microbiología son de este tipo. Estos productos deshidratados se transforman fácilmente en medios de cultivo por adición de agua y esterilización.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Agar nutritivo deshidratado (Apéndice A)
- Caldo nutritivo deshidratado (Apéndice A)
- 2 Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- 6 Tubos de ensayo de 18 x 150 mm con tapón de rosca
- 3 Cajas de Petri estériles
- Algodón y gasa
- Espátula
- Vidrios de reloj
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Tripié y tela de asbesto
- Baño María
- Balanza

## IV. TÉCNICA

1. Pesar las cantidades correspondientes para preparar 30 mL de caldo nutritivo y 75 mL de agar nutritivo.

2. Disolver las cantidades pesadas en el volumen correspondiente de agua destilada, utilizando los matraces Erlenmeyer.

   El caldo nutritivo se disuelve fácilmente sin necesidad de calentar.

   Para disolver el agar nutritivo será necesario calentar a baño María por algún tiempo. El matraz deberá taparse con algodón y gasa para evitar evaporación y agitarse de vez en cuando para que la disolución sea uniforme.

   El medio estará disuelto cuando ya no haya formación de grumos y se observe transparente y no turbio.

3. Vaciar aproximadamente 10 mL de caldo nutritivo en cada uno de tres tubos de ensayo y taparlos.

4. De los 75 mL de agar nutritivo preparados, vaciar aproximadamente cinco mL de agar nutritivo en cada uno de tres tubos de ensayo y taparlos. El resto del medio dejarlo en el matraz.

5. Esterilizar los medios de cultivo en autoclave a 15 libras de presión (121 °C) por 15 minutos. Algunos medios requieren ser esterilizados mediante filtración para evitar su descomposición ó pérdida de su valor nutritivo (Figuras 9.1 y 9.2).

6. Una vez esterilizados los medios, dejar enfriar a temperatura ambiente los de caldo, inclinar los tubos que contienen agar nutritivo y dejarlos solidificar de tal forma que se obtenga una superficie de agar inclinada.

7. Dejar enfriar el agar contenido en el matraz hasta unos 45°C (hasta tolerar en la palma de la mano) y en condiciones asépticas distribuirlo en las tres cajas de Petri estériles (aproximadamente 20 mL en cada una).

**NOTA:**

Para hacer esta operación se retira el tapón del matraz, sin dejarlo en la mesa, y se pasa por la flama del mechero la boca de éste, luego se levanta la tapa de la caja de Petri estéril, solamente lo necesario para permitir la entrada del cuello del matraz para vaciar el agar. Inmediatamente se vuelve a tapar la caja de Petri.

Volver a flamear la boca del matraz y taparlo nuevamente si es que aún contiene medio de cultivo.

Es necesario mover ligeramente la caja de Petri para que el medio se distribuya uniformemente.

No se debe mover bruscamente ni destapar la caja hasta que el agar esté completamente endurecido, para poder ser inoculado.

8. Por lo que respecta a los tubos que contienen agar nutritivo, una vez que han solidificado, estarán listos para inocularse.

9. Guardar todos los tubos y cajas en el refrigerador rotulándolos adecuadamente, ya que se usarán posteriormente.

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Por qué es necesario preparar los medios de cultivo con agua destilada o desmineralizada?

2. ¿Mencionar dos ejemplos de medios de cultivo que requieran su esterilización por filtración?

3. ¿Por qué se recomienda enfriar a 45°C el agar antes de efectuar el vaciado en las cajas Petri?

4. ¿Qué características tiene el agar en cuanto a composición química, valor alimenticio y propiedades físicas?

5. Consultar la composición de los siguientes medios: S.S., S-110, EMB, XLD, LIA, SDA, MIO, caldo nutritivo y caldo Czapek-Dox.

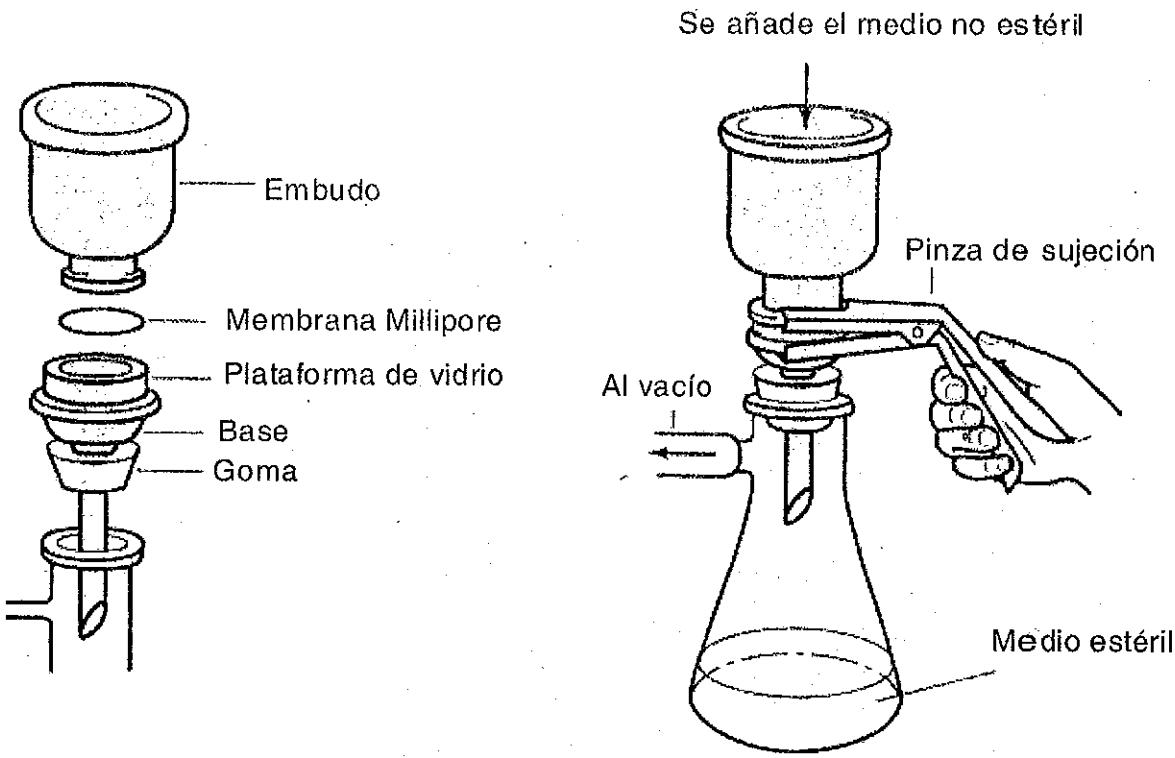



**Figura 9.1 Esterilización de medios de cultivo mediante filtración Millipore**

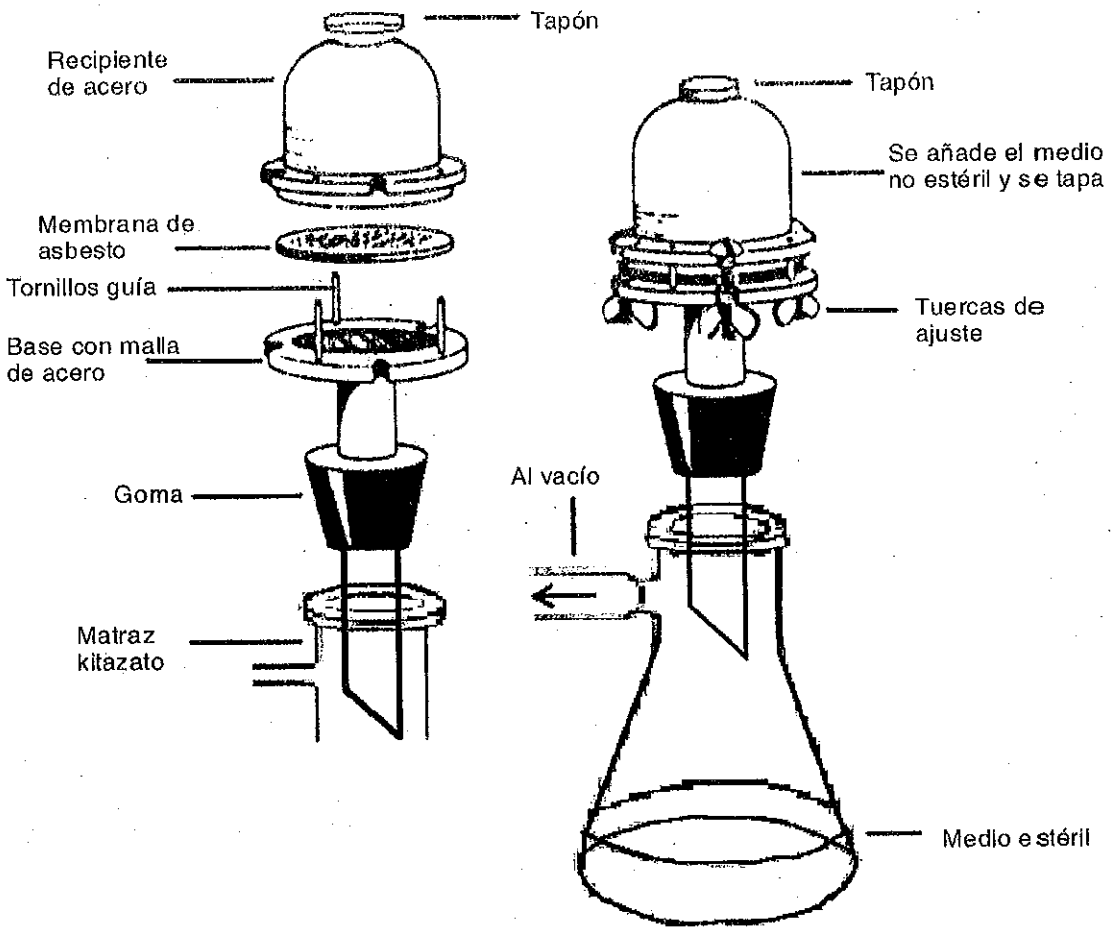



**Figura 9.2 Filtro Seitz útil en la esterilización de medios de cultivo**

# PRÁCTICA Núm. 10
# ANTISEPSIA DE LA PIEL

## I. OBJETIVO

Conocer la acción de diversos antisépticos sobre la flora normal de la piel.

## II. INTRODUCCIÓN

Para el control de microorganismos infecciosos o perjudiciales en algún otro aspecto como puede ser el deterioro de algunos materiales, se pueden usar agentes químicos tales como: alcoholes, fenol y compuestos fenólicos, yodo, cloro y compuestos clorados, jabones y detergentes, colorantes, etc. o agentes físicos como la temperatura - calor o frío -, radiaciones ultravioleta, métodos de filtración, etc., pero cuando deseamos eliminar microorganismos indeseables de la superficie o el interior de los seres vivos estos últimos no pueden ser usados, por lo que se tiene que recurrir a los agentes químicos.

Existen muchas substancias químicas útiles para este fin, cuya potencia antimicrobiana es variable, ya que no existe ningún agente ideal para todos y cada uno de los casos, así, mientras algunos son muy eficaces para ciertos casos, tienen poco o ningún efecto en otros. Por ejemplo, un agente químico adecuado para desinfectar utensilios contaminados (desinfectante), puede ser totalmente inadecuado para aplicarlo sobre la piel, ya que puede ocasionarle daño, en cuyo caso se recurre al uso de productos químicos que previenen o detienen la acción de los microorganismos, ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad asegurándose de que no causen ningún daño al huésped (antisépticos).

Los **desinfectantes** son productos químicos que matan a los microorganismos y se utilizan sobre objetos inanimados. Los **antisépticos**, por otra parte, son agentes químicos que inhiben el crecimiento de los microorganismos y no son suficientemente tóxicos como para ser aplicados a los tejidos vivos.

Los agentes que matan a los microorganismos se denominan microbicidas, con un prefijo que indica el tipo de microorganismo que mata. Así pues hay agentes bactericidas, fungicidas y viricidas.

Un agente bactericida mata a las bacterias, aunque puede matar o no a otras clases de microorganismos.

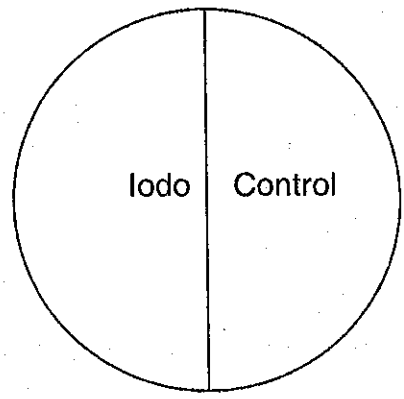
Los agentes que no matan y solamente inhiben el crecimiento se denominan agentes biostáticos y se puede hablar de agentes, bacteriostático, fungistático y viristático.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Agua oxigenada
- Tintura de yodo al 1%
- Tintura de merthiolato
- Alcohol al 96%
- Solución salina isotónica estéril (NaCl al 0.85%)
- Agua y jabón
- 12 Hisopos estériles
- 5 Cajas de Petri con agar nutritivo estéril
- Lápiz graso
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Cuenta colonias Quebec

## IV. TÉCNICA

1. Dividir una caja de Petri en dos mitades, trazando por detrás una línea con un lápiz graso. Marcar una de las mitades como control y la otra con el nombre del antiséptico asignado, por ejemplo:




2. Humedecer en condiciones asépticas un hisopo en solución salina isotónica estéril y frotarse con él la cara interna del antebrazo derecho e inocular mediante estrías la mitad de la caja de Petri marcada como control.

3. Humedecer otro aplicador con el agente antiséptico asignado y frotarse sólo una vez en el antebrazo izquierdo en un área de 5 $cm^2$.

4. Esperar un minuto y humedecer otro hisopo en solución salina y frotar el área tratada con el antiséptico e inocular mediante estría, la otra mitad de la caja de Petri.

5. Los alumnos que usarán agua y jabón, seguir el paso 1, luego lavar con agua y jabón por un minuto un área del antebrazo izquierdo, enjuagar con agua corriente y enseguida frotar con un aplicador humedecido en solución salina estéril e inocular mediante estría la otra mitad de la caja de Petri.

6. Incubar las cajas durante 24-48 horas a 37 °C.

7. Después de este período observar si hubo crecimiento sobre las estrías de inoculación de cada una de las mitades de las cajas de Petri.

8. Contar las colonias usando el cuenta colonias tipo Quebec.

9. Interpretar resultados.

## V. CUESTIONARIO

1. Comparar los resultados con los demás compañeros y hacer una Tabla indicando el antiséptico empleado y el número de colonias en donde hubo crecimiento.

2. Mencionar ejemplos de desinfectantes y antisépticos indicando un uso específico en cada caso.

3. Mencionar otros agentes químicos que afectan la viabilidad de los microorganismos.

4. De los antisépticos utilizados en la práctica ¿cuál resultó ser más eficaz?

5. Indicar el sitio y modo de acción de cada uno de los siguientes agentes antimicrobianos: fenol, sales de mercurio, sales de metales pesados, óxido de etileno y alcoholes.

# PRÁCTICA Núm. 11
# RESIEMBRA DE TUBO A TUBO

## I. OBJETIVO

Aprender a inocular o sembrar asépticamente de tubo a tubo.

## II. INTRODUCCIÓN

Existen diversas técnicas de inoculación, ya sea en tubo de ensayo, caja de Petri, matraz, etc., siendo necesario en cualquiera de ellas, hacerlo en condiciones asépticas, es decir, tomando todas las precauciones necesarias para evitar la contaminación tanto de los cultivos como de la persona que está realizando la siembra, para lo cual se requiere realizar la siembra en el menor tiempo posible a efecto de minimizar el tiempo de exposición en el que puede ocurrir la contaminación.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Tubo de ensayo con suspensión bacteriana
- Tubo de ensayo con agar nutritivo inclinado
- Tubo de ensayo con caldo nutritivo
- Gradilla
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Asa bacteriológica
- Masking tape

## IV. TÉCNICA

1. Aflojar los tapones de los tubos. Si los tapones son de algodón que éstos giren libremente por las paredes del tubo.

2. Sostener el tubo con suspensión bacteriana entre los dedos índice y medio de la mano izquierda.

3. Sostener el tubo que contiene medio de cultivo no inoculado entre los dedos medio y anular de la misma mano izquierda.

4. Sostener los tubos por el fondo con el dedo pulgar. Ambos tubos deberán formar una ligera V quedando las bocas a la misma altura (Figura 11.1).

5. Esterilizar el asa bacteriológica calentándola "al rojo" en la parte más alta de la flama del mechero, antes y después de la siembra.

6. Quitar el tapón del tubo que contiene la suspensión bacteriana usando los dedos índice y medio de la mano derecha y con el espacio interdigital de los dedos medio y anular quitar el tapón del otro tubo.

7. Flamear las bocas de los tubos momentáneamente.

8. Cerca de la flama del mechero, introducir el asa la cual ya se ha enfriado, en el tubo que contiene la suspensión bacteriana, tomar una asada y depositarla en el tubo que contiene medio sin inocular.

9. Si el medio es líquido, descargar el asa mediante agitación.

10. Si el medio es sólido inclinado, descargar el asa en el fondo del tubo y trazar zig-zag en toda la superficie, desde el fondo hasta arriba, procurando no romper el agar.

11. Flamear de nuevo momentáneamente las bocas de los tubos y colocar los tapones en el mismo orden en que se quitaron.

12. Esterilizar nuevamente el asa bacteriológica.

13. Incubar durante 24-48 horas a 37 °C.

14. Después de este período, observar el tipo de desarrollo.

15. Interpretar los resultados.

## V. CUESTIONARIO

1. Definir el término "inoculación"

2. ¿Por qué es necesaria la incubación de los microorganismos?

3. En microbiología, ¿qué significa el término "crecimiento"?

4. Describir la técnica de inoculación en tubo por "picadura"

5. Consultar las diferentes formas de desarrollo que se pueden observar en la siembra en tubo con medio líquido, agar vertical inoculado por picadura y agar inclinado sembrado por estría.

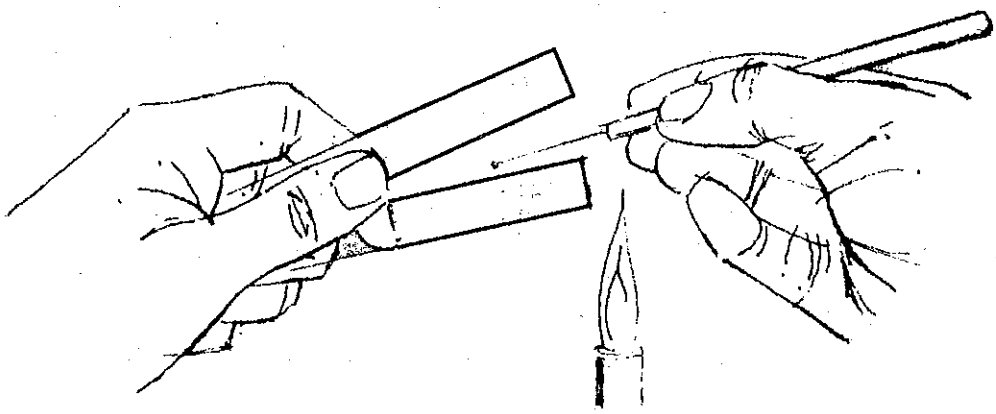


**Figura 11.1 Resiembra de tubo a tubo**

# PRÁCTICA Núm. 12
# AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS A PARTIR DE UN CULTIVO MIXTO Y OBTENCIÓN DE UN CULTIVO AXÉNICO

## I. OBJETIVO

Aislar dos microorganismos por la técnica de siembra de dilución por estría en placa de agar y obtener un cultivo axénico o puro.

## II. INTRODUCCIÓN

Si se toma un asa bacteriológica cargada con una muestra que contenga bacterias y se van haciendo estrías de ésta sobre una placa de agar nutritivo de tal manera que el material se vaya "diluyendo" sobre la superficie (Figura 12.1), llegará un momento en que las bacterias depositadas en la estría estén bien separadas unas de otras, reproduciéndose cada una en progresión geométrica (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, etc.).

Dependiendo del tiempo de generación, que varía según la especie bacteriana, después de cierto tiempo, cada una se habrá multiplicado muchas veces, formando sobre la superficie del medio un pequeño promontorio constituido por células bacterianas llamado "**colonia**", que se obtiene generalmente en unas 24-48 horas.

Las colonias de cada especie bacteriana son diferentes ya sea en tamaño, color, consistencia etc., y pueden ser diferenciadas sobre estas bases.

Cada colonia aislada está constituida de un solo tipo de bacterias, ya que se supone que es la descendencia de una sola célula y por tanto, un cultivo puro.

Para estudiar las características físicas, químicas, fisiológicas, etc., de una bacteria, se necesita que ésta sea aislada en cultivo puro y el aislamiento en caja de Petri es el primer paso para ello, siendo el segundo paso la siembra de una porción de una colonia en un medio de cultivo en tubo, verificando su pureza después de la incubación apropiada, mediante observación al microscopio.

La morfología de las colonias es importante por lo anteriormente expuesto y debe familiarizarse el alumno con ella (Figura 12.2). La terminología mencionada a continuación sobre algunas de las características más constantes de una colonia bacteriana es muy útil:

**FORMA:**

Puntiforme, circular, irregular, alargada, filamentosa, rizoide, etc.

**TAMAÑO:**

Estimar el diámetro en mm.

**SUPERFICIE:**

Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.

**ELEVACIÓN:**

Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, etc.

**BORDE:**

Entero o continuo, ondulado, lobulado, festoneado, filamentoso, etc.

**ESTRUCTURA INTERNA:**

Amorfa o granulosa.

**COLOR:**

Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.

**OPACIDAD:**

Transparente, opaca, etc.

**CONSISTENCIA:**

Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc. Usar el asa bacteriológica para determinar la consistencia.

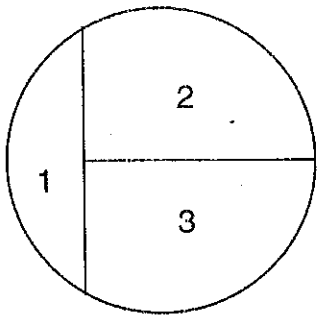
## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS.

- Caja de Petri conteniendo agar nutritivo estéril
- 2 Tubos de ensayo conteniendo agar inclinado

- Tubos de ensayo conteniendo cultivo mixto
- Lápiz graso
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Gradilla

## IV. TÉCNICA

1. Con el lápiz graso dividir la caja de Petri en 3 sectores, de tal manera que al destaparla para proceder a la inoculación, se tenga como se indica en la figura:




El sector No. 1 es más pequeño y sirve para descargar el asa.

2. Usando la técnica ya conocida, tomar el cultivo bacteriano y en condiciones asépticas obtener una asada del material.

3. Una vez cerrado el tubo, colocarlo en una gradilla.

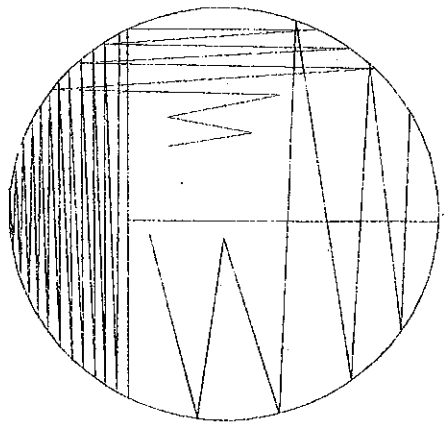
4. Con la mano izquierda levantar parcialmente la tapa de la caja de Petri y descargar el material en el sector 1, trazando una serie de zig-zags muy cerrados a todo lo ancho del sector. Cerrar la caja.

5. Esterilizar el asa flameándola y mientras que se enfría, girar la caja 90° hasta que el sector 1 quede abajo y el 2 en el lado izquierdo.

6. Trazar unos 5 zig-zags menos cerrados en el sector 2 invadiendo el sector 1 para llevar un poco de material al sector 2 y trazar los siguientes zig-zags sin tocar el sector 1. En esta forma se diluye el material quedando unas bacterias separadas de las otras. Cerrar la caja.

7. Esterilizar de nuevo el asa, girar la caja 90° y ahora el sector 2 estará abajo y el 3 a la izquierda.

8. Trazar unos 5 zig-zags cada vez mas abiertos en el sector 3 invadiendo el sector 2 y los siguientes zig-zags sin tocar el sector 2, como se muestra en el dibujo:



9. Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

10. Observar si hubo o no, aislamiento de colonias.

**NOTA:**

En el sector 1 generalmente no se obtienen colonias aisladas, pero en 2 y 3 sí.

11. Anotar las características de las colonias aisladas.

12. A partir de cada una de las diferentes colonias aisladas preparar frotis y teñir con la técnica de Gram.

13. Observar al microscopio con objetivo de inmersión para verificar la morfología y reacción al Gram y determinar la pureza de las colonias, considerando puras a las que muestren un solo tipo de bacteria.

14. A partir de las colonias puras efectuar una segunda resiembra en caja de Petri en tres campos y una nueva verificación de pureza por observación microscópica en la forma indicada anteriormente.

15. Una vez determinada la pureza de las colonias, a partir de cada una de ellas inocular por estría en tubos de agar inclinado, para obtener cultivos puros (Figura 12.3).

16. Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

17. Después de este período observar si efectivamente hubo crecimiento de un solo tipo de microorganismos.

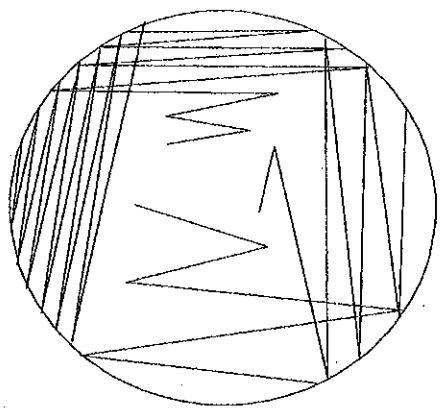
18. Preparar un frotis, teñir con la técnica de Gram y observar al microscopio con objetivo de inmersión para confirmar su pureza.

19. Dibujar las observaciones hechas al microscopio.

20. Guardar los cultivos puros en el refrigerador para su posterior identificación.

**NOTAS:**

- Siguiendo la misma técnica, la caja de agar se puede dividir en más de 3 sectores, obteniendo una dilución mayor, como se muestra en el dibujo:



- Existen otras técnicas de aislamiento en placa, como pueden ser la siembra en superficie y la de placa vertida (Figura 12.4).

## V. CUESTIONARIO

1. Describir una técnica de aislamiento bacteriano a partir de una fuente natural.

2. Describir dos técnicas de aislamiento en tubo.

3. ¿Qué es un cultivo axénico o puro?

4. ¿Qué importancia tiene la obtención de un cultivo puro?

5. Mencionar 5 colecciones de cultivos suministradoras de cultivos microbianos puros.

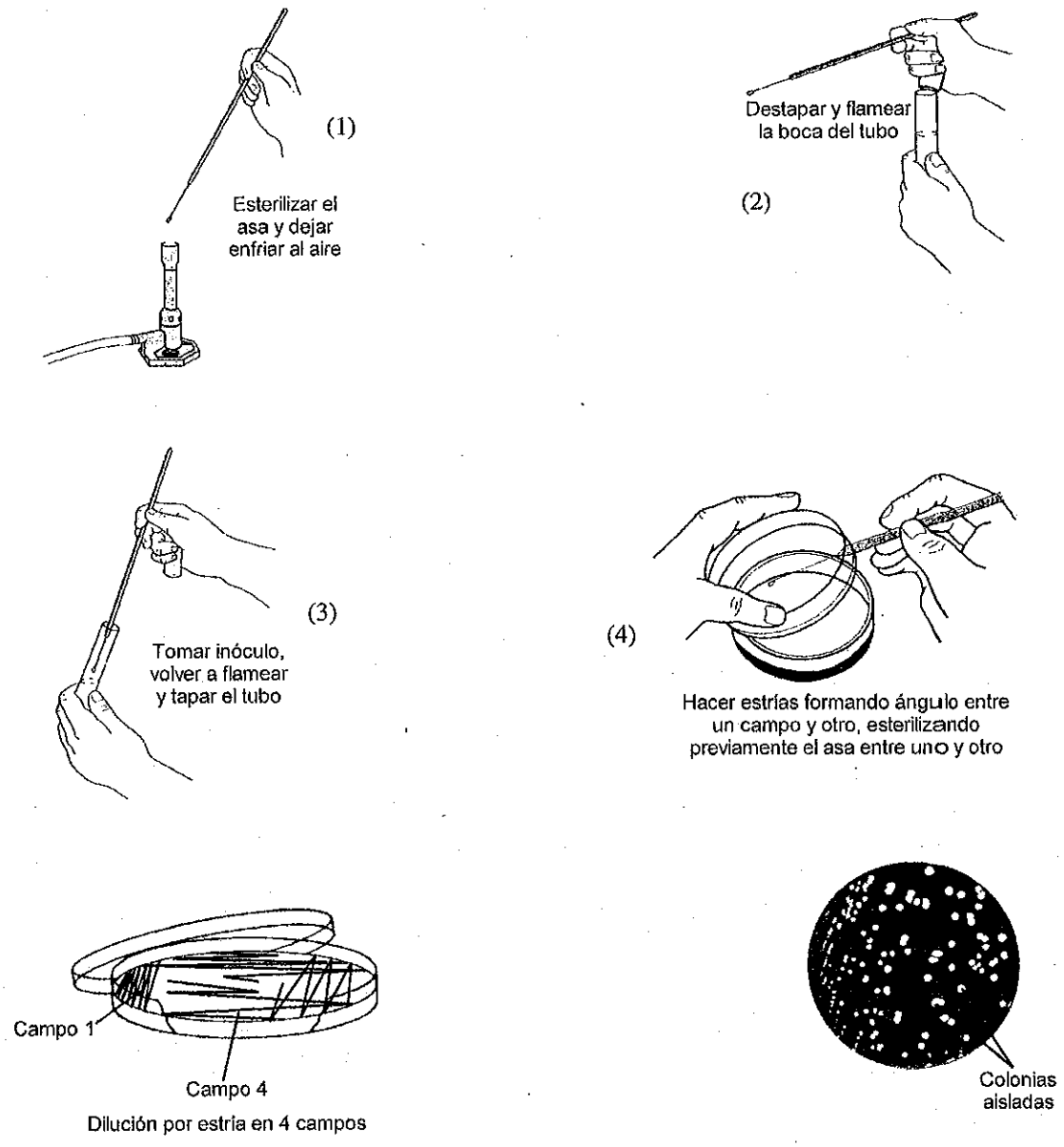



**Figura 12.1 Siembra en placa para aislamiento por la técnica de dilución por estría**

**Forma**

Puntiforme

Rizoide

Alargada

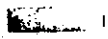
Irregular

Circular

Filamentosa

**Elevación**

Convexa



Elevada

Pulvinada

Aplanada

Umbonada

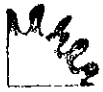
**Borde**

Entero

Ondulada

Estrellada

Festoneada



Lobulada

Filamentosa

**Figura 12.2 Morfología colonial en placa**

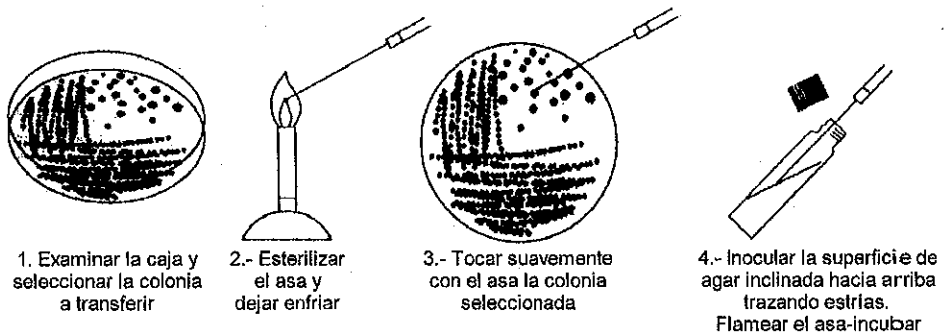



**Figura 12.3 Obtención de cultivo puro**

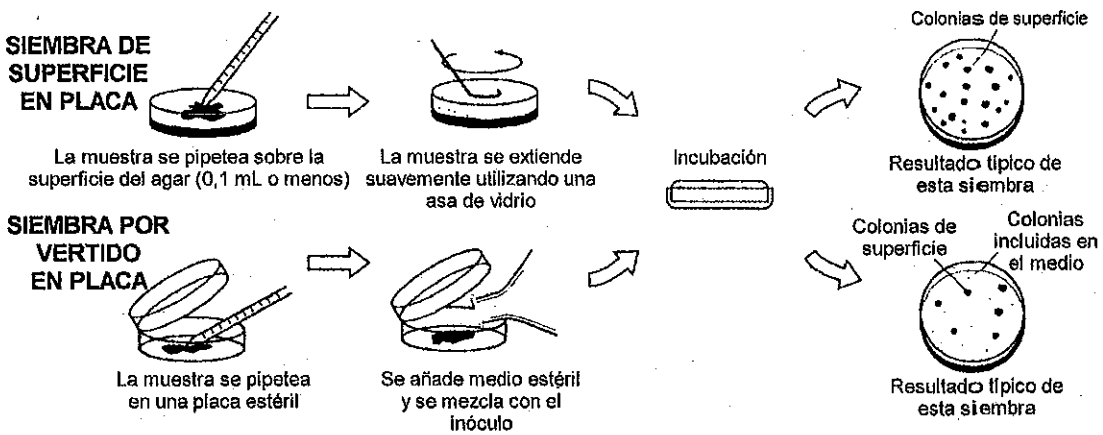



**Figura 12.4 Otras técnicas de aislamiento en placa**

# PRÁCTICA No. 13

# METABOLISMO BACTERIANO

## I. OBJETIVO

Conocer el metabolismo de dos bacterias, así como otras actividades bioquímicas, que servirán de criterio para clasificarlas e identificarlas.

## II. INTRODUCCIÓN

**Metabolismo** es el conjunto de reacciones bioquímicas que efectúa la célula.

El metabolismo comprende: **catabolismo**, durante el cual se efectúan reacciones de degradación o desasimilación de sustratos con producción de energía, la cual es utilizada en síntesis de nuevo protoplasma mediante el proceso de **anabolismo**.

Además, la energía es utilizada por la célula en otras actividades como: movilidad, transporte activo de moléculas del exterior al interior de la célula, mantenimiento de barreras osmóticas, etc.

Todas las reacciones metabólicas de las bacterias son enzimáticas.

Los carbohidratos son metabolizados por la ruta anaerobia de Embden-Meyerhof Parnas o bien por la ruta oxidativa de las pentosas (Warburg Dickens), las cuales conducen a la formación de ácido pirúvico, el cual, bajo ciertas condiciones (presencia o no de oxígeno), puede transformarse en acetil-coenzima A y pasar al ciclo oxidativo de los ácidos tricarboxílicos de Krebs.

Los electrones y protones liberados de todas estas conversiones son transportados por la cadena respiratoria final en los microorganismos aerobios (respiración indirecta citocrómica) formada por nucleótidos de nicotinamida, de flavinas y citocromos, hasta el oxígeno, si las células son puestas en presencia de él.

Otros microorganismos no poseen la cadena citocrómica final y no pueden usar el oxígeno libre como aceptor final de electrones y por lo tanto no se desarrollan en presencia de este elemento, pasando su hidrógeno y sus electrones a oxígeno combinado a otros elementos. Estos son los llamados microorganismos anaerobios estrictos.

Las diferencias en el metabolismo de las especies bacterianas pueden usarse para diferenciar una especie de otra y por lo tanto son recursos usados para clasificarlas.

## III. EFECTO DEL OXÍGENO MOLECULAR SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

### MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 2 Cultivos puros en caldo nutritivo
- 2 Tubos de ensayo conteniendo agar nutritivo
- 2 Aplicadores estériles
- Gradilla
- Baño de agua a temperatura constante (45 °C)
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Tripié
- Tela de asbesto
- Vaso de precipitados de 600 mL

### TÉCNICA

1. Fundir el agar contenido en los tubos, en baño de agua y mantenerlo a una temperatura de 45 °C.

2. Inocular en condiciones asépticas los tubos con agar fundido y a 45 °C a partir de los cultivos puros (uno para cada tubo de agar), en la siguiente forma:

3. Introducir el aplicador al tubo que contiene el cultivo bacteriano, cuidando que cuando menos la mitad del aplicador se impregne con el cultivo.

4. Enseguida introducir el aplicador contaminado hasta el fondo en el tubo de agar fundido a 45 °C y moverlo de un lado a otro para distribuir bien las bacterias en el agar.

5. Tapar el tubo y colocarlo en una gradilla para que se solidifique en forma vertical.

6. Incubar a 37 °C por 24 horas.

7. Observar después de este período a qué altura creció la bacteria sembrada: en la superficie o en el fondo o bien en todo el tubo (Figura 13.1).

8. Anotar resultados y generar conclusiones.

## IV. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

### MATERIAL Y SUBSTANCIAS

–2 Juegos de tubos de fermentación (con campana Durham), conteniendo carbohidratos - glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa, rafinosa, manosa, maltosa, etc. - en caldo con rojo de fenol como indicador (Apéndice A).

### TÉCNICA

1. Inocular asépticamente cada uno de los tubos de cada juego, con el respectivo microorganismo.

Rotular adecuadamente los tubos.

2. Incubar a 37 °C por 24-48 horas.

3. Después de este período observar las reacciones que se efectúan en los medios de fermentación.

### INTERPRETACIÓN:

- La utilización del substrato se ve demostrada por la fermentación del carbohidrato, lo cual se sabe si el indicador vira de color rojo a amarillo.

- Observar si además hubo también turbidez y producción de gas, demostrable por la acumulación de éste en la campana Durham (Figura 13.2).

4. Anotar resultados y sacar conclusiones.

## V. CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE LAS BACTERIAS

La acción de degradación de un organismo sobre una proteína intacta es análoga al tipo de acción sobre los carbohidratos.

En el caso del almidón, la enzima amilasa degrada al polisacárido en unidades de glucosa que la célula absorbe con facilidad.

En el caso de una proteína por ejemplo la gelatina, la enzima gelatinasa logra más o menos los mismos resultados produciéndose unidades simples o sea, los aminoácidos.

Como se mencionó antes, el aspecto primordial del metabolismo es la generación y el transporte de electrones, liberando la energía requerida para dicho metabolismo.

Una faceta de este sistema de transporte de electrones es la capacidad de reducir los nitratos a nitritos.

La enzima que permite esta reacción es la "nitrato reductasa."

Muchas bacterias pueden sintetizar aminoácidos a partir de subproductos del metabolismo de carbohidratos y lípidos, cuando disponen de amoníaco como fuente de nitrógeno.

Algunos de estos microorganismos pueden romper el compuesto de urea, por acción de la enzima "ureasa", en amoníaco y dióxido de carbono.

Este último se incorpora al metabolismo de carbohidratos y nitrógeno a través de diversas reacciones importantes.

## MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 2 tubos con caldo nitrato (Apéndice A)
- 2 tubos con caldo urea, con indicador (Apéndice A)
- 2 cajas Petri conteniendo agar almidón (Apéndice A)
- 2 cajas Petri conteniendo agar gelatina (Apéndice A)
- Solución de yodo (lugol) (Apéndice B)
- Ácido tricloroacético al 5% (Apéndice C)
- Ácido sulfanílico (Apéndice C)
- Solución de dimetil-alfa-naftilamina (Apéndice C)
- Zn en polvo
- 4 tubos de ensayo estériles
- Gradilla
- Pipetas estériles de 1 mL
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor

- Asa bacteriológica
- Espátula

## TÉCNICAS

### A. HIDRÓLISIS DE ALMIDÓN

1. Con un lápiz graso, marcar 2 sectores en la base de la placa de agar almidón y usar un sector para cada organismo.

2. Inocular en forma de una sola estría a partir de cada cultivo en su sector correspondiente.

3. Incubar a 37 °C durante 48 horas.

4. Después de este período cubrir con cuidado la superficie de la caja con la solución de yodo.

5. Buscar zonas transparentes o claras alrededor de las colonias bacterianas en donde se haya digerido al almidón y anotar las conclusiones.

### B. METABOLISMO DEL NITRÓGENO

1. Inocular asépticamente los medios que contengan agar gelatina, caldo nitrato y caldo urea con cada uno de los cultivos bacterianos.

2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

3. Después de la incubación, determinar los resultados como sigue:

### HIDRÓLISIS DE LA GELATINA

a) Cubrir la superficie de la placa de agar gelatina con 2 mL de la solución de ácido tricloroacético.

b) La actividad de la gelatinasa se indica por medio de zonas transparentes alrededor de las colonias.

c) Anotar las conclusiones.

## ACTIVIDAD DE LA NITRATO REDUCTASA

a) Extraer 2 mL de caldo de nitrato y colocarlos en un tubo de ensayo estéril.

b) Añadir una gota del reactivo ácido sulfanílico y una gota de p-dimetil-alfa-naftilamina.

c) Hacer observaciones.

## INTERPRETACIÓN:

Una coloración rojiza o café, es resultado positivo, es decir, existe nitrito.

Si no se desarrolla color, el resultado es negativo. Esto indica la ausencia de nitrito y puede significar que el nitrato no se ha reducido o que se han reducido el nitrato y el nitrito.

Para precisar bien que el nitrato no se ha reducido puede seguirse el siguiente procedimiento:

- Extraer 2 mL del cultivo y colocarlos en un segundo tubo de ensayo estéril.
- Añadir una pequeña cantidad de polvo de zinc y el nitrato reacciona.
- Si se produce un color rojo, el Zn ha reducido el nitrato al nitrito.
  Esto indica que el nitrato se encontraba presente y que no fue reducido por acción bacteriana.
- Si no se produce color rojo, esto indica que las bacterias han reducido a los nitratos y a los nitritos, lo cual equivale a una prueba "nitrato reductasa positiva".

d) Anotar conclusiones.

## ACTIVIDAD DE LA UREASA

a) Una coloración roja o rojo cereza en el caldo de urea equivale a una prueba positiva (hidrólisis de la urea).

Esta coloración se debe a un indicador de pH en el medio, lo cual demuestra la presencia de amoníaco (pH 8.1 o más alcalino).

b) Anotar las conclusiones.

## VI. OTRAS REACCIONES BIOQUÍMICAS USANDO MEDIOS DE ENSAYO

### MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Cultivos puros
- 2 tubos de ensayo conteniendo medio S.I.M (Apéndice A)
- 2 tubos de ensayo conteniendo medio T.S.I (Apéndice A)
- 2 tubos de ensayo conteniendo medio MR-VP (Apéndice A)
- 2 tubos de ensayo conteniendo medio de SIMMONS (Apéndice A)
- Asa bacteriológica
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Reactivo de Kovac (Apéndice C)
- Reactivo de Voges Proskauer (Apéndice C)
- KOH al 40% (Apéndice C)

### TÉCNICAS

### T.S.I. (Agar-triple azúcar-hierro)

El agar T.S.I. tiene un color rojo naranja en su totalidad (inclinado).

1. Sembrar por picadura en el fondo y luego en estría al retirar el asa.

2. Incubar a 37 °C durante18-24 horas.

3. Observar resultados:

a) Si la **lactosa** es fermentada: Hay producción de ácido - color amarillo -, en el fondo y en la superficie y producción de gas en la línea de inclinación y en el fondo.

b) Si la **sacarosa** es fermentada: Hay producción de ácido - color amarillo -, en la línea y en el fondo.

c) Si la **glucosa** es fermentada: Hay producción de ácido - color amarillo -, en el fondo solamente, la superficie permanece alcalina (roja), aunque más roja que el medio no inoculado.

d) Si **ningún azúcar** es fermentado: El fondo permanece rojo naranja - como el medio no inoculado -, y la superficie de un rojo un poco más oscuro. Debe observarse con cuidado para no confundir como fermentación de la glucosa.

e) Si hay producción de **gas** durante la fermentación de cualquiera de los azúcares: Hay formación de burbujas con quebraduras del fondo del agar.

f) Si se produce **sulfuro**: Se observa ennegrecimiento del medio en el fondo o debajo de la superficie del agar, debido a la formación de FeS.

**S.I.M.**

Se emplea para la determinación de producción de sulfuro, formación de indol y movilidad de bacilos entéricos.

1. Inocular por picadura en el centro.

2. Incubar a 37 °C durante 18-24 horas o un tiempo mayor.

3. Observar resultados:

   a) Formación de **sulfuros:** Se determina por el ennegrecimiento del medio a lo largo de la línea de inoculación.

   b) Producción de **indol:** El alto contenido de tripticasa ayuda a observar la producción de indol, agregando el reactivo de Kovac (p-dimetilamino-benzaldehído en HCl y alcohol amílico), formará una coloración bugambilia.

   c) **Movilidad:** Se determina por el crecimiento lejos de la línea de inoculación.

**SIMMONS**

Se utiliza Agar citratado para diferenciar las bacterias entéricas Gram negativas basándose en la utilidad del citrato como única fuente de carbono.

Puede utilizarse de la misma manera el citrato de Koser para hacer la prueba.

1. Inocular por estría en tubo inclinado.

2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

3. Observar resultados.

La reacción es positiva si hay un cambio en el color verde del medio al azul (alcalino), del indicador o si se observa desarrollo aun cuando no haya este vire.

Si se utiliza medio de Koser (líquido), la prueba será positiva si la bacteria crece y enturbia el medio.

**MR-VP**

Tubo con caldo glucosado. Se utiliza para observar la reacción rojo de metilo y la de Voges Proskauer (producción de acetil-metil-carbinol).

1. Inocular el medio en la forma usual.

2. Incubar a 37 °C por 24 horas.

3. Después de este periodo efectuar las siguientes reacciones:

**Voges Proskauer**

A 1 mL del cultivo agregar el reactivo de Voges Proskauer: 0.6 mL de alfa-naftol al 5% en alcohol etílico absoluto; agregar 0.2 mL de KOH al 40% conteniendo 0.3% de creatina, agitar fuertemente y dejar reposar por 5-10 minutos.

La prueba **positiva** da un color rojo-naranja fuerte que aparece en la superficie y poco a poco se extiende por todo el tubo.

**Rojo de metilo**

Al resto del cultivo agregarle una gota de rojo de metilo. Si el pH del medio baja por el metabolismo bacteriano sobre la glucosa, es menor de pH 4.5, el indicador se torna rojo y se dice que la prueba del rojo de metilo es positiva.

Si el pH del medio está por arriba de pH 4.5 el color que toma el medio al agregarle el indicador es amarillo y entonces la prueba es negativa.

## VII. CUESTIONARIO

1. Elaborar un cuadro con todos los resultados de las distintas pruebas.

2. Comparar los resultados anteriores con la Tabla de reacciones bioquímicas que se les proporcionará y clasificar las bacterias problema.

3. Hacer dibujos de las observaciones hechas.

4. Consultar la reacción del desdoblamiento de la urea por acción de la enzima ureasa.

5. Consultar la reacción del desdoblamiento del triptofano para la producción de indol.

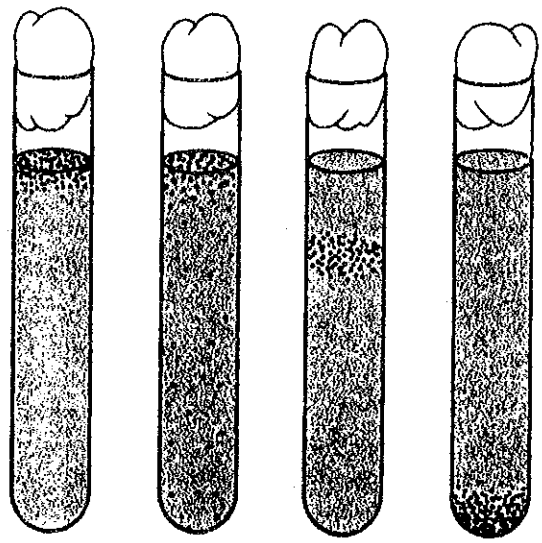


**Figura 13.1 Crecimiento bacteriano de acuerdo a la utilización del oxígeno**

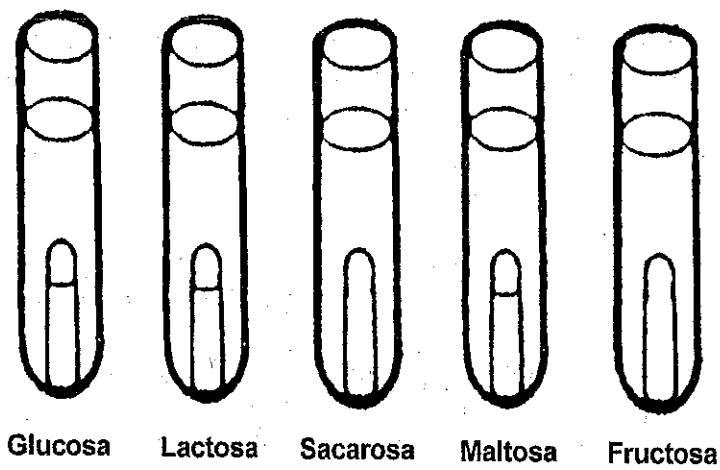



**Figura 13.2 Fermentación de carbohidratos. Se observa presencia de gas dentro de la campana Durham en glucosa, lactosa y maltosa, lo que indica prueba positiva.**

## PRÁCTICA Núm. 14

# AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS FORMADORAS DE ESPORAS A PARTIR DE SUELO DE JARDÍN

## I. OBJETIVO

Conocer las técnicas más comúnmente empleadas en el aislamiento de bacterias anaerobias.

## II. INTRODUCCIÓN

Las bacterias anaerobias no pueden crecer en presencia de oxígeno, mientras que las bacterias anaerobias facultativas crecen en presencia o en ausencia de éste.

Las bacterias anaerobias pueden obtener energía en ausencia de oxígeno, y éste les es tóxico.

Las anaerobias facultativas pueden obtener energía en ausencia de oxígeno, pero en este caso el oxígeno no les es tóxico.

No se conoce bien el mecanismo por el cual el oxígeno molecular es tóxico para las anaerobias y debe intervenir más de un mecanismo.

El oxígeno podría actuar mediante la producción de sustancias tóxicas, como peróxido de hidrógeno o peróxidos orgánicos.

El género *Clostridium* comprende aquellos bacilos que son esporulados y anaerobios.

Algunas de las especies de este género son importantes en la producción de disolventes orgánicos y de otros productos metabólicos de interés industrial.

No obstante, existen unos cuantos que son patógenos para el hombre y animales inferiores, aunque su capacidad invasiva es por lo general bastante limitada. Se consideran como microorganismos saprofitos del suelo que pueden colonizar el intestino grueso y bajo ciertas circunstancias, actúan como patógenos oportunistas.

La patogenicidad de los *Clostridium* es atribuible quizá, a su capacidad para formar poderosas enterotoxinas, capaces de producir intoxicaciones alimenticias como es el caso del botulismo.

Entre los miembros más importantes para el hombre, desde el punto de vista patógeno, se encuentran el grupo de la gangrena gaseosa: *C. perfringens, C. novy* y *C. septicum*; *C. tetani* que causa el tétanos y *C. botulinum*, responsable de una seria y a menudo fatal intoxicación alimenticia (botulismo), en la cual la exotoxina botulínica preformada es ingerida junto con los alimentos.

Las características específicas de estas bacterias como son la formación de esporas y su metabolismo anaerobio facilitan su aislamiento mediante diversas técnicas que pueden ser físicas, químicas y biológicas, para lo cual es necesario eliminar las formas vegetativas o no esporuladas.

Los microorganismos esporulados se aíslan fácilmente eliminando las formas vegetativas mediante un tratamiento térmico que sólo las esporas pueden resistir; los microorganismos contaminantes no esporulados morirán, en tanto que las esporas se desarrollarán al ponerlas en un medio favorable.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestra de 10 g de suelo de jardín
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Baño de agua a temperatura controlada, a 85 °C y a 45 °C
- Balanza granataria
- Vidrio de reloj estéril
- Espátulas estériles
- 1 Matraz Erlenmeyer con 99 mL de solución salina estéril
- 2 Tubos de 18 x 150 mm, cada uno con 9 mL de solución salina estéril
- 2 Tubos de 18 x 150 mm, cada uno con 9 mL de medio fluido de tioglicolato (Apéndice A)
- 1 Tubo de 18 x 150 mm con 8 mL de aceite de parafina estéril
- 4 Tubos de 22 x 175 mm, c/u con 20 mL de agar Infusión de cerebro corazón ó agar anaerobio (Apéndice A)
- 4 Cajas Petri estériles
- Pipetas serológicas estériles de 1 mL
- 2 Pipetas Pasteur de 12 cm estériles
- Gradilla para tubos de 18 x 150 mm y de 22 x 175 mm
- Colorantes y reactivos para tinción de Gram
- Jarra de anaerobiosis (Figura 14.1)
- Sobre generador de $H_2$ y $CO_2$ (GasPak)
- Indicador de anaerobiosis (GasPak)
- Pirogalol alcalino recién preparado (Apéndice C)
- Papel filtro

- Microscopio
- Aceite de inmersión

## IV. TÉCNICA

1. A partir de la muestra de suelo y en condiciones asépticas, pesar 1 g y transferirlo al matraz con solución salina estéril.

2. Calentar en baño de agua a 85 °C durante 10 minutos con objeto de eliminar las formas vegetativas.

3. A partir del matraz, preparar dos diluciones decimales usando los tubos con solución salina estéril y homogeneizar.

4. Inocular con pipeta estéril I mL de cada una de las diluciones a las cajas Petri previamente marcadas.

5. Agregar a las cajas en condiciones asépticas el agar fundido y a una temperatura de 45 °C.

6. Homogeneizar y dejar solidificar.

7. Colocar en forma invertida una caja de cada dilución en la jarra de anaerobiosis, abrir el sobre generador de hidrógeno y dióxido de carbono, colocarlo en el interior de la jarra y agregarle el agua de acuerdo con las instrucciones del fabricante; colocar la tapa con el catalizador, cerrarla perfectamente e incubar a 28 °C durante 24-48 horas (Figura 14.1).

## PIROGALOL ALCALINO

1. Pegar en la tapa de las otras placas, un sobre de papel filtro con unos 2 g de pirogalol alcalino y sellar todo su perímetro con masking tape (Figura 14.2)

2. Incubar las cajas en forma invertida, a 28 °C durante 24-48 horas.

## MEDIO FLUIDO DE TIOGLICOLATO

1. Calentar el medio de cultivo en baño de agua a punto de ebullición durante 10 minutos, o hasta que el indicador se reduzca (pierda color).

2. Dejar enfriar a temperatura ambiente.

3. Con la pipeta Pasteur estéril, tomar una muestra del matraz o de los tubos con las diluciones, introducir la pipeta hasta la zona profunda de los tubos que contienen el medio.

4. Si se usan tubos de 16 x 150 mm, después de inocular, agregar 2 mL de aceite de parafina estéril para formar un sello exactamente en la superficie del medio.

5. Incubar a 28 °C durante 24-48 horas.

**PRUEBA DE PUREZA**

1. Revisar cuidadosamente las cajas Petri y señalar con lápiz graso las colonias aisladas.

2. Preparar extensiones a partir de las colonias seleccionadas y teñir con técnica de Gram.

3. Observar al microscopio con objetivo de inmersión y determinar la pureza de las colonias, considerando puras a las que muestren un sólo tipo de bacteria.

4. Obtener cultivos puros resembrando en tubos conteniendo medio de conservación a partir de cada colonia pura.

5. Incubar los tubos a 37 °C durante 24-48 horas, en condiciones de anaerobiosis, utilizando aceite de parafina estéril.

6. Después del período de incubación conservar los cultivos puros en el refrigerador.

## V. CUESTIONARIO

1. Describir otra técnica útil en el aislamiento de bacterias anaerobias.

2. Basándose en los resultados obtenidos, indicar ¿Cuál de los métodos empleados fue el más eficiente?
3. ¿Cuál fue el objetivo de calentar los tubos que contenían medio fluido de tioglicolato?

4. En cada uno de los métodos empleados, ¿Cuál es el principio que determina la anaerobiosis?

5. Mencionar 5 ejemplos de bacterias anaerobias diferentes a los que se mencionan en la práctica.

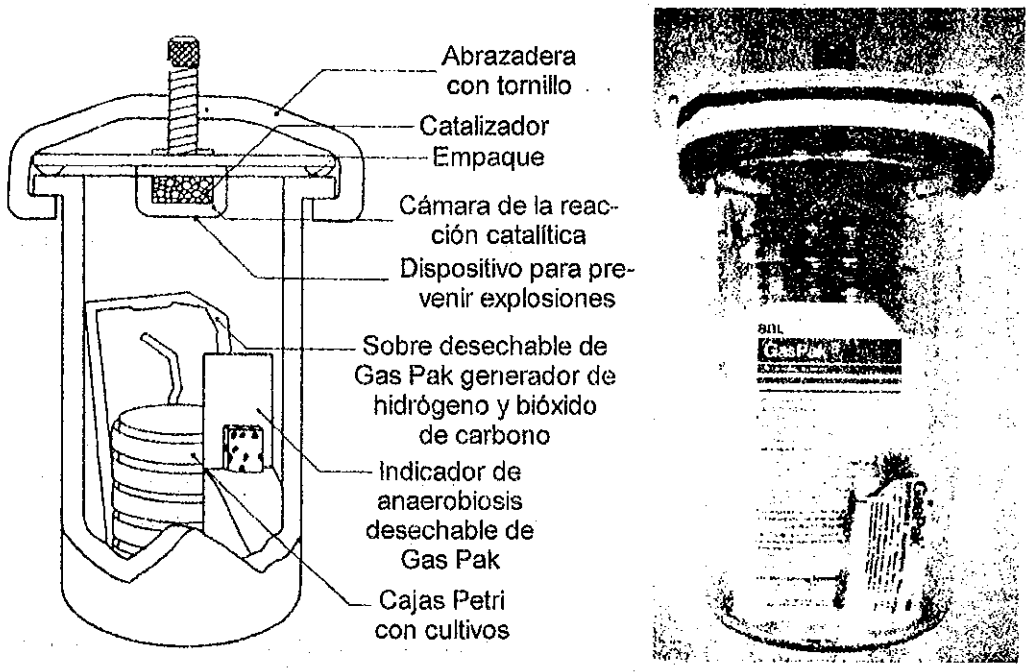



**Figura 14.1 Cultivo de bacterias anaerobias a) Diagrama esquemático y b) Fotografía del sistema GasPak**

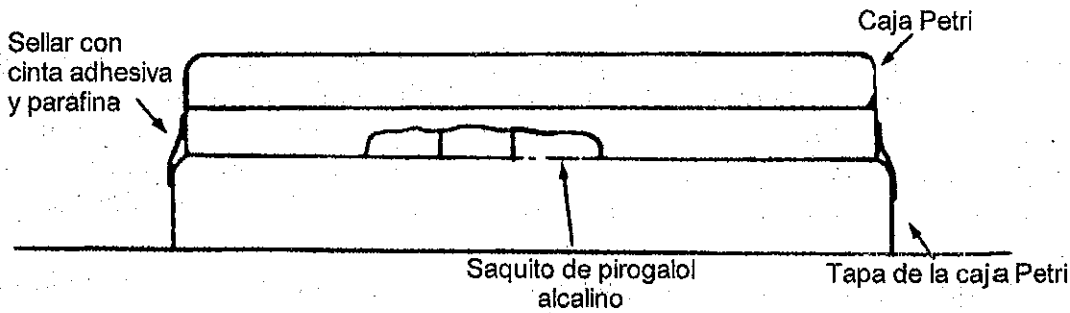



**Figura 14.2 Condiciones de anaerobiosis con el uso de pirogalol alcalino**

# PRÁCTICA Núm. 15

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MOHOS DEL AIRE

## I. OBJETIVO

Aislar mohos del aire y conocer sus características morfológicas y estructurales para lograr su identificación.

## II. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los hongos viven libres en el suelo o en el agua y obtienen su energía por respiración o fermentación de materiales orgánicos solubles presentes en estos ambientes.

El aire no es un medio en el que pueden desarrollarse los microorganismos pero es el portador de aerosoles biológicos como polvo, gotitas de agua y otros, que pueden estar cargados de los diversos grupos de microorganismos.

De las capas de aire se han encontrado esporas de hongos que proceden principalmente del suelo, de la vegetación y del mar. Algunos de los géneros más comúnmente aislados del aire son *Penicillium, Aspergillus, Rhizopus, Mucor* y *Cladosporium,* entre otros.

Todos los hongos se reproducen por esporulación. Cuando la espora se encuentra en un medio nutritivo adecuado, se hincha y germina emitiendo uno o más tubos germinativos que se alargan distalmente hasta constituir filamentos delgados y largos que se denominan "hifas", las cuales pueden ramificarse después.

En algunas especies se forman septos a lo largo de la hifa, quedando entonces dividida en pequeños compartimentos como una caña de bambú llamándose entonces **hifa septada**, otras veces no hay septación y el protoplasma fluye continuamente a lo largo de la hifa, describiéndose entonces como **hifa no septada** o **cenocítica.** En la mayoría de los hongos las hifas son septadas.

A medida que las hifas se siguen dividiendo se forma un crecimiento algodonoso o filamentoso de hifas entrelazadas llamado **micelio.**

El conjunto de micelio se conoce como **talo**. En algunas formas superiores las hifas se unen formando cuerpos fructíferos grandes y de estructura compleja como es el caso de las setas.

La parte del micelio que penetra en el substrato y absorbe substancias nutritivas se llama **micelio vegetativo**, la parte que se proyecta sobre la superficie del substrato origina el **micelio aéreo**, que a su vez da origen a esporas asexuales tales como **conidias** en *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* y **esporangiosporas** en *Rhizopus* y *Mucor,* entre otras, cuya misión es la de dispersar el hongo a nuevos hábitats.

Algunos hongos también producen esporas sexuales formadas como resultado de la reproducción sexual. Las que están encerradas en una especie de saco (Asca) se llaman **ascosporas** y las que se forman en el extremo de una hifa o basidio se denominan **basidiosporas.**

Las propiedades de las esporas sexuales son un criterio importante en la clasificación e identificación de los hongos (Tabla 15.1).

Aunque los hongos constituyen un grupo grande y diverso, prácticamente hay tres grupos importantes: Los mohos, las levaduras y las setas.

Los mohos son hongos filamentosos que están ampliamente distribuidos en la naturaleza y son habituales en pan viejo, queso o frutas. Presentan una gran variedad de formas y tamaños. Cada filamento crece fundamentalmente en el ápice, por extensión de la célula terminal (Figura 15.1).

Las levaduras son hongos unicelulares y la mayoría son *Ascomycetes.* Normalmente tienen forma oval o cilíndrica y su principal forma de reproducción es la gemación, se desarrollan bien en hábitats con abundante azúcar tales como frutas, flores, e incluso la corteza de los árboles.

Las levaduras tienen gran importancia biotecnológica en la industria cervecera y de la panificación y en la producción de proteína de origen unicelular (biomasa).
El principal agente de la fermentación alcohólica es *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 15.2).

Las setas son hongos filamentosos pertenecientes a los *Basidiomycetes* que forman cuerpos fructíferos denominados "setas" y que producen basidiosporas como esporas sexuales (Figura 15.3)

Una actividad ecológica muy importante de los *Basidiomycetes*, es la descomposición de la madera, papel, ropa y otros derivados de productos naturales. Estos *Basidiomycetes*, por tanto, son capaces de producir celulasas con actividades degradantes de lignina que utilizarán como fuente de carbono y energía.

Debido a que muchas setas como *Pleurotus ostreatus,* son comestibles, su producción en gran escala es una actividad económicamente importante, aunque las hay también venenosas como *Amanita virosa* y *Amanita phalloides* (Figura 15.4).

Cada hongo tiene ciertas características macro (morfología colonial, pigmentación) y microscópicas (tipos de hifas, de conidias, etc.), que permiten clasificarlo.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Caja de Petri conteniendo medio de agar de Sabouraud dextrosa (SDA)
- Asa bacteriológica
- 2 Cajas Petri, conteniendo cada una un portaobjetos, un cubreobjetos y un trozo de papel filtro, estériles
- Caja de Petri conteniendo medio de SDA en capa muy delgada
- Bisturí
- Pinzas de disección
- Agua destilada estéril
- Lacto-fenol-azul de algodón
- Esmalte de uñas
- Masking tape
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio

## IV. TÉCNICAS

### A. AISLAMIENTO DE HONGOS DEL AIRE

1. Tomar una placa de medio de SDA.

2. Abrir la placa y exponerla al aire en cualquier sitio por espacio de media hora y colocar de nuevo la tapa en su sitio.

3. Incubar por 48-72 horas o más a temperatura ambiente.

4. Observar la presencia de colonias filamentosas de diversos tipos y colores (Figura 15.5).

5. Describir las observaciones hechas.

6. Anotar las características de las colonias seleccionadas para hacer los microcultivos, ya que esta información es un criterio importante para la identificación del moho.

## B. OBSERVACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS DE LOS HONGOS

Si bien la estructura microscópica es decisiva para la clasificación, para el micólogo experimentado las características visibles son muy importantes debido a que, a simple vista, el aspecto de las colonias es a veces tan característico que le permite identificar enseguida el tipo de hongo.

Sin embargo, es indispensable para la clasificación final determinar las peculiaridades del hongo al nivel microscópico que presentan estos microorganismos.

Generalmente por medio de una aguja de disección o un asa bacteriológica con un pequeño ganchito en la punta es posible desprender pequeñas porciones de la colonia para su estudio microscópico.

Sin embargo, quizá el mejor método para el estudio microscópico es el **microcultivo** (Figura 15.6) que permite observar cuidadosamente y a intervalos las estructuras microscópicas intactas, mientras que en la técnica de desprender una porción del cultivo se altera muy seriamente la arquitectura microscópica tanto que a veces es imposible reconocer el hongo.

### OBSERVACIÓN DIRECTA

1. De las colonias de hongos aislados, tomar nota de sus características:

   Forma, aspecto del micelio (algodonoso, aterciopelado u otro), pigmentación, elevación, consistencia, etc.

2. Seleccionar una de las colonias aisladas y con el asa bacteriológica con un pequeño ganchito en la punta, desprender una pequeña porción.

3. Extender el material obtenido en una gota de agua puesta sobre un portaobjetos y colocar con cuidado un cubreobjetos sobre éste.

4. Examinar al microscopio con objetivo seco débil buscando estructuras representativas.

5. Dibujar las observaciones hechas.

6. Cambiar al objetivo seco fuerte para observar mejor las estructuras seleccionadas, procurando que éstas presenten la arquitectura completa del hongo para facilitar su identificación.

7. Dibujar las observaciones hechas:

***Seco débil*** ***Seco fuerte***

**MICROCULTIVO**

1. Tomar una caja de Petri que contenga dentro un círculo de papel filtro del diámetro de la caja, un portaobjetos y un cubreobjetos estériles.

2. Con el asa estéril y en ángulo recto, cortar en cuadritos de aproximadamente 3 a 5 mm por lado el medio de SDA en capa delgada contenido en una caja de Petri, tomar un cuadrito y colocarlo en condiciones asépticas en el centro del portaobjetos, levantando la tapa de la caja sólo lo suficiente.

3. En condiciones asépticas, tomar una pequeña porción del cultivo por estudiar con el asa bacteriológica en ángulo recto y depositarla cuidadosamente sobre el cuadrito de agar en el portaobjetos dentro de la caja de Petri.

4. Levantando con la mano izquierda la tapa de la caja de Petri y con unas pinzas ligeramente flameadas en la mano derecha, tomar el cubreobjetos y colocarlo

sobre el cuadrito de agar inoculado, procurando que quede bien centrado y aprisionándolo ligeramente para que se adhiera.

5. Con un gotero que contenga agua estéril depositar las gotas necesarias sobre el papel filtro hasta lograr que éste se humedezca completamente.

6. Cerrar la caja y sellarla con un poco de masking tape.

7. Incubar a temperatura ambiente durante 48 a 72 horas.

8. Observar el cultivo a simple vista y no hacer ninguna observación microscópica hasta que haya desarrollo visible fuera del cuadrito del agar. Tener mucho cuidado, para evitar destruir la estructura del hongo.

9. Cuando esto suceda, abrir la caja, sacar la preparación, secarla con gasa por debajo del portaobjetos si está húmedo, y observarlo al microscopio con objetivo seco débil y el condensador muy bajo para reducir la cantidad de luz.

10. Cambiar al objetivo seco fuerte para distinguir mejor la estructura del hongo.

11. Dibujar lo observado:

***Seco débil*** ***Seco fuerte***

12. Comparar la estructura observada con las mostradas en dibujos y láminas (Figura 15.7).

13. Si se desea hacer una preparación permanente, hacer fluir cuidadosamente entre porta y cubreobjetos un poco de lacto-fenol-azul de algodón o lacto-fenol-fucsina ácida, hasta que se haya llenado todo el cubreobjetos.

14. Flamear ligeramente inclinando la preparación para eliminar las burbujas de aire atrapadas.

15. Dejar enfriar la preparación y sellarla dando pinceladas de esmalte de uñas alrededor del cubreobjetos.

## V. CUESTIONARIO

1. Dibujar las estructuras de 5 hongos de diferente género.

2. Describir otra técnica de aislamiento de hongos.

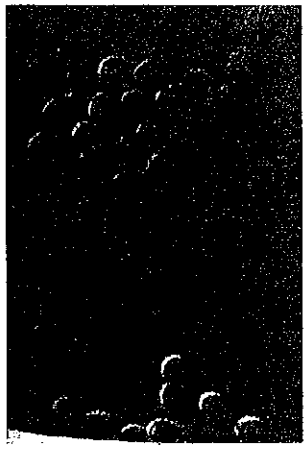
3. Consultar en qué consiste el medio de Micosel y cuál es su utilidad.

4. Consultar la técnica para la obtención de una colonia gigante de hongo.

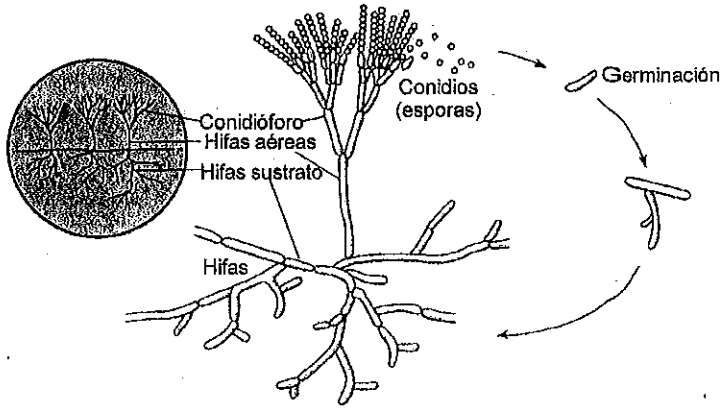
5. Mencionar la importancia de los hongos en microbiología ambiental.

**Tabla 15.1 Clasificación y propiedades más importantes de los hongos.**

| Grupo | Nombre Común | Hifas | Géneros Típicos | Tipos de Esporas Sexuales | Hábitats | Tipo de Enfermedad |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ascomycetes* | Hongos de saco | Septadas | *Neurospora, Saccharomyces, Morchella* | Ascosporas | Suelo, material vegetal en descomposición | Tizón del castaño, ergot, podredumbres |
| *Basidiomycetes* | Setas | Septadas | *Amanita* (venenosa) *Agaricus* (comestible) | Basidiosporas | Suelo, material vegetal en descomposición | Tallo negro, trigo, maíz, etc. |
| Zygomycetes | Hongos del pan | Cenocíticas | *Mucor, Rhizopus* (deterioro de alimentos) | Zigosporas | Suelo, material vegetal en descomposición | Deterioro de alimentos. Raramente implicados en enfermedades parasitarias |
| Oomycetes | Hongos del agua | Cenocíticas | Allomycetes | Oosporas | Acuáticos | Ciertas enfermedades de los peces |
| *Deuteromycetes* | Hongos imperfectos | Septadas | *Penicillium, Aspergillus, Candida* | Ninguna | Suelo, material vegetal en descomposición, piel de animales | Incluyen parásitos de plantas y animales: (pie de atleta, dermatomicosis, infecciones sistemáticas) *(Candida)* |



a)




b)

**Figura 15.1 Estructura de un hongo filamentoso (moho) y crecimiento. a) microfotografía de un moho típico. Los conidios se ven como estructuras esféricas en el extremo de las hifas aéreas. b) Diagrama de un ciclo celular de un moho**

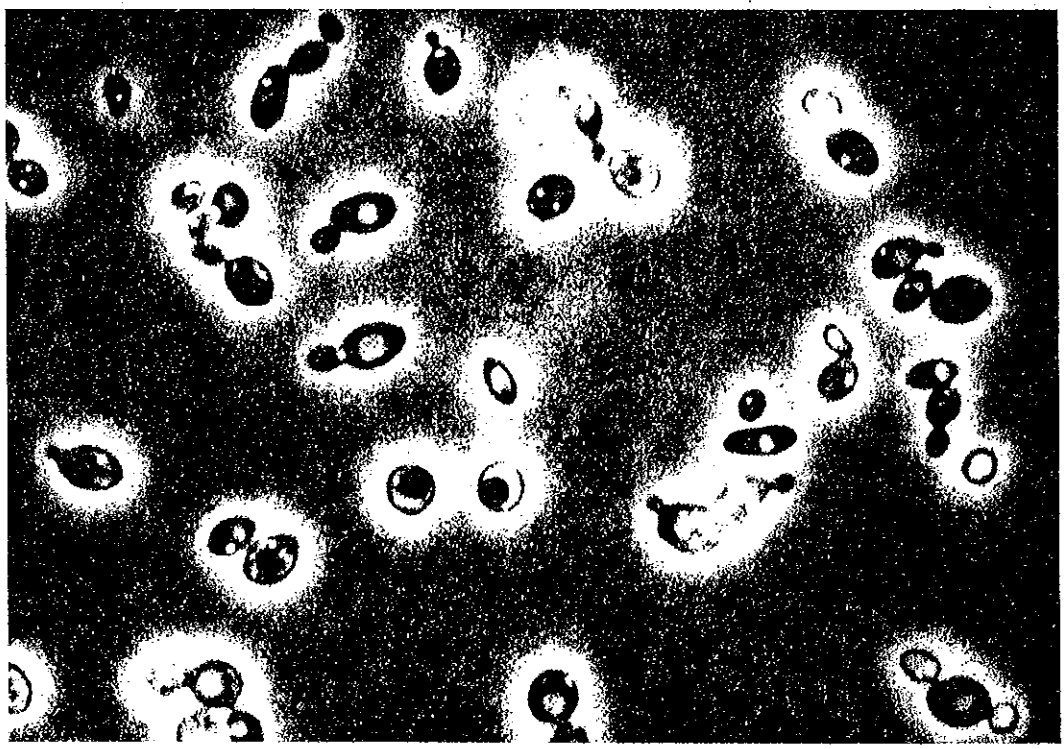


**Figura 15.2 Levadura de importancia comercial: *Saccharomyces cerevisiae***

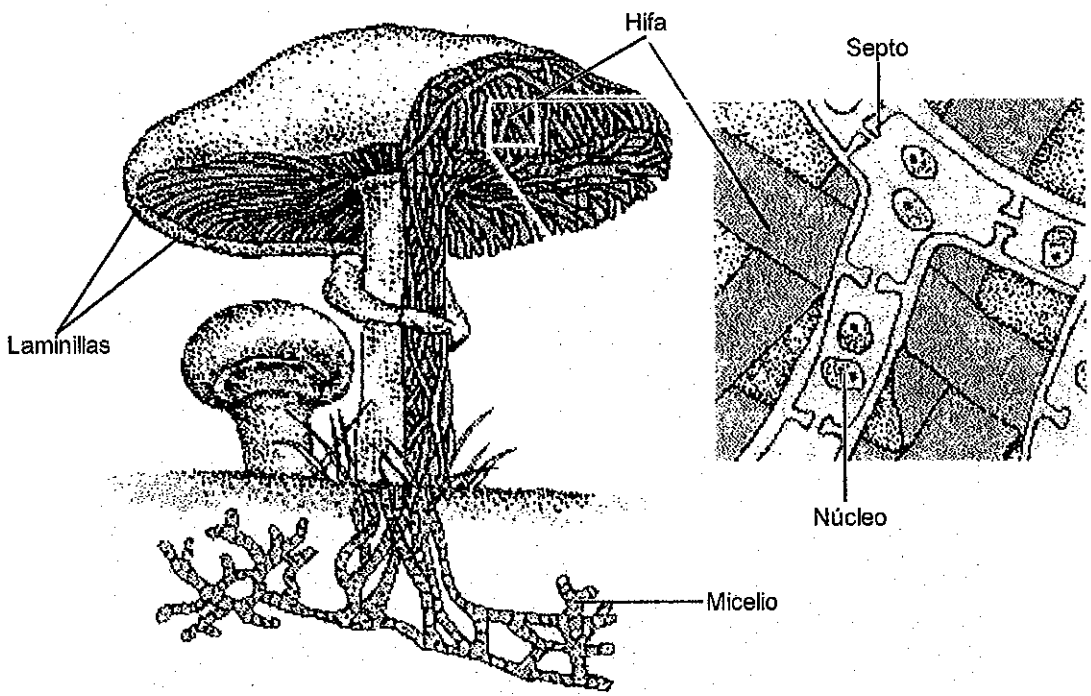


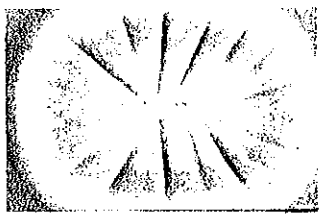

**Figura 15.3 Estructura de una seta. Las laminillas contienen los basidios con las esporas**

**Figura 15.4 El hongo comestible de buen sabor *Pleurotus ostreatus* (superior) y el hongo con veneno mortal *Amanita virosa* (inferior)**

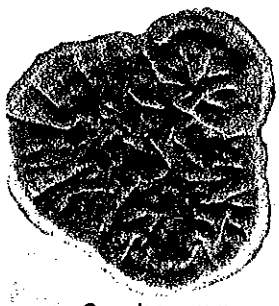
**Crecimiento difuso, velloso**
***(Zygomyces, oscura, reverso nunca negro)***

**Efecto denso de sal y pimienta**
***(Aspergillus niger, reverso nunca negro)***

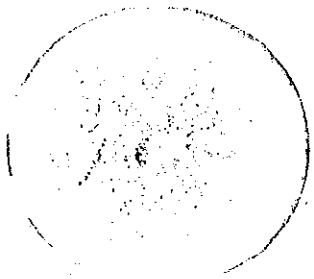
**Granular**
***(Paecilomyces, verde)***



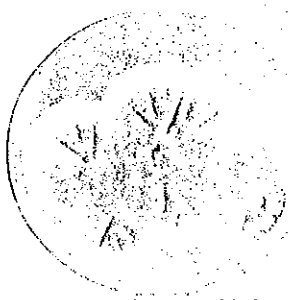
***Bastante granular, rugosidades radiales***
***(Penicillium, dif. gamas de verde)***



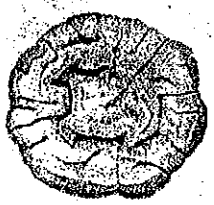
**Granular, rugosa**
***(Cladosporium, verde oliva)***



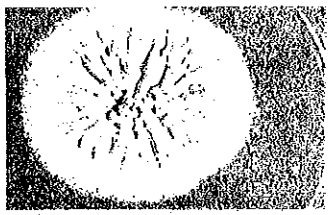
**Extremadamente granular, pliegues rugosos irregulares**
***(Scopulariopsis, ante ó marrón)***



***Bastante granular, rugosidades radiales***
***(Penicillium, dif. gamas de verde)***

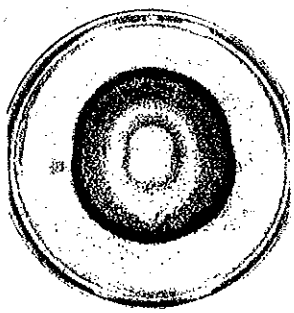


**Granular-rugosa**
***(Heterosporium, gris)***



**Extremadamente granular, pliegues rugosos irregulares**
***(Scopulariopsis, ante ó marrón)***

**Jaspeado**
***(Epicoccum, jaspeado en amarillo, naranja y negro)***



**Levaduriforme, plana**
***(Aureobasidium pullulans, negra)***

**Micelio velloso**
***(Fusarium, de rosa a púrpura intenso)***

**Figura 15.5 Colonias de hongos filamentosos**

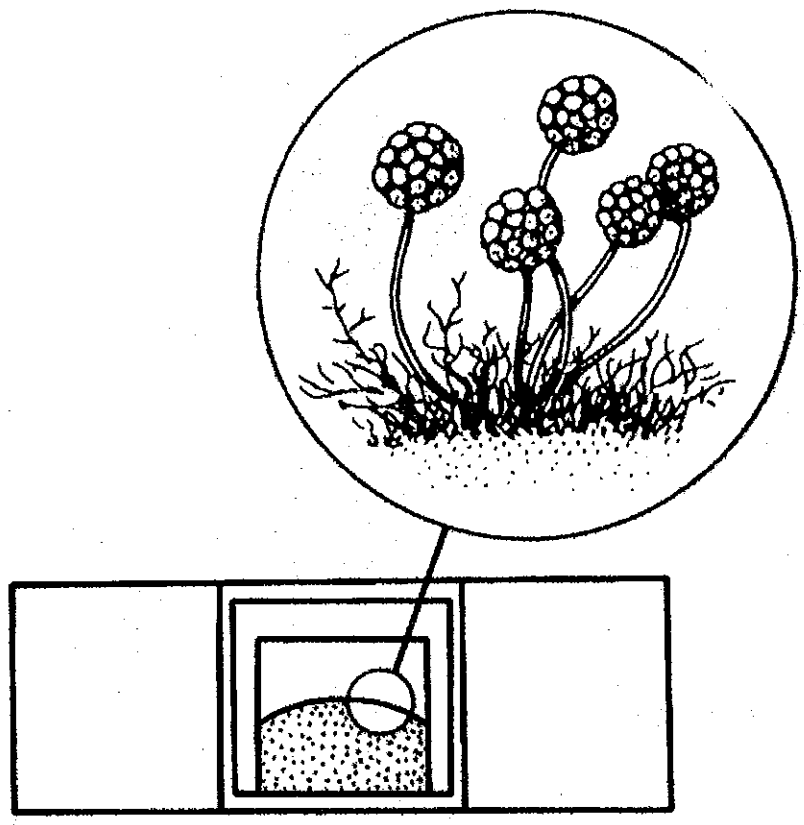



**Figura 15.6 Microcultivo**

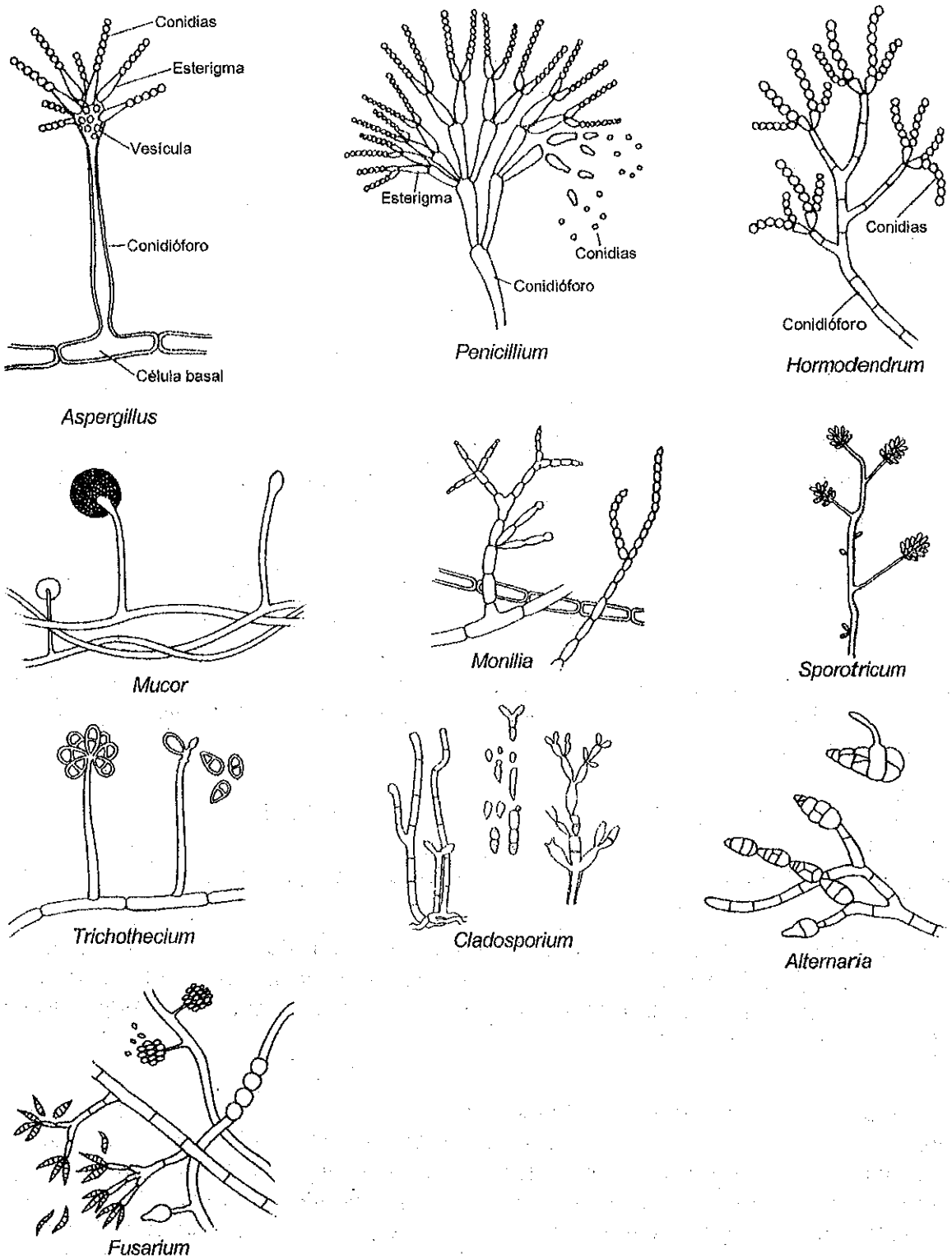



**Figura 15.7 Estructuras de algunos hongos filamentosos**

# PRÁCTICA Núm. 16

# RECUENTO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS EN AGUA PARA CONSUMO HUMANO

## I. OBJETIVO

Determinar la presencia de bacterias mesófilas aerobias en una muestra de agua potable por la técnica de placa vertida.

## II. INTRODUCCIÓN

Muchas veces el agua puede ser completamente transparente, incolora e inodora, pero estar aún contaminada, por lo que, es importante determinar su calidad sanitaria.

La potabilidad del agua sólo se puede determinar mediante análisis químicos y bacteriológicos.

Los procedimientos bacteriológicos de rutina son: recuento de bacterias mesófilas aerobias, coliformes totales, coliformes fecales, estreptococos fecales y clostridios sulfito reductores.

Los recuentos de mesófilos aerobios en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua, así como también la eficiencia de las operaciones para eliminar microorganismos, como la sedimentación, filtración y cloración.

Las cuentas se deben hacer antes y después del tratamiento específico. Los resultados indicarán la medida en que ha sido reducida la población microbiana. Lo usual es que el agua de buena calidad, para consumo humano, tenga cuentas bajas: < 100 UFC por mililitro.

La determinación del conteo de bacterias mesófilas aerobias en una muestra de agua se realiza, normalmente, por siembra en una placa, de un volumen determinado de agua, por incubación a una temperatura concreta y en un tiempo determinado, y por recuento posterior de las colonias desarrolladas y con la aceptación implícita de que cada colonia es originada por una bacteria de la muestra inicial, por lo tanto, el número de colonias equivaldrá al número de bacterias en el volumen sembrado.

## III. MATERIALES Y SUBSTANCIAS

–Muestras de agua potable de diferente origen (grifo, purificada y embotellada u otro), de un volumen mínimo de 100 mL obtenida en recipiente estéril y con 0.1 mL de tiosulfato de sodio al 10%
–3 tubos de ensayo conteniendo cada uno 9 mL exactos de agua de dilución estéril (Apéndice C)
–9 tubos de 20 x 160 mm, con tapón de rosca conteniendo cada uno de 15-20 mL de agar cuenta estándar estéril, manteniéndolo a 45-47 °C en baño de temperatura constante
– Gradilla
– Pipetas estériles de 1 mL graduadas en décimas
– 9 cajas de Petri estériles
– Mechero Bunsen
– Cerillos o encendedor
– Incubadora
– Contador de colonias tipo Quebec

## IV. TÉCNICAS

**En condiciones asépticas:**

1. Agitar vigorosamente la muestra de agua, para homogeneizar.

2. Pipetear 1 mL de muestra y verterlo en el primer tubo que contiene 9 mL de agua de dilución estéril, quedando una dilución de $10^{-1}$ (Figura 16.1).

3. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución ($10^{-1}$) y verterlo en el segundo tubo que contiene 9 mL de agua de dilución estéril, quedando una dilución de $10^{-2}$.

4. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución ($10^{-2}$) y verterlo en el tercer tubo que contiene 9 mL de agua de dilución estéril, quedando una dilución de $10^{-3}$.

5. Utilizando pipeta estéril, tomar 1 mL de la dilución $10^{-1}$ y verterlo en la caja de Petri estéril marcada previamente con $10^{-1}$, distribuyéndolo bien en el fondo de la caja de Petri vacía (Figura 16.1). Efectuar esta misma operación por triplicado.

6. De la misma manera, tomar 1 mL de la dilución $10^{-2}$ y verterlo en la caja de Petri marcada con $10^{-2}$. Efectuar esta misma operación por triplicado.

7. Hacer lo mismo con el tubo de la dilución $10^{-3}$ y la caja marcada con $10^{-3}$. Efectuar esta misma operación por triplicado.

**Es recomendable usar una pipeta estéril para cada dilución**

8. Antes de que pasen 10 minutos, agregar a cada caja de Petri el medio de cultivo contenido en un tubo, a una temperatura máxima de 47 °C (todavía líquido).

**NOTA:**

Si la temperatura del agar es superior a 47°C al vaciarlo a las cajas, puede producirse la destrucción total o parcial de las bacterias sembradas.

9. Antes de que el medio de cultivo solidifique homogeneizar cada caja mediante movimientos de translación y rotación en una superficie plana aproximadamente durante 1 minuto evitando que se mojen la tapa y los costados de la caja, de esta manera el agua y el agar son mezclados uniformemente.

10. Dejar reposar las cajas el tiempo necesario para que solidifique el agar.

11. Una vez solidificado el agar en las cajas, incubar en posición invertida con objeto de que el agua de condensación del agar no caiga sobre la superficie del cultivo. Las condiciones de incubación son: 37 °C (± 1 °C) durante 24 horas (± 3 h). Ahora bien, si se desea conocer la flora bacteriana total de la muestra las condiciones serán: 22 °C (± 2 °C), durante 72 horas (± 4 h).

12. Transcurrido el tiempo de incubación contar las colonias que se han desarrollado en cada una de las placas, usando un cuentacolonias para efecto de facilitar la lectura.

**NOTA:**

Si la investigación de mesófilos se practica a otro tipo de muestra de agua que no sea potable, se procede a preparar las diluciones necesarias, dependiendo del origen de la misma, pero solo se trabajará con las últimas tres diluciones, procediendo de la misma forma descrita anteriormente pero incubando durante 48 horas a 37 °C (±1 °C).

**Al hacer el recuento, tener en cuenta las siguientes consideraciones:**

- Seleccionar sólo las cajas que contengan entre 25 y 250 colonias y descartar las otras.

- Si son varias las que entran en este intervalo, contar todas y seleccionar las del grado de dilución por triplicado que represente menor margen de error en el recuento y como resultado, tomar el promedio de las tres cajas y referirlo al volumen real de muestra sembrado para efectos del cálculo correspondiente.

- Si no hay ninguna caja con un recuento dentro del intervalo mencionado, se hará de aquella que tenga el valor más próximo a cualquiera de los dos extremos. En estos casos los resultados se tomarán como aproximados, excepto en los casos de siembra de muestra directa donde se efectuará, también el recuento en cajas con menos de 25 colonias.

- Si el recuento no se hace en el mismo momento de sacarlas de la incubadora, se pueden conservar las cajas dentro del refrigerador entre 5 y 10 °C, durante un período máximo de 24 horas.

## CÁLCULO Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Una vez efectuado el recuento de las cajas correspondientes, los resultados obtenidos se elaboran de la siguiente manera:

- Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 1 mL la expresión del resultado es directa.

- Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 0.1 mL, el número de colonias contadas habrá de dividirse entre el volumen de muestra sembrada, es decir, entre 0.1, para obtener el número de colonias por mililitro.

**En general se tiene:**

Bacterias mesófilas aerobias/mL = Número de colonias en volumen real de muestra sembrada, en mL.

**Los resultados se expresarán así:**

NÚMERO DE BACTERIAS MESÓFILAS AEROBIAS: ____ UFC/mL.

**NOTA:**

Si no se observan colonias en ninguna de las cajas sembradas, el resultado no será de 0 (cero) UFC/mL, sino que será referido al menor grado de dilución sembrado. En el presente experimento éste es de $10^{-1}$, por lo tanto el resultado sería: <10 UFC/mL

## V. CUESTIONARIO

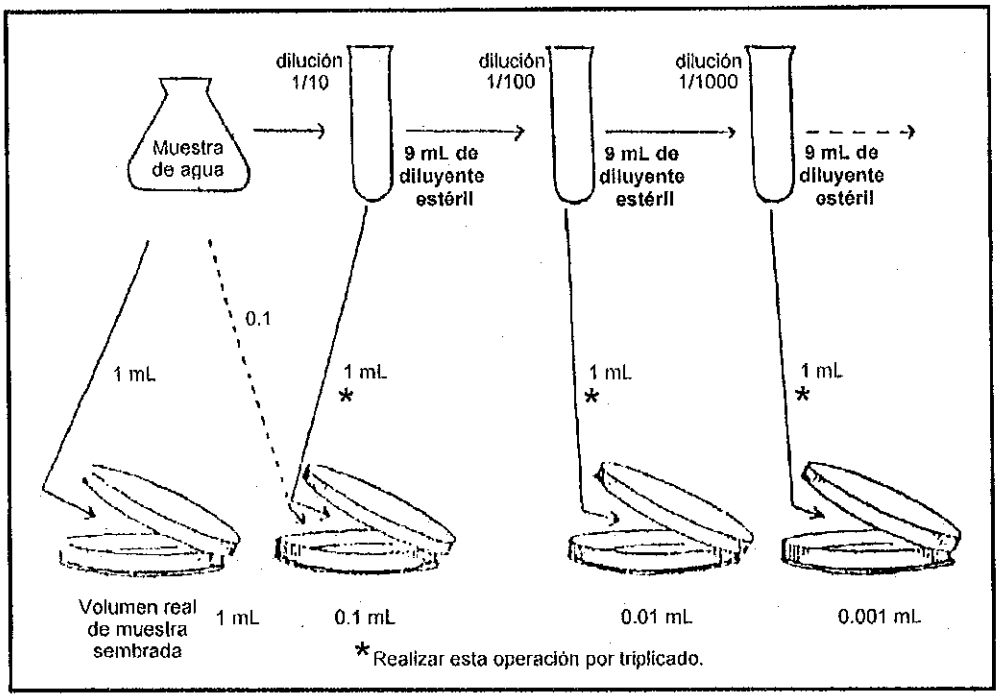
1. Consultar el significado de cuenta viable.

2. ¿Cuáles son las bacterias mesófilas aerobias?

3. ¿En qué otro tipo de muestras, además de agua, se puede investigar la presencia de mesófilas aerobias? Dar ejemplos.

4. De acuerdo a la normatividad mexicana vigente, ¿Cuál es el límite máximo permisible para bacterias mesófilas aerobias en agua purificada y embotellada? Dar el número de norma.

5. Explicar con un ejemplo la investigación de otro tipo de microorganismos utilizando esta misma técnica.



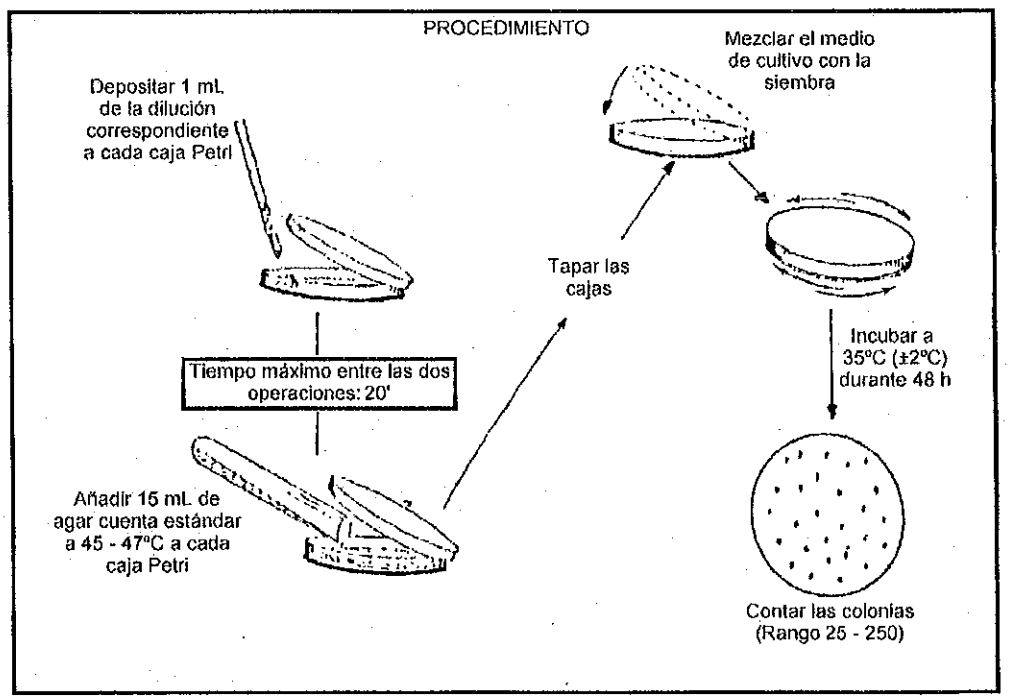




**Figura 16.1 Preparación de diluciones decimales y procedimiento para el recuento de bacterias mesófilas aerobias**

# PRÁCTICA Núm. 17

# COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN AGUA DE CONSUMO HUMANO

## I. OBJETIVO

Investigar la presencia de bacterias del grupo coliforme en agua de consumo humano mediante la técnica del número más probable (NMP), usando tubos de fermentación múltiple.

## II. INTRODUCCIÓN

La potabilidad del agua es de gran importancia en cuanto a salud pública, ya que ésta puede servir como vehículo de microorganismos patógenos, es decir, productores de enfermedades llamadas comúnmente "de origen hídrico" tales como salmonelosis (tifoidea y paratifoidea), shigelosis, cólera, hepatitis, etc. Estos microorganismos son todos de origen entérico.

Se sabe que los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua, proceden de las descargas intestinales de hombres y animales.

Además, ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli* y varios microorganismos similares, denominados coliformes, estreptococos fecales (como *Streptococcus faecalis)* y *Clostridium perfringens*, son habitantes normales del intestino grueso de hombres y animales y en consecuencia siempre están en las materias fecales.

Así pues, la presencia de cualquiera de estas especies en el agua es evidencia de contaminación fecal.

La evaluación rutinaria del agua en busca de microorganismos patógenos, como *Salmonella spp.* y *Shigella spp.* puede ser difícil de realizar ya que el número de estas bacterias es relativamente escaso, por lo que se tiene que recurrir a pruebas bacteriológicas del agua potable que demuestren la presencia de microorganismos indicadores que siempre están presentes en materia fecal, fácil de demostrar y que sirva de guía para conocer el grado de contaminación fecal.

Surge así el concepto de "**indicador de contaminación fecal**", el cual será utilizado para la valoración de la potabilidad bacteriológica de las aguas.

De acuerdo con lo anterior, se ha adoptado con carácter general, el "**grupo coliforme**" como indicador más digno de confianza.

La organización mundial de la salud (OMS) incluye dentro del grupo coliforme todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos, Gram negativos, no esporulados, que producen ácido y gas al fermentar la lactosa, a 35 – 37 °C.

Las especies clásicas de este grupo son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes.*

El microorganismo indicador más comúnmente utilizado es *Escherichia coli*, considerando la OMS preferible emplear la expresión "**coliforme fecal**" que comprende un número ligeramente mayor de variedades, todas ellas de claro origen fecal e indicadores de contaminación fecal reciente.

Para los efectos del análisis sanitario del agua, se define el coliforme fecal como un bacilo aerobio o anaerobio facultativo, Gram negativo, no esporulado, que fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a 44 °C (± 0.5 °C) en menos de 24 horas.

El método se basa en la inoculación de alícuotas de la muestra sin diluir que pueden ser volúmenes de 50, 10 y 1 mL, ó de 10, 1 y 0.1 mL, o diluida en caso necesario, en una serie de tubos por triplicado o quintuplicado con un medio que contiene lactosa (caldo lactosado o caldo lauril triptosa).

La valoración del contenido microbiano de una muestra de agua por el método del NMP requiere la utilización de Tablas numéricas que tienen en cuenta los volúmenes de agua y las cantidades de tubos sembrados en una o más series. Realmente consiste en tratar estadísticamente el número de tubos de cada serie sembrada que resulten positivos después de su incubación.

En cuanto a la investigación de patógenos en agua, no existe un método único que permita aislar e identificar todos estos microorganismos. En general, los métodos con los que se obtienen mejores resultados comprenden una fase de concentración, seguida de técnicas de enriquecimiento y aislamiento específicas para cada microorganismo.

El procedimiento para la recolección de las muestras de agua para el análisis bacteriológico, depende del tipo de agua que se desee muestrear. Este se hará de acuerdo a la normatividad mexicana vigente.

Las muestras para el análisis bacteriológico, se deben tomar en frascos muestreadores lavados con extremo cuidado y esterilizados. En su interior se debe añadir, previo a la esterilización, 0.1 mL de solución de $Na_2S_2O_3$ (tiosulfato de sodio) al 10%, por cada 120 mL de muestra con el propósito de neutralizar la acción del cloro que pudiera contener la muestra, y cubrir con papel aluminio el tapón del frasco hasta el cuello.

El análisis bacteriológico de la muestra debe practicarse inmediatamente después de su recolección. Es por ello que se recomienda que de no efectuarse así el análisis, se inicie dentro de las dos horas próximas a la recolección de la muestra y en ningún caso, este lapso debe de exceder de 24 horas para agua potable y de 6 horas para otros tipos de agua para que sea válido el resultado del análisis.

Se debe conservar la muestra a 4 °C durante el período que transcurre entre el muestreo y el análisis, con objeto de inhibir la actividad bacteriana, para no obtener resultados falsos o dudosos.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestras de agua potable de diferente origen (grifo, purificada y embotellada, tinaco, cisterna u otro), de un volumen mínimo de 100 mL
- 5 Tubos de 20 x 180 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 20 mL de caldo lactosado o lauril triptosa estéril de doble concentración
- 10 Tubos de 18 x 150 mm, con campana Durham en su interior, conteniendo 10 mL de caldo lactosado estéril de simple concentración
- 1 Pipeta de 10 mL graduada en décimas, estéril
- 2 Pipetas de 1 mL graduadas en décimas, estériles
- 10 Tubos de 18 x 150 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 10 mL de caldo lactosa bills verde brillante (LBVB) estéril de concentración sencilla
- 10 Tubos de 18 x 150 mm con campana Durham en su interior, conteniendo 10 mL de caldo E.C. *(Escherichia coli)* estéril de concentración sencilla
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Asa bacteriológica
- Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 20 x 200
- Agitador de tubos Vortex
- Incubadora a 35 °C
- Baño incubador para coliformes fecales a temperatura constante de 44 ± 0.5°C

## IV. TÉCNICAS

### Descripción de la metodología de análisis:

La técnica del NMP comprende siempre una prueba presuntiva y otra confirmativa. Esto es así porque un tubo positivo durante la prueba presuntiva no indica necesariamente la presencia del grupo bacteriano a determinar (coliformes totales, coliformes fecales o estreptococos fecales), sino tan solo es una presunción, que

habrá de confirmarse posteriormente. Sin embargo, si la prueba presuntiva resulta negativa, ésto permite dictaminar la ausencia de dicho grupo bacteriano en el agua examinada.

La denominada prueba presuntiva consiste en una metodología de tipo general empleada para cualquier grupo de bacterias, mientras que la prueba confirmativa es específica.

## PRUEBA PRESUNTIVA:

**Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.**

1. Preparar tres series sucesivas de 5 tubos con caldo lactosado, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla.

2. Etiquetar las series con 10, 1 y 0.1 mL.

3. Agitar vigorosamente la muestra para homogeneizar por lo menos 20 veces antes de tomar el volumen que se va a inocular.

4. Antes y después de realizar las inoculaciones, flamear la boca del frasco de la muestra con objeto de evitar contaminación.

5. Inocular con una pipeta de 10 mL este volumen de muestra en la serie de tubos con caldo de doble concentración.

6. Con una pipeta de 1 mL inocular este volumen de muestra en la segunda serie de tubos con concentración sencilla (Figura 17.1)

7. Igualmente con otra pipeta de 1 mL inocular la tercera serie de tubos con 0.1 mL de muestra.

   Normalmente, siempre que se sospecha que el agua no contiene elevada carga bacteriana, solo se inoculan estas tres primeras series de tubos.

   En caso contrario, será necesario inocular otras series y por lo tanto, realizar diluciones de la muestra original.

8. Incubar todos los tubos a una temperatura de 35 °C durante 24-48 horas.

9. Después de 24 horas de incubación efectuar una primera lectura para observar si hay tubos positivos, es decir, con producción de ácido, si el medio contiene

un indicador de pH, por ejemplo rojo de fenol el cual vira de rojo a amarillo, turbidez y producción de gas en el interior de la campana Durham, el cual puede observarse desde la formación de una pequeña burbuja hasta el total desplazamiento del medio en el interior de la campana.

Al hacer esta verificación es importante asegurarse que la producción de gas sea resultado de la fermentación de la lactosa en cuyo caso se observará turbidez en el medio de cultivo y no confundir con burbujas de aire.

Para evitar este tipo de confusiones es recomendable revisar las campanas Durham antes de proceder a la inoculación y desechar aquellos que contengan burbujas de aire o de alguna manera eliminar éstas y así poder utilizarlos.

Una forma de lograrlo es inclinando el tubo de fermentación hasta permitir que la campana se invierta un poco para dejar escapar la burbuja de aire, volviendo rápidamente el tubo a su posición normal.

10. De los tubos que en esta primera lectura den positivos, ya se pueden hacer las pruebas confirmatorias para coliformes totales y fecales.

11. En caso de no apreciarse alguno o todos los cambios mencionados en el resto de los tubos, continuarán en incubación 24 horas más.

12. Después de 48 horas (± 2 h) a partir de la inoculación, se hace la lectura final.

13. Si pasadas estas 48 h tampoco se aprecia turbidez ni producción de gas, los tubos se toman como negativos.

**INTERPRETACIÓN:**

- Si el total de tubos son **NEGATIVOS** durante la prueba presuntiva:

  El análisis se da por terminado, reportando la **AUSENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES** en la muestra analizada.

- Si resultan tubos **POSITIVOS** durante la prueba presuntiva:

  Todos aquellos tubos que den positivos se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la **PRUEBA CONFIRMATORIA** para **coliformes totales y fecales.**

## PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES:

1. Por cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas un tubo conteniendo caldo LBVB (Figura 17.2).

2. Incubar durante 48 ± 3 h a 35 ± 0.5 °C.

3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.

### INTERPRETACIÓN:

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

  La prueba se considera **POSITIVA,** debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- **Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **negativos**, estableciéndose el Código 0,0,0 para efecto del cálculo del NMP, en la Tabla 17.1.

## PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES:

1. Por cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos para homogeneizar, inocular con tres asadas un tubo conteniendo caldo E.C. (Figura 17.3) .

2. Incubar durante 24 horas a 44 ± 0.5 °C, observar presencia de turbidez y gas (Figura 17.4) .

### INTERPRETACIÓN:

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

  La prueba se considera **POSITIVA,** debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- **Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **negativos**, estableciéndose el Código 0,0,0 para efecto del cálculo del NMP en la Tabla 17.1.

## CÁLCULOS

De acuerdo a los tubos positivos en las pruebas confirmativas para coliformes totales y fecales:

Establecer los códigos correspondientes para calcular por referencia en la Tabla estadística correspondiente (Tablas 17.1 – 17.4), el NMP de coliformes totales y fecales en 100 mL de agua.

En caso de no encontrar en las Tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/100 mL} = \frac{\text{No. de tubos positivos x 100}}{\sqrt{\text{mL de muestra en tubos negativos} \times \text{mL de muestra en todos los tubos}}}$$

## ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se elaboran de la siguiente manera:

- Si se inocularon tres series de cinco tubos cada una con volúmenes de muestra de 10, 1 y 0.1 mL, respectivamente, la lectura de los resultados permite establecer el código con base a los tubos que resultaron positivos.

- Se tendrán dos códigos de valores: uno para coliformes totales y otro para coliformes fecales, los cuales serán leídos en la Tabla 17.1 para obtener el valor del NMP de bacterias correspondientes en 100 mL de muestra, de manera directa.

- Si se han realizado diluciones, se establece el código de valores correspondiente que podrá ser leído en la Tabla 17.1 el índice del NMP.

- Para efectos de expresar el valor obtenido basándose en 100 mL de muestra habrá de dividirse el resultado de la Tabla 17.1 entre el volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central de cada triplete escogido.

**En general se tiene:**

$$NMP/C = \frac{\text{NMP leído en la tabla}}{\text{Volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central (mL)}}$$

Los resultados obtenidos se expresarán de la siguiente manera:

NMP DE COLIFORMES TOTALES: _____ / 100 mL
NMP DE COLIFORMES FECALES: _____ / 100 mL

**EJEMPLOS:**

1) La lectura de los resultados obtenidos en el análisis del agua de un grifo es la siguiente:

| Volumen de muestra inoculada. (mL) | Denominación de la serie de 5 tubos. | Tubos positivos en la prueba presuntiva para coliformes totales y fecales. | Tubos positivos en la prueba confirmativa para coliformes totales. | Tubos positivos en la prueba confirmativa para coliformes fecales. |
|---|---|---|---|---|
| 10 | 1 – CT.CF | 5 | 4 | 2 |
| 1 | 2 – CT.CF | 3 | 2 | 1 |
| 0.1 | 3 – CT.CF | 2 | 1 | 0 |

Con estos datos, al consultar la Tabla 17.1 del NMP se tiene:

- Para coliformes totales, con los resultados obtenidos finalmente en la prueba confirmativa se establece el triplete (código): 4,2,1 que en la Tabla 17.1 indica un valor de 26 es decir el resultado será:

  **NMP DE COLIFORMES TOTALES: 26/100 mL**

- Para coliformes fecales se establece el código: 2,1,0 y consultando la Tabla 17.1 del NMP se tiene el valor de 7.

  El resultado se expresará:

  **NMP DE COLIFORMES FECALES: 7/100 mL**

2) La lectura de los resultados obtenidos en el análisis de un agua de la que fue necesario hacer diluciones, es la siguiente:

| Dilución | Volumen de muestra inoculada. (mL) | Denominación de la serie de 5 tubos. | Tubos positivos en la prueba presuntiva para coliformes totales y fecales. | Tubos positivos en la prueba confirmativa para coliformes totales. | Tubos positivos en la prueba confirmativa para coliformes fecales. |
|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-1}$ | 0.1 | 1 – CT.CF | 4 | 3 | 2 |
| $10^{-2}$ | 0.01 | 2 – CT.CF | 2 | 1 | 1 |
| $10^{-3}$ | 0.001 | 3 – CT.CF | 1 | 1 | 0 |

- Para coliformes totales se establece el código: 3,1,1 y consultando la Tabla 17.1 del NMP se observa un valor de 14, por lo tanto se tiene:

  14 / 0.01 = 14 x 100 = 1400

  El resultado se expresará:

  **NMP DE COLIFORMES TOTALES: 1400/100 mL**

- Para coliformes fecales con el mismo razonamiento se establece el código: 2,1,0 que en las Tablas del NMP correspondientes se observa un valor de 7, por lo tanto se tiene:

  7 / 0.01 = 7 x 100 = 700

  El resultado se expresará:

  **NMP DE COLIFORMES FECALES: 700/100 mL**

## CONFIABILIDAD

El procedimiento de fermentación en tubos múltiples es el método más usado por su facilidad y economía.

El resultado de esta prueba se expresa por "el número más probable" (NMP), pero debe entenderse que este método no es exacto ya que sólo nos da la probable densidad de bacterias coliformes totales o fecales de una muestra determinada.

La confiabilidad está dada por los niveles superiores o inferiores del límite de confianza al 95% establecidos en las Tablas para cada NMP/100 mL, no obstante, es una indicación importante para evaluar la calidad sanitaria del agua.

## V. CUESTIONARIO

1. Mostrar los cálculos realizados para obtener el NMP de coliformes totales y fecales en el agua analizada.

2. ¿Cuáles son las características que debe reunir un microorganismo indicador?

3. ¿Por qué el número de coliformes totales es siempre mayor que el de coliformes fecales?

4. De acuerdo a la normatividad mexicana vigente ¿Cuáles son los límites permisibles en cuanto a coliformes totales y coliformes fecales en el agua para consumo humano? Dar los números de las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes.

5. ¿Por qué aún cuando los microorganismos patógenos se encuentren en poca concentración en un agua pueden causar enfermedad?

**Tabla 17.1 Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 10 $cm^3$ en cada uno, 5 con porciones de 1 $cm^3$ y 5 con porciones de 0.1 $cm^3$.**

| No. De tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP por 100 $cm^3$. | Límite confiable de 95%. | | No. De tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP por 100 $cm^3$. | Límite confiable de 95%. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 tubos con 10 $cm^3$. | 5 tubos con 1 $cm^3$. | 5 tubos con 0.1 $cm^3$. | | Inferior | Superior | 5 tubos con 10 $cm^3$. | 5 tubos con 1 $cm^3$. | 5 tubos con 0.1 $cm^3$. | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | < 2 | | | | | | | | |
| 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 | | | | | | |
| 1 | 0 | 1 | 4 | < 0.5 | 11 | 5 | 0 | 0 | 23 | 7 | 70 |
| 1 | 1 | 0 | 4 | < 0.5 | 11 | 5 | 0 | 1 | 31 | 11 | 89 |
| 1 | 1 | 1 | 6 | < 0.5 | 15 | 5 | 0 | 2 | 43 | 15 | 110 |
| 1 | 2 | 0 | 6 | < 0.5 | 15 | 5 | 1 | 0 | 33 | 11 | 93 |
| | | | | | | 5 | 1 | 1 | 46 | 16 | 120 |
| 2 | 0 | 0 | 5 | < 0.5 | 13 | 5 | 1 | 2 | 63 | 21 | 150 |
| 2 | 0 | 1 | 7 | 1 | 17 | | | | | | |
| 2 | 1 | 0 | 7 | 1 | 17 | 5 | 2 | 0 | 49 | 17 | 130 |
| 2 | 1 | 1 | 9 | 2 | 21 | 5 | 2 | 1 | 70 | 23 | 170 |
| 2 | 2 | 0 | 9 | 2 | 21 | 5 | 2 | 2 | 94 | 28 | 220 |
| 2 | 3 | 0 | 12 | 3 | 28 | 5 | 3 | 0 | 79 | 25 | 190 |
| | | | | | | 5 | 3 | 1 | 110 | 31 | 250 |
| 3 | 0 | 0 | 8 | 1 | 19 | 5 | 3 | 2 | 140 | 37 | 340 |
| 3 | 0 | 1 | 11 | 2 | 25 | | | | | | |
| 3 | 1 | 0 | 11 | 2 | 25 | 5 | 3 | 3 | 180 | 44 | 500 |
| 3 | 1 | 1 | 14 | 4 | 34 | 5 | 4 | 0 | 130 | 35 | 300 |
| 3 | 2 | 0 | 14 | 4 | 34 | 5 | 4 | 1 | 170 | 43 | 490 |
| 3 | 2 | 1 | 17 | 5 | 46 | 5 | 4 | 2 | 220 | 57 | 700 |
| 3 | 3 | 0 | 17 | 5 | 46 | 5 | 4 | 3 | 280 | 90 | 850 |
| | | | | | | 5 | 4 | 4 | 350 | 120 | 1000 |
| 4 | 0 | 0 | 13 | 3 | 31 | 5 | 5 | 0 | 240 | 68 | 750 |
| 4 | 0 | 1 | 17 | 5 | 46 | 5 | 5 | 1 | 350 | 120 | 1000 |
| 4 | 1 | 0 | 17 | 5 | 46 | 5 | 5 | 2 | 540 | 180 | 1400 |
| 4 | 1 | 1 | 21 | 7 | 63 | 5 | 5 | 3 | 920 | 300 | 3200 |
| 4 | 1 | 2 | 26 | 9 | 78 | 5 | 5 | 4 | 1600 | 640 | 5800 |
| 4 | 2 | 0 | 22 | 7 | 67 | 5 | 5 | 5 | ≥2400 | | |

**Tomado de NOM-AA-42-1987**

**Tabla 17.2 Índice del límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 1 tubo con porciones de 50 cm$^3$, 5 tubos con porciones de 10 cm$^3$ y 5 tubos con porciones de 10 cm$^3$.**

| No. de tubos con reacciones positivas | | | Índice del NMP por 100 cm$^3$ | Límite confiable de 95% | | No. de tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP por 100 cm$^3$ | Límite confiable de 95% | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 tubo con 50 cm$^3$ | 5 tubos con 10 cm$^3$ | 5 tubos con 1 cm$^3$ | | Inferior | Superior | 1 tubo con 50 cm$^3$ | 5 tubos con 10 cm$^3$ | 5 tubos con 1 cm$^3$ | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | < 1 | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 1 | 1 | < 0.5 | 4 | 1 | 2 | 1 | 7 | 1 | 17 |
| 0 | 0 | 2 | 2 | < 0.5 | 6 | 1 | 2 | 2 | 10 | 3 | 23 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | < 0.5 | 4 | 1 | 2 | 3 | 12 | 3 | 28 |
| 0 | 1 | 1 | 2 | < 0.5 | 6 | 1 | 3 | 0 | 8 | 2 | 19 |
| 0 | 1 | 2 | 3 | < 0.5 | 8 | 1 | 3 | 1 | 11 | 3 | 26 |
| 0 | 2 | 0 | 2 | < 0.5 | 6 | 1 | 3 | 2 | 14 | 4 | 34 |
| 0 | 2 | 1 | 3 | < 0.5 | 8 | 1 | 3 | 3 | 18 | 5 | 53 |
| 0 | 2 | 2 | 4 | < 0.5 | 11 | 1 | 3 | 4 | 21 | 6 | 66 |
| 0 | 3 | 0 | 3 | < 0.5 | 8 | 1 | 4 | 0 | 13 | 4 | 31 |
| 0 | 3 | 1 | 5 | < 0.5 | 13 | 1 | 4 | 1 | 17 | 5 | 47 |
| 0 | 4 | 0 | 5 | < 0.5 | 13 | | | | | | |
| | | | | | | 1 | 4 | 2 | 22 | 7 | 69 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | < 0.5 | 4 | 1 | 4 | 3 | 28 | 9 | 85 |
| 1 | 0 | 1 | 3 | < 0.5 | 8 | 1 | 4 | 4 | 35 | 12 | 100 |
| 1 | 0 | 2 | 4 | < 0.5 | 11 | 1 | 4 | 5 | 43 | 15 | 120 |
| 1 | 0 | 3 | 6 | < 0.5 | 15 | 1 | 5 | 0 | 24 | 8 | 75 |
| 1 | 1 | 0 | 3 | < 0.5 | 8 | | | | | | |
| | | | | | | 1 | 5 | 1 | 35 | 12 | 100 |
| 1 | 1 | 1 | 5 | < 0.5 | 13 | 1 | 5 | 2 | 54 | 18 | 140 |
| 1 | 1 | 2 | 7 | 1 | 17 | 1 | 5 | 3 | 92 | 27 | 220 |
| 1 | 1 | 3 | 9 | 2 | 21 | 1 | 5 | 4 | 160 | 39 | 450 |
| 1 | 2 | 0 | 5 | < 0.5 | 13 | 1 | 5 | 5 | ≥ 240 | | |

**Tomado de NOM-AA-42-1987**

**Tabla 17.3 Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 5 tubos con porciones de 50 cm³, 5 con porciones de 10 cm³ y 5 tubos con porciones de 1 cm³.**

| No. De tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP por 100 cm³. | Límite confiable de 95%. | | No. De tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP por 100 cm³. | Límite confiable de 95%. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 5 tubos con 50 cm³. | 5 tubos con 10 cm³. | 5 tubos con 1 cm³. | | Inferior | Superior | 5 tubos con 50 cm³. | 5 tubos con 10 cm³. | 5 tubos con 1 cm³. | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | < 1 | | | | | | | | |
| 0 | 0 | 1 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 1 | 1 | 4 | 1 | 9 |
| 0 | 1 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 1 | 2 | 4 | 1 | 9 |
| 0 | 1 | 1 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 2 | 0 | 4 | 1 | 9 |
| 0 | 2 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 2 | 1 | 4 | 1 | 9 |
| 0 | 3 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 2 | 2 | 5 | 2 | 12 |
| | | | | | | 4 | 3 | 0 | 5 | 2 | 12 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | | | | | | |
| 1 | 0 | 1 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 3 | 1 | 5 | 2 | 12 |
| 1 | 1 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 3 | 2 | 6 | 2 | 14 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 4 | 0 | 6 | 2 | 14 |
| 1 | 2 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 4 | 4 | 1 | 7 | 3 | 17 |
| 1 | 2 | 1 | 2 | < 0.5 | 4 | 4 | 5 | 0 | 7 | 3 | 17 |
| 1 | 3 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | 4 | 5 | 1 | 8 | 3 | 19 |
| 2 | 0 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 5 | 0 | 0 | 4 | 1 | 9 |
| 2 | 0 | 1 | 1 | < 0.5 | 2 | 5 | 0 | 1 | 4 | 1 | 9 |
| 2 | 1 | 0 | 1 | < 0.5 | 2 | 5 | 0 | 2 | 6 | 2 | 14 |
| 2 | 1 | 1 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 1 | 0 | 5 | 2 | 12 |
| 2 | 2 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 1 | 1 | 6 | 2 | 14 |
| 2 | 2 | 1 | 2 | < 0.5 | 4 | | | | | | |
| | | | | | | 5 | 1 | 2 | 7 | 3 | 17 |
| 2 | 3 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 2 | 0 | 6 | 2 | 14 |
| 2 | 3 | 1 | 3 | 1 | 7 | 5 | 2 | 1 | 8 | 3 | 19 |
| 2 | 4 | 0 | 3 | 1 | 7 | 5 | 2 | 2 | 10 | 4 | 23 |
| | | | | | | 5 | 2 | 3 | 12 | 4 | 28 |
| 3 | 0 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | | | | | | |
| 3 | 0 | 1 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 3 | 0 | 9 | 3 | 21 |
| 3 | 1 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 3 | 1 | 11 | 4 | 26 |
| 3 | 1 | 1 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 3 | 2 | 14 | 5 | 34 |
| 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 7 | 5 | 3 | 3 | 18 | 6 | 53 |
| 3 | 2 | 0 | 3 | 1 | 7 | 5 | 4 | 0 | 13 | 6 | 31 |
| 3 | 2 | 1 | 3 | 1 | 7 | 5 | 4 | 1 | 17 | 6 | 47 |
| 3 | 2 | 2 | 4 | 1 | 9 | 5 | 4 | 2 | 22 | 7 | 70 |
| 3 | 3 | 0 | 3 | 1 | 7 | 5 | 4 | 3 | 28 | 9 | 85 |
| 3 | 3 | 1 | 4 | 1 | 9 | 5 | 4 | 4 | 35 | 11 | 100 |
| 3 | 4 | 0 | 4 | 1 | 9 | 5 | 5 | 0 | 24 | 8 | 75 |
| 3 | 4 | 1 | 4 | 1 | 9 | | | | | | |
| | | | | | | 5 | 5 | 1 | 35 | 11 | 100 |
| 4 | 0 | 0 | 2 | < 0.5 | 4 | 5 | 5 | 2 | 54 | 18 | 140 |
| 4 | 0 | 1 | 3 | 1 | 7 | 5 | 5 | 3 | 92 | 27 | 220 |
| 4 | 0 | 2 | 3 | 1 | 7 | 5 | 5 | 4 | 160 | 39 | 420 |
| 4 | 1 | 0 | 3 | 1 | 7 | 5 | 5 | 5 | ≥ 240 | | |

**Tomado de NOM-AA-42-1987**

**Tabla 17.4 Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 $cm^3$, 3 con porciones de 1 $cm^3$ y 3 con porciones de 0.1 $cm^3$.**

| No. de tubos con reacciones positivas. | | | Índice del NMP Por 100 $cm^3$ | Límite confiable de 95% | |
|---|---|---|---|---|---|
| 3 tubos con 10 $cm^3$ | 3 tubos con 1 $cm^3$ | 3 tubos con 0.1 $cm^3$ | | Inferior | Superior |
| 0 | 0 | 0 | < 3 | | |
| 0 | 0 | 1 | 3 | < 0.5 | 9 |
| 0 | 1 | 0 | 3 | < 0.5 | 13 |
| 1 | 0 | 0 | 4 | < 0.5 | 20 |
| 1 | 0 | 1 | 7 | 1 | 21 |
| 1 | 1 | 0 | 7 | 1 | 23 |
| 1 | 1 | 1 | 11 | 3 | 36 |
| 1 | 2 | 0 | 11 | 3 | 36 |
| 2 | 0 | 0 | 9 | 1 | 36 |
| 2 | 0 | 1 | 14 | 3 | 37 |
| 2 | 1 | 0 | 15 | 3 | 44 |
| 2 | 1 | 1 | 20 | 7 | 89 |
| 2 | 2 | 0 | 21 | 4 | 47 |
| 2 | 2 | 1 | 28 | 10 | 150 |
| 3 | 0 | 0 | 23 | 4 | 120 |
| 3 | 0 | 1 | 39 | 7 | 130 |
| 3 | 0 | 2 | 64 | 15 | 380 |
| 3 | 1 | 0 | 43 | 7 | 210 |
| 3 | 1 | 1 | 75 | 14 | 230 |
| 3 | 1 | 2 | 120 | 30 | 380 |
| 3 | 2 | 0 | 93 | 15 | 380 |
| 3 | 2 | 1 | 150 | 30 | 440 |
| 3 | 2 | 2 | 210 | 35 | 470 |
| 3 | 3 | 0 | 240 | 36 | 1300 |
| 3 | 3 | 1 | 460 | 71 | 2400 |
| 3 | 3 | 2 | 1100 | 150 | 4800 |
| 3 | 3 | 3 | ≥ 2400 | | |

**Tomado de NOM-AA-42-1987**

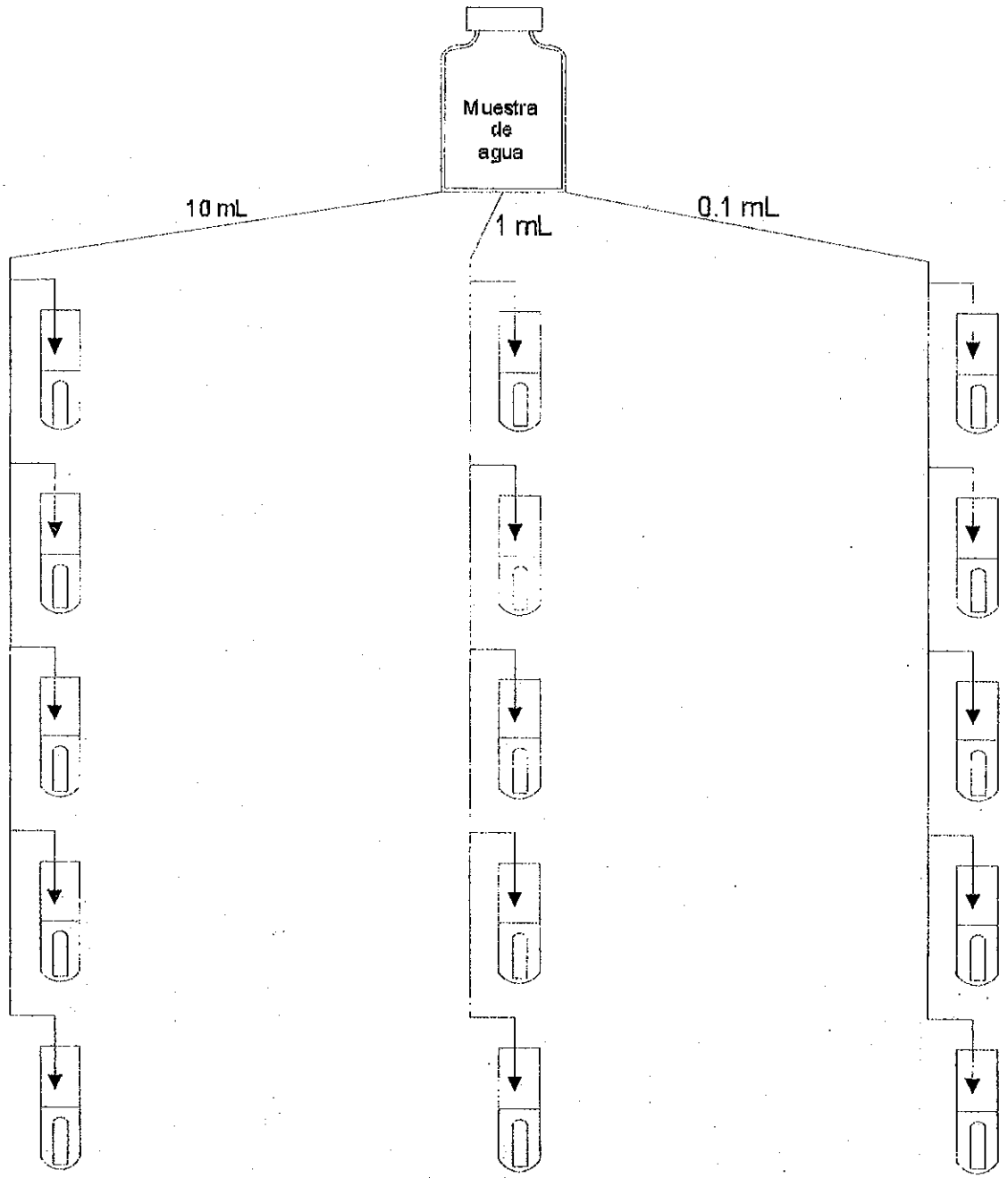



**Figura 17.1 Prueba presuntiva en la determinación del NMP de CT y CF en agua potable, inoculando por quintuplicado volúmenes de 10, 1 y 0.1 mL en tubos de fermentación con caldo lactosado**

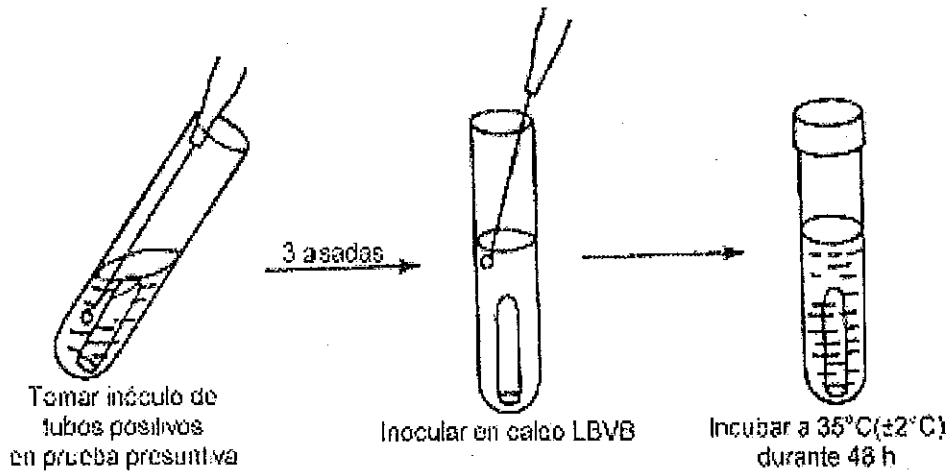



**Figura 17.2 Prueba confirmativa para coliformes totales**

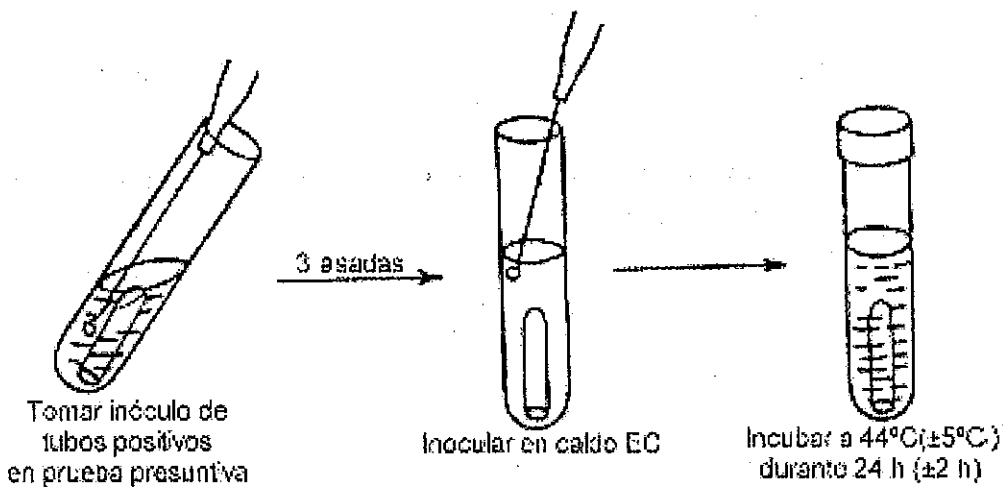



**Figura 17.3 Prueba confirmativa para coliformes fecales**

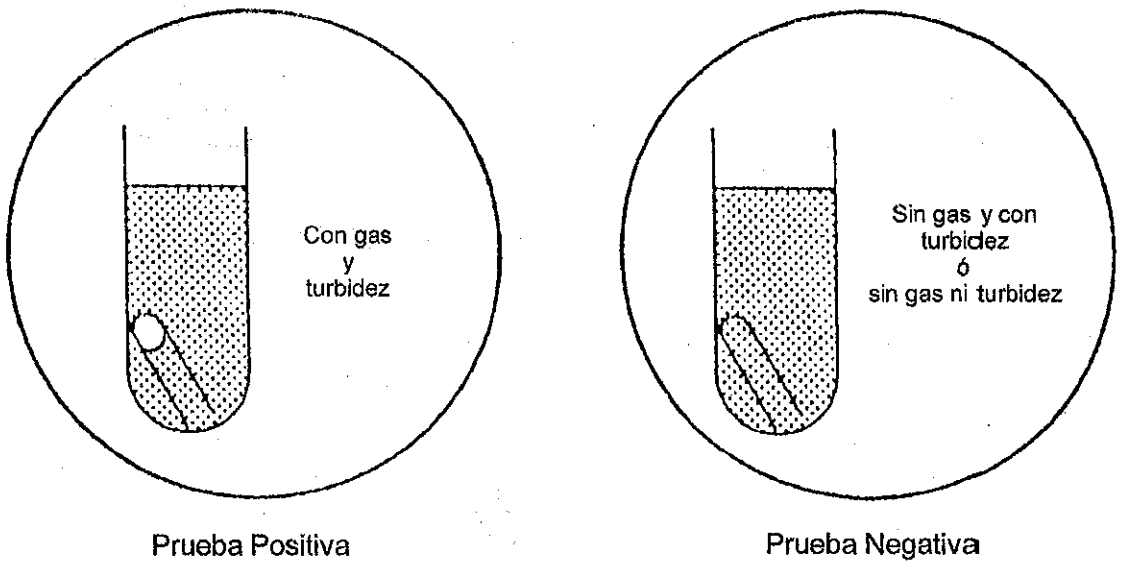



**Figura 17.4 Evaluación de las pruebas presuntiva y confirmativa en la determinación del NMP de coliformes totales y fecales**

# PRÁCTICA Núm. 18

# INVESTIGACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN AGUA RESIDUAL

## I. OBJETIVO

Determinar la presencia de coliformes totales y fecales en agua residual por el método del número más probable (NMP), utilizando la técnica de tubos de fermentación múltiple.

## II. INTRODUCCIÓN

Debido a que las aguas residuales provenientes de descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier uso, así como la mezcla de ellas, son de composición variada contienen diferentes tipos y concentraciones de microorganismos contaminantes, dependiendo de su fuente.

La variada población de microorganismos en esta agua, proveniente principalmente del suelo y del intestino de humanos y de animales, incluye aerobios y anaerobios estrictos y facultativos, así como también numerosos virus como: Poliovirus y virus de la hepatitis. Igualmente pueden contener formas parasitarias diversas como quistes de protozoarios y huevecillos de helmintos (metazoarios).

Estos microorganismos pueden sobrevivir en el agua aún cuando ésta haya recibido algún tipo de tratamiento ya sea fisicoquímico y/o biológico, por lo que su reuso por ejemplo en riego agrícola, actividades recreativas (piscinas, baños de hidromasaje), actividades piscícolas y su vertido en aguas potables naturales y aguas marinas superficiales (playas), representan un riesgo potencial a la salud pública.

Asimismo, en nuestro país existe el grave problema de contaminación de ríos, lagos acuíferos y costas debido a que éstos son utilizados como depósito de todos los desechos generados por las actividades humanas.

Por todo lo anterior, además del estudio de las características fisicoquímicas del agua se requiere de un estudio microbiológico.

Para este propósito se deberán obtener muestras representativas usando los procedimientos de toma de muestras establecidos en las Normas Oficiales Mexicanas (NOM).

Para la determinación del NMP de coliformes totales y fecales en este tipo de aguas, es necesario proceder a preparar diluciones decimales de la muestra, debido a que se espera que la concentración de coliformes sea mayor en éstas que en un agua potable.

El número de diluciones varía mucho, dependiendo del origen de la muestra. Por lo demás, para su análisis se procede en la misma forma que para una muestra de agua potable.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestra de agua de diferente naturaleza
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- 7 tubos de 18 x 150 mm conteniendo 9 mL exactos de agua de dilución estéril
- 7 Pipetas de 1 mL estériles
- 15 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo caldo lactosado estéril de concentración sencilla.
- 15 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo caldo lactosa Bilis Verde Brillante (CLBVB) estéril
- 10 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo caldo E.C.(*Escherichia coli*) estéril
- 2 Cajas de Petri conteniendo agar endo estéril
- 5 Tubos de 18 x 150 mm conteniendo agar nutritivo inclinado estéril
- Agitador de tubos Vortex
- Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 13 x 100 mm
- Asa bacteriológica
- Incubadora a 35 °C
- Baño incubador para coliformes fecales a temperatura constante de 44 ± 0.5°C

## IV. TÉCNICA

### PRUEBA PRESUNTIVA

**Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.**

1. Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces para lograr una distribución uniforme de los microorganismos.

2. Dependiendo del origen de la muestra y el contenido bacteriano esperado, preparar las diluciones correspondientes.

3. Para preparar las diluciones, con una pipeta estéril tomar una alícuota de 1 mL de la muestra original y llevarlo a uno de los tubos previamente etiquetado conteniendo 9 mL de agua de dilución estéril, obteniendo de esta manera una dilución de $10^{-1}$ (Figura 18.1).

4. Agitar el tubo de la dilución $10^{-1}$ y con otra pipeta estéril tomar una alícuota de 1 mL y llevarlo a otro tubo previamente etiquetado conteniendo 9 mL de agua de dilución estéril para obtener una dilución de $10^{-2}$.

5. Proceder de la misma manera para obtener una dilución de $10^{-3}$ o hasta donde sea necesario.

6. A partir de cada una de las últimas tres diluciones, inocular 5 tubos de fermentación previamente etiquetados conteniendo caldo lactosado o caldo lauril triptosa con una alícuota de 1 mL cada uno. Conservar en refrigeración todas las diluciones por si se requiere su utilización posterior.

7. Incubar los 15 tubos a una temperatura de 35 °C durante 24-48 horas.

8. Después de 24 horas de incubación efectuar una primera lectura para observar si hay tubos positivos, es decir, con producción de ácido, si el medio contiene un indicador de pH, por ejemplo rojo de fenol el cual vira de rojo a amarillo, turbidez y producción de gas en el interior de la campana Durham, el cual puede observarse desde la formación de una pequeña burbuja hasta el total desplazamiento del medio en el interior de la campana Durham.

9. Al hacer esta verificación es importante asegurarse que la producción de gas sea resultado de la fermentación de la lactosa, en cuyo caso se observará turbidez en el medio de cultivo, y no confundir con burbujas de aire.

10. Para evitar este tipo de confusiones es recomendable revisar las campanas Durham antes de proceder a la inoculación y desechar aquellos tubos cuyas campanas contengan burbujas de aire o de alguna manera eliminar éstas y así poder utilizarlos. Una forma de lograrlo es inclinando el tubo de fermentación hasta permitir que la campana se invierta un poco para dejar escapar la burbuja de aire, volviendo rápidamente el tubo a su posición normal.

11. De los tubos que en la primera lectura den positivos, ya se pueden hacer las pruebas confirmatorias para coliformes totales y coliformes fecales.

12. En caso de no apreciarse crecimiento en los tubos, continuar la incubación por

24 horas más.

13. Después de 48 horas (± 2h) a partir de la inoculación, se hace la lectura final.

14. Si pasadas 48 h no se observa crecimiento ni producción de gas, los tubos se toman como negativos.

**INTERPRETACIÓN:**

- Si todos los tubos dan **NEGATIVO** en la prueba presuntiva:

  El examen se da por terminado, reportando la **AUSENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES** en la muestra analizada.

- Si resultan tubos **POSITIVOS** durante la prueba presuntiva:

  Todos aquellos tubos que den positivos se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la **PRUEBA CONFIRMATORIA** para **coliformes totales y fecales.**

**PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES:**

1. Por cada tubo positivo en la prueba presuntiva, agitándolo previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas un tubo conteniendo CLBVB.

2. Incubar durante 48 ± 3 h a 35 ± 0.5 °C.

3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.

**INTERPRETACIÓN:**

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

  La prueba se considera **POSITIVA,** debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- **Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **NEGATIVOS.**

- **Si todos los tubos dan negativos o todos dan positivos:**

  Con base en los grados de dilución analizados, considerar la necesidad de repetir el análisis a partir de grados de dilución menores (mayores volúmenes de muestra) o mayores (menores volúmenes de muestra), respectivamente.

**PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES:**

1. Por cada tubo positivo en la prueba presuntiva, agitando previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas un tubo conteniendo caldo E.C.

2. Incubar durante 24 horas a 44.5 ± 0.2 °C. y después de este período, observar presencia de turbidez y gas.

**INTERPRETACIÓN:**

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

  La prueba se considera **POSITIVA,** debiendo anotar el número de tubos positivos y establecer el código para posteriormente hacer el cálculo del NMP Figuras 18.2 y 18.3.

- **Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **NEGATIVOS**.

- **Si todos los tubos dan negativos ó todos dan positivos:**

  Con base en los grados de dilución analizados, considerar la necesidad de repetir el análisis a partir de grados de dilución menores (mayores volúmenes de muestra) o mayores (menores volúmenes de muestra), respectivamente.

**CÁLCULOS**

De acuerdo a los tubos positivos en las pruebas confirmativas para coliformes totales y fecales, establecer los códigos correspondientes para calcular por referencia en la Tabla 17.1 el NMP de coliformes totales y fecales en 100 mL de agua.

En caso de no encontrar en la Tabla la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP/100 mL} = \frac{\text{No. de tubos positivos x 100}}{\sqrt{\text{mL de muestra en tubos negativos} \times \text{mL de muestra en todos los tubos}}}$$

## ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados se calculan de la siguiente manera:

- Se establece el código de valores correspondiente a los tres grados de dilución analizados que podrá ser leída en la Tabla 17.1 del NMP.

- Para efectos de expresar el valor obtenido basándose en 100 mL de muestra habrá de dividirse el resultado de la Tabla entre el volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central. Ver ejemplo (2) de la práctica anterior.

**En general se tiene:**

$$\text{NMP/C} = \frac{\text{NMP leído en la tabla}}{\text{Volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central (mL)}}$$

Los resultados obtenidos se expresarán de la siguiente manera:

NMP DE COLIFORMES TOTALES: _____ / 100 mL
NMP DE COLIFORMES FECALES: _____ / 100 mL

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son los límites máximos permisibles de coliformes fecales para las descargas de aguas residuales vertidas a aguas y bienes nacionales así como a suelo? Indicar la NOM

2. Mencionar 5 enfermedades transmitidas por el agua, indicando el agente etiológico correspondiente.

3. Además de representar un riesgo para la salud pública el vertido de aguas residuales tratadas inadecuadamente o sin tratar a los depósitos naturales, ¿Qué otros efectos indeseables puede representar?

4. ¿Cuáles son los límites máximos permisibles de coliformes fecales en aguas residuales tratadas que se reusan en servicios al público? Indicar la NOM.

5. ¿En qué otro tipo de muestras se puede investigar la presencia de coniformes totales y fecales?

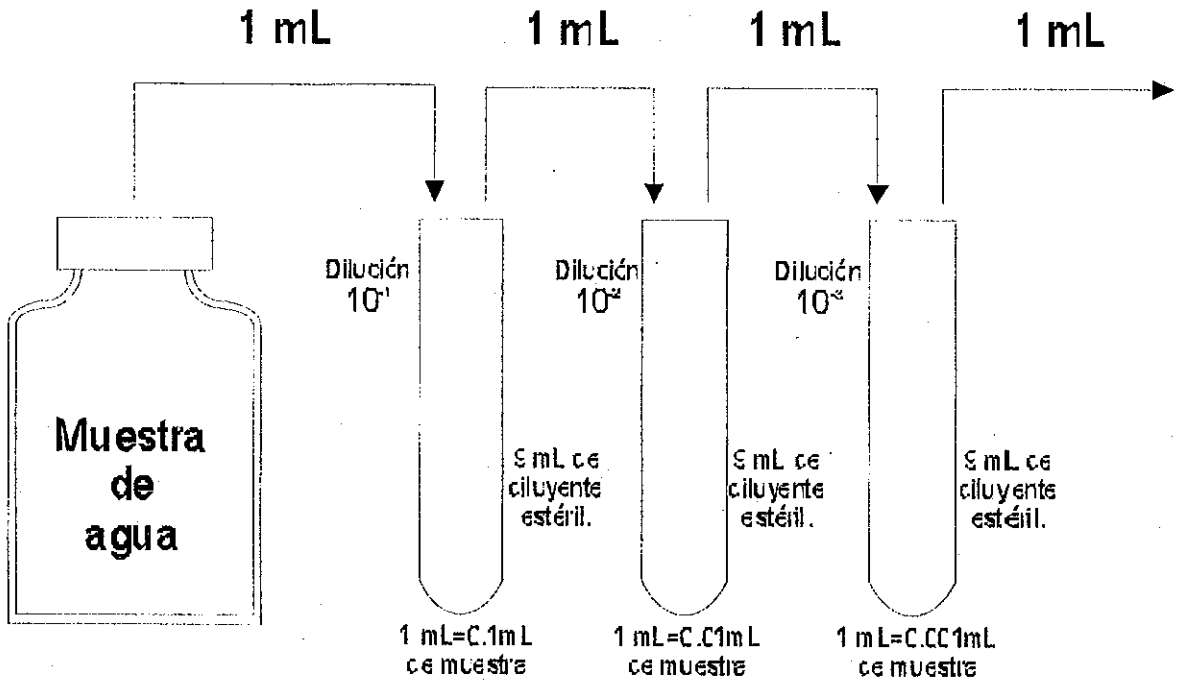



**Figura 18.1 Preparación de diluciones decimales**

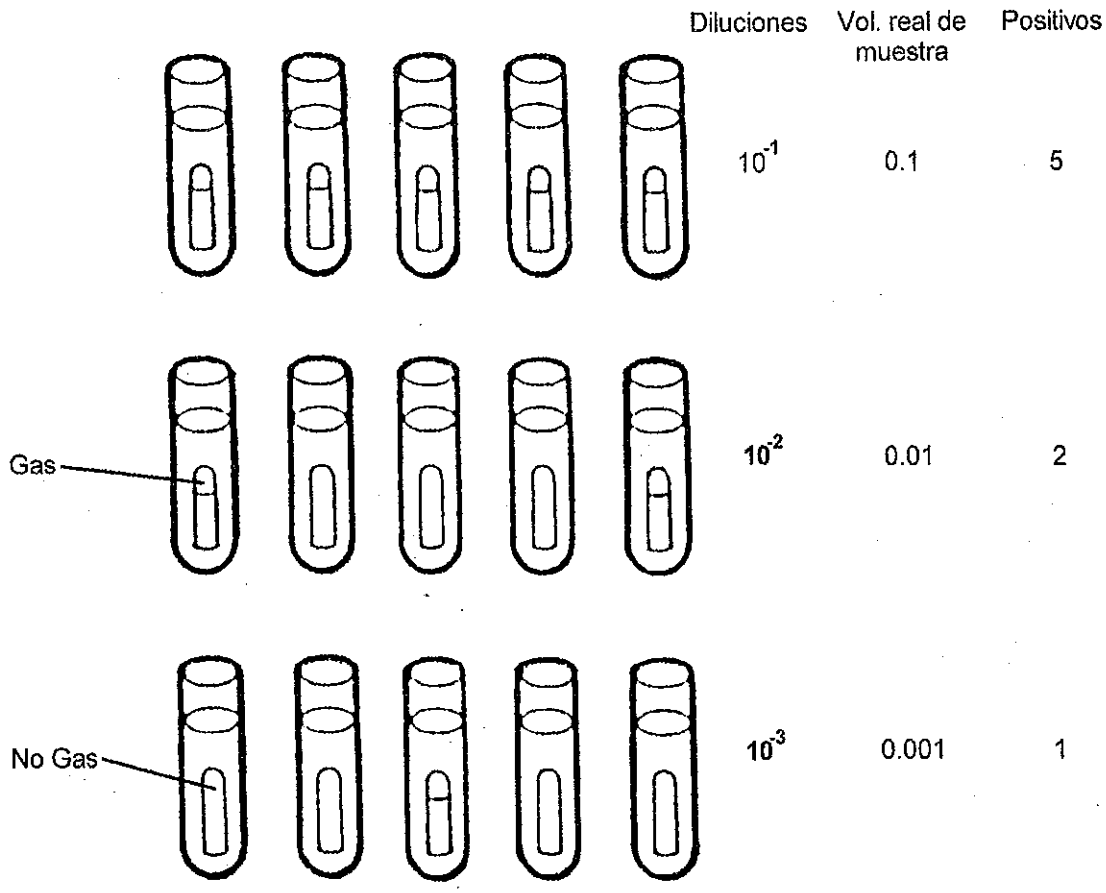



**Figura 18.2 Código de NMP: 5, 2,1**

| Fecha | Nº de muestra | Procedencia de la muestra | Nombre del Analista |
|---|---|---|---|
| | | | |

| | P. Presuntiva | P. Confirmativa Coliformes Totales | P. Confirmativa Coliformes Fecales |
|---|---|---|---|
| Factor de dilución | | | |
| 24 hrs | | | |
| 48 hrs | | | |
| | | | |
| | | C.T. NMP/100 mL | C.F. NMP/100 mL |
| | | | |

**Figura 18.3 Ejemplo de Tabla de resultados de coliformes totales y fecales**

# PRÁCTICA Núm. 19

# DETERMINACIÓN DE ESTREPTOCOCOS FECALES EN AGUA

## I. OBJETIVO

Investigar la presencia de estreptococos fecales en una muestra de agua mediante la técnica del número más probable (NMP) usando tubos múltiples.

## II. INTRODUCCIÓN

Se denominan estreptococos fecales aquellas bacterias de forma cocoide Gram positivas, aerobias o anaerobias facultativas, catalasa negativas que fermenten la glucosa con producción de ácido a 37 °C en un período máximo de 48 h.

En la denominación general de "estreptococos fecales" se encuentran aquellos estreptococos poseedores de la sustancia antigénica característica del grupo "D" de Lancefield, comprenden, desde el punto de vista taxonómico las especies: *Streptococcus faecalis* (y sus variedades), *Streptococcus faecium, Streptococcus durans, Streptococcus boris y Streptococcus equinus.*

### Grupo de Enterococos

Los enterococos son un subgrupo de estreptococos fecales, formado por *S. faecalis, S. faecium, S. gallinarum* y *S. avium.* Los enterococos se diferencian del resto de los estreptococos por su capacidad para crecer en cloruro de sodio al 6.5% a un pH de 9.6 y a 10 °C y 45 °C.

La porción de enterococos que integra al grupo de estreptococos fecales es un valioso indicador bacteriano, útil para determinar la amplitud de la contaminación fecal de las aguas recreativas.

La técnica del tubo múltiple se aplica sobre todo a las aguas residuales y sedimentos no tratados y clorados y también en aguas dulces y marinas.

En la determinación de estreptococos fecales, la prueba presuntiva se considera positiva si se observa en los tubos correspondientes la aparición de turbidez y/o sedimento.

Se podrán confirmar los tubos positivos por resiembra en un caldo más selectivo para observar nuevamente la aparición de turbidez y/o sedimento típicos y

realizar, a continuación, su valoración.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestras de agua de diferente origen, de un volumen mínimo de 100 mL
- 5 Tubos de 20 x 180 mm conteniendo 20 mL de caldo de glucosa-fosfato-azida (Rothe) estéril de doble concentración (Apéndice A)
- 10 Tubos de 18 x 150 mm conteniendo 10 mL de caldo de Rothe estéril de concentración sencilla
- 1 Pipeta de 10 mL graduada en décimas, estéril
- 2 Pipetas de 1 mL graduadas en décimas, estériles
- 10 Tubos de 18 x 150 mm conteniendo 10 mL de caldo de glucosa-fosfato azida-etil-violeta, EVA, (Litsky) estéril de concentración sencilla (Apéndice A)
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Asa bacteriológica
- Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 20 x 180 mm
- Agitador de tubos Vortex
- Incubadora a 37 °C

## IV. TÉCNICA

### PRUEBA PRESUNTIVA:

**Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.**

1. Preparar tres series sucesivas de 5 tubos con caldo Rothe, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla.

2. Etiquetar las series con 10, 1 y 0.1 mL, respectivamente.

3. Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces a efecto de homogeneizar, antes de tomar el volumen que se va a inocular.

4. Antes y después de realizar las inoculaciones, la boca del frasco de la muestra deberá ser flameada con objeto de evitar contaminación.

5. Inocular con una pipeta de 10 mL este volumen de muestra en la serie de tubos que contienen caldo de doble concentración.

6. Con una pipeta de 1 mL tomar este volumen de muestra e inocular la segunda serie de tubos que contienen caldo de concentración simple.

7. Con otra pipeta de 1 mL o con la misma usada anteriormente, inocular con 0.1 mL de muestra la tercera serie de tubos que contienen caldo de concentración simple.

**NOTA:**

Normalmente, siempre que no se sospecha que el agua contenga elevada carga bacteriana, solo se inoculan estas tres primeras series de tubos.

En caso contrario, será necesario inocular otras series y por lo tanto, realizar diluciones de la muestra original.

8. Incubar todos los tubos a una temperatura de 37 °C (± 1 °C) durante 24-48 h.

9. Después de 24 h de incubación, hacer una primera lectura. La reacción positiva es la aparición de turbidez y/o sedimento en el fondo del mismo.

   Con los tubos que en este momento resulten positivos se puede empezar con la realización de la prueba confirmativa.

10. En caso de no apreciarse crecimiento se llevan a incubación por 24 horas más, es decir un total de 48 horas (± 3h) después de las cuales se efectúa la lectura final.

11. Si pasado el período de 48 h no ha habido crecimiento (turbidez y/o sedimento) en ninguno de los tubos se consideran definitivamente como negativos.

**INTERPRETACIÓN:**

- Si todos los tubos son **NEGATIVOS** en esta prueba:

  El examen se da por terminado, reportando la **AUSENCIA DE ESTREPTOCOCOS FECALES** en la muestra analizada.

- Si resultan tubos **POSITIVOS** en esta prueba:
  Todos aquellos tubos positivos se anotarán convenientemente por orden de mayor a menor dilución y se procederá a realizar la **PRUEBA CONFIRMATORIA** para **ESTREPTOCOCOS FECALES** (Figura 19.1).

## PRUEBA CONFIRMATORIA PARA ESTREPTOCOCOS FECALES:

1. Se preparan tantos tubos de caldo glucosa-fosfato azida-etil-violeta, EVA, (Litsky), como tubos hayan resultado positivos en la lectura de la prueba presuntiva, rotulando los tubos adecuadamente para evitar errores en la lectura.

2. Por cada tubo positivo en la prueba presuntiva, agitándolo previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas, un tubo conteniendo caldo de Litsky.

3. Incubar a 37 °C (± 1 °C) durante 48 horas (± 3 h). Se puede hacer una primera lectura a las 24 horas.

   **NOTA:**

   Se consideran tubos positivos aquellos que presenten turbidez y/o sedimento típico de color violeta.

4. Finalizando el período de incubación (48 h) se hará la lectura final.

## INTERPRETACIÓN:

- **Si se observa turbidez y/o sedimento:**

  La prueba se considera **POSITIVA**, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- **Si en ninguno de los tubos se observa turbidez y/o sedimento:**

  Se consideran negativos, estableciéndose el código 0,0,0 para el cálculo correspondiente.

## ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

La valoración por medio de la Tabla del número más probable se realiza a partir del recuento del los tubos de cada serie que han resultado positivos después de la prueba confirmativa de la manera como se hizo para coliformes totales y fecales.
Si únicamente se han inoculado las primeras series de 10, 1 y 0.1 mL, el resultado leído en la Tabla correspondiente, será el NMP en 100 mL de muestra.

La lectura se realiza en la Tabla 17.1 de acuerdo al código establecido con base a los tubos positivos en la prueba confirmativa en la columna correspondiente al Índice del NMP por 100 $cm^3$ (ver ejemplo 1).

En cambio si se han efectuado diluciones se leerá en la Tabla 17.1 el valor del Índice del NMP y se dividirá por el volumen real de muestra inoculada en los tubos de la serie central del triplete elegido, que corresponde a la dilución promedio (ver ejemplo 2).

El resultado obtenido se presentará de la siguiente manera:

NMP de estreptococos fecales: _____/100 mL

**EJEMPLOS:**

1. El resultado obtenido en la determinación de estreptococos fecales en la que se han inoculado tres series con volúmenes de 10, 1 y 0.1 mL de muestra, es el que se especifica en la siguiente tabla:

| Volumen de muestra inoculada. (mL) | Denominación de la serie de 5 tubos. | Tubos positivos en la prueba presuntiva. | Tubos positivos en la prueba confirmativa. |
|---|---|---|---|
| 10 | 1-EF | 5 | **3** |
| 1 | 2-EF | 3 | **1** |
| 0.1 | 3-EF | 1 | **1** |

De acuerdo a los tubos que resultaron positivos en la prueba confirmativa se establece el código 3,1,1 y se procede a leer el Índice del NMP en la Tabla 17.1 cuyo valor es de 14, por lo tanto este es el resultado el cual se expresa como:

**NMP de estreptococos fecales: 14/100 mL**

2. El resultado obtenido en la determinación de estreptococos fecales mediante el método de las diluciones sucesivas es el que se especifica en la siguiente tabla:

| Volumen de muestra inoculada. (mL) | Denominación de la serie de 5 tubos. | Tubos positivos en la prueba presuntiva. | Tubos positivos en la prueba confirmativa. |
|---|---|---|---|
| 0.01 | 1-EF | 4 | **4** |
| 0.001 | 2-EF | 2 | **1** |
| 0.0001 | 3-EF | 1 | **0** |

En este caso se establece el código 4,1,0 y se procede a la lectura del Índice del NMP en la Tabla 17.1 cuyo valor es de 17, el cual se divide entre el volumen real de muestra inoculado en la serie central del triplete escogido, es decir, el correspondiente a la dilución promedio que en este caso es 0.001 (dilución 1/1000 ó $10^{-3}$).

Por tanto se tiene: 17 / 0.001 = 17 x 1000 = 17,000

El resultado se expresará:

**NMP de estreptococos fecales: 17,000/100 mL**

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se considera a *Streptococcus faecalis* un indicador de contaminación fecal?

2. ¿En qué tipos de aguas es importante determinar la presencia de enterococos?

3. Dibujar la morfología y agrupación que presenta *Streptococcus faecalis.*

4. Investigar el valor máximo permisible de enterococos en aguas dulces recreativas y en aguas marinas.

5. ¿Que otro microorganismo no coliforme, es importante investigar en un agua de piscina?

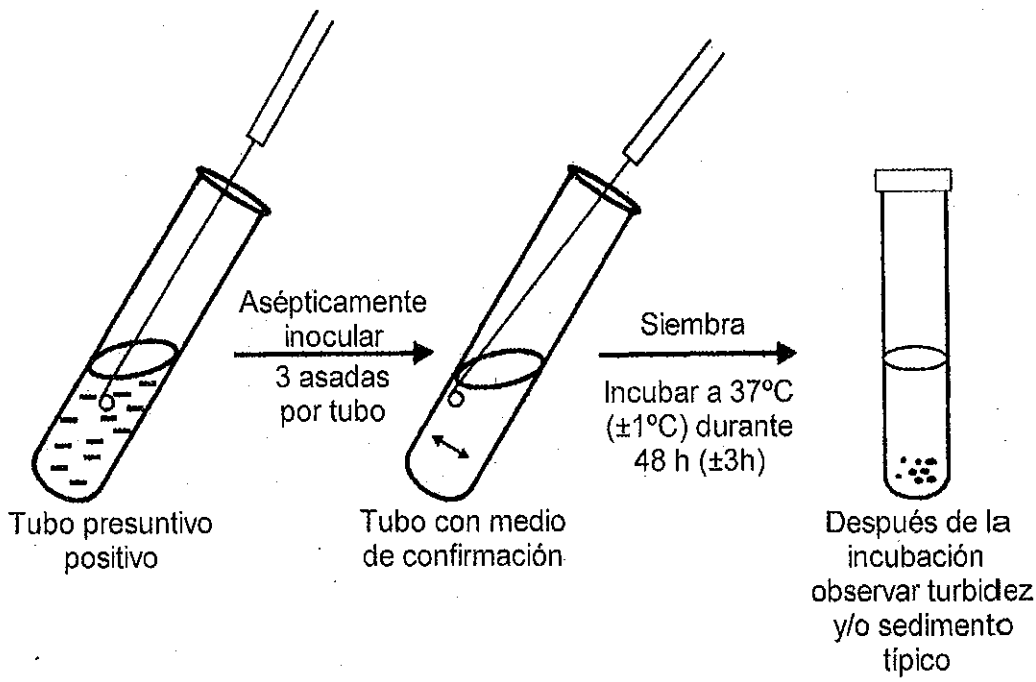



**Figura 19.1 Prueba confirmativa de estreptococos fecales**

# PRÁCTICA Núm. 20

# DETERMINACIÓN DE CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES EN AGUA

## I. OBJETIVO

Determinar la presencia de clostridios sulfito reductores en agua por el método de recuento en tubo.

## II. INTRODUCCIÓN

Los procedimientos bacteriológicos de rutina en el análisis de agua incluyen la determinación de clostridios sulfito reductores.

Se consideran Clostridios sulfito reductores aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram positivas, anaerobias estrictas, capaces de formar esporas y con actividad sulfito reductora.

La determinación de éstos se basa en el recuento del número de colonias, con capacidad sulfito-reductora, desarrolladas en un medio específico, incubadas en condiciones anaerobias durante un tiempo y a una temperatura determinada.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- 1 Muestra de agua (100 mL), ya sea de consumo "clorada", "natural limpia" o "residual", por cada equipo
- 4 Tubos de 18 x 159 mm estériles
- Baño de agua con temperatura constante a 50 °C
- Baño de agua con temperatura constante a 80 °C
- 4 Tubos de 20 x 200 mm conteniendo cada uno 15 mL de agar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS) aun fundido, manteniéndolos en un baño de agua a 50 °C con el objeto de que permanezcan a esa temperatura y al mismo tiempo para eliminar el aire (Apéndice A), (Figura 20.1)
- 3 Pipetas de 10 mL estériles
- Gradillas para tubos de 18 x 150 mm y de 20 x 200 mm
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Parafina o vaselina estéril

## IV. TÉCNICA

1. Agitar la muestra vigorosamente para homogeneizar.

2. A partir de la muestra previamente homogeneizada tomar alícuotas de 10 mL con una pipeta estéril y depositarlas en cada uno de los tubos estériles vacíos.

3. Una vez que estos tubos contienen los 10 mL de agua, mantenerlos en un baño de agua a 80 °C durante 5 minutos a efecto de que se destruyan las formas vegetativas y permanezcan solamente las formas esporuladas (Figura 20.1).

4. Retirar y dejar enfriar los tubos.

5. Tomar los tubos con agar SPS a 50 °C, rotularlos convenientemente y proceder a su inoculación profunda, de la siguiente manera:

- Con una pipeta estéril tomar 5 mL de la muestra de agua e introducirla hasta el fondo del tubo que contiene el agar.

- Con mucho cuidado ir depositando el agua a lo largo de todo el tubo desplazando la pipeta al exterior, procurando que el total de la muestra quede en el agar y no se airee.

- Rápidamente pasar el tubo al chorro del agua de la llave para enfriarlo.

- Después añadir una capa de unos 3 mm de espesor de vaselina o parafina estéril para conseguir condiciones de anaerobiosis.

- Este procedimiento se repite con los 3 tubos restantes.

**NOTA:**

Si se sospecha que el agua está muy contaminada, se pueden inocular 5 mL de muestra en un tubo y en los restantes, 5 mL de las diluciones $10^{-1}$, $10^{-2}$ y $10^{-3}$. En caso necesario se puede incrementar el grado de dilución.

6. Una vez inoculados todos los tubos, incubar a 37°C (±1°C) durante 24 h (± 2h).

7. Transcurrido el período de incubación, contar las colonias de color negro que aparezcan en los cuatro tubos inoculados (Figura 20.2).

## CÁLCULOS Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS:

Efectuado el recuento en los tubos correspondientes, el resultado obtenido se calculará de la siguiente manera:

- **Si se han sembrado 20 mL de muestra, es decir, 5 mL en cada uno de los cuatro tubos, el resultado es directo.**

- En caso de haber realizado diluciones, se aplica la siguiente fórmula:

Número de esporas de clostridios sulfito reductores/20 mL = (Número de colonias/volumen real de la muestra inoculada en mL) x 20.

## LOS RESULTADOS SE EXPRESARÁN ASÍ:

Número de esporas de clostridios sulfito-reductores: ____/20 mL.

## EJEMPLOS:

a) Los resultados obtenidos en la determinación en agua, de esporas de clostridios sulfito-reductores son los que se especifican a continuación:

| Volumen de muestra inoculada (mL) | Tubo | Número de colonias |
|---|---|---|
| 5 | 1 | 5 |
| 5 | 2 | 3 |
| 5 | 3 | 2 |
| 5 | 4 | 4 |

Número total de colonias: 5 + 3 + 2 + 4 = 14

Volumen total de muestra inoculada = 20 mL.

**El resultado es directo y por tanto se expresará:**

Número de esporas de clostridios sulfito-reductores: 14/20 mL.

b) En el análisis de una muestra de agua fue necesario efectuar diluciones para la determinación de esporas de clostridios sulfito-reductores, obteniendo los siguientes resultados:

| Volumen de muestra inoculada (mL) | Tubo | Número de colonias |
|---|---|---|
| 5 | 1 | Incontables |
| 0.5 | 2 | 13 |
| 0.05 | 3 | 7 |
| 0.005 | 4 | 0 |

Los tubos en los cuales se ha realizado el recuento de colonias son los números 2 y 3, por tanto:

- **Número total de colonias: 13 + 7 = 20**

  **Suma de los volúmenes de muestra inoculados: 0.5 + 0.05 = 0.55**

- **Se aplica la fórmula general:**

  **(20 colonias/0.55 mL) x 20 = 727**

- **El resultado se expresará:**

  **Número de esporas de clostridios sulfito-reductores: 727/20 mL.**

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Por qué las colonias de clostridios sulfito reductores son de color negro en el agar SPS?
2. ¿A qué se debe la posible presencia de clostridios sulfito reductores en agua?
3. ¿En qué otro medio se pueden encontrar difundidos los clostridios?
4. ¿A qué se atribuye la patogenicidad de los clostridios?
5. Mencionar 5 especies de clostridios.

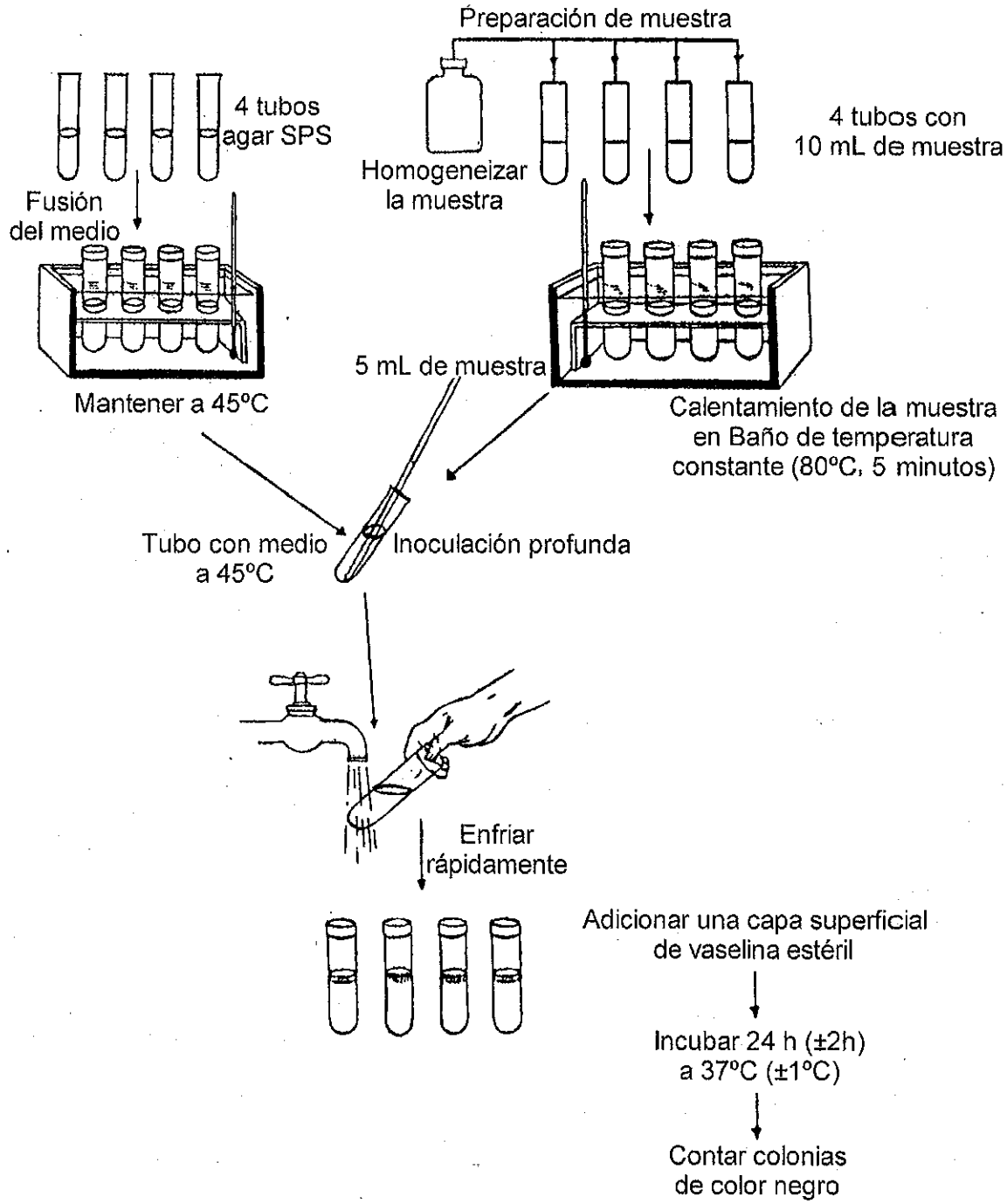



**Figura 20.1 Determinación de clostridios sulfito reductores por el método de recuento en tubo**

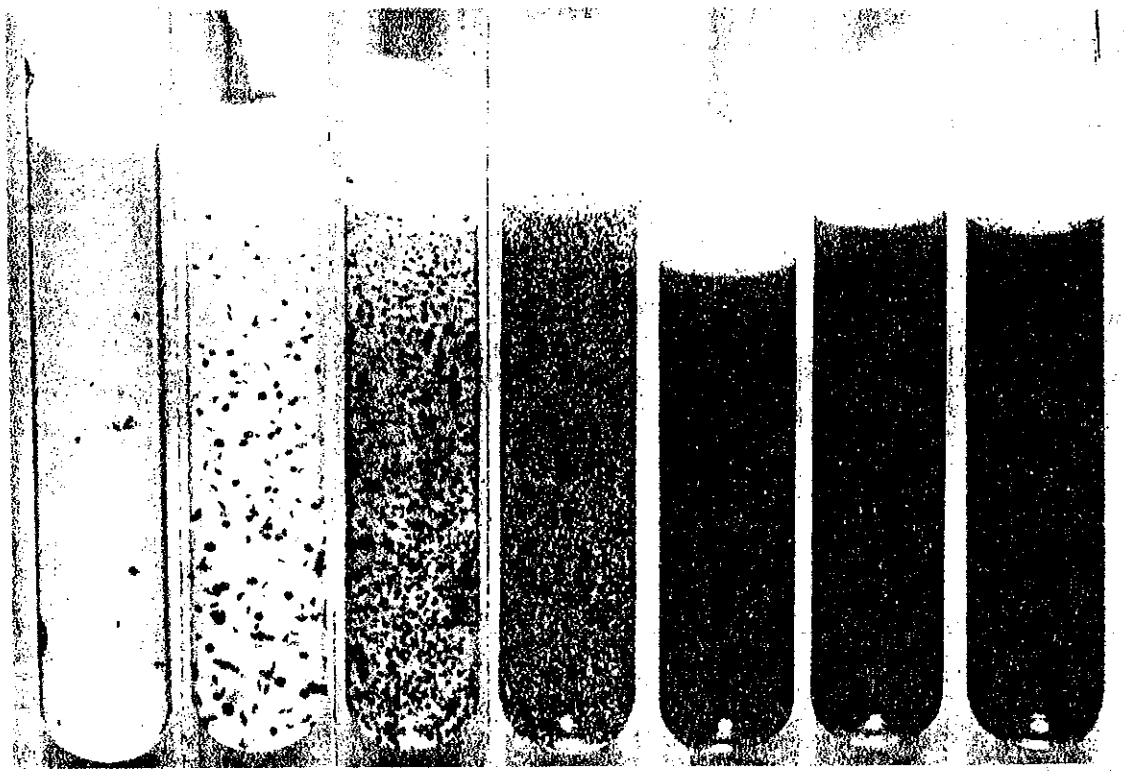


**Figura 20.2 Serie de diluciones donde se observan colonias de clostridios sulfito reductores bien aisladas en los tubos de la izquierda**

# PRÁCTICA Núm. 21

# RECUENTO DE INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL EN AGUA MEDIANTE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

## I. OBJETIVO

Efectuar el recuento de Indicadores de contaminación fecal en diferentes tipos de agua.

## II. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de recuento mediante filtración de membrana son asimilables a cualquier técnica de recuento en placa con la particularidad de ser apropiadas para estimar concentraciones microbianas muy pequeñas.

Estas técnicas constituyen una alternativa más exacta al método del número más probable para estimar concentraciones de grupos microbianos en muestras líquidas, sin embargo, para aguas turbias pueden resultar no adecuadas.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestra de agua de diversa naturaleza, de no menos de 100 mL
- Equipo de filtración Millipore estéril
- Bomba de vacío
- Pinzas Millipore de punta plana
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Gradillas
- Pipetas de 10 mL graduadas en mL y 1 mL graduadas en décimas, estériles
- Cuentacolonias Quebec
- 6 membranas de filtración Millipore cuadriculadas, estériles
- 4 Tubos de ensayo conteniendo 9 mL exactos de agua de dilución estéril, cada uno
- Cajas de Petri por triplicado conteniendo los siguientes medios de cultivo: m-Endo LES, AGAR m-FC, KF-*Streptococcus*, sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS), Agar Triptona Soya (TSA), Infusión de cerebro y corazón agar (BHIA) y agar de bilis y esculina (BEA)
- Solución al 1% de oxalato de p-aminodimetilanilina, para prueba de citocromo-oxidasa
- Discos impregnados de o-nitrofenol-ß-D-galactopiranósido (ONPG), para disolver en 0.2-0.5 mL de suero fisiológico, para prueba de la ß-Galactosidasa

- Vaso con 50 mL de alcohol
- Probeta de 100 mL estéril
- Solución acuosa de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes, para prueba de la catalasa (Apéndice C)

## IV. TÉCNICA

De acuerdo al tipo de muestra asignada a cada equipo de alumnos, deberá seguir la metodología correspondiente, que comprende las siguientes etapas:

### 1. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN A ANALIZAR

**Fundamento:**

Cada filtración permite efectuar recuentos dentro de los límites determinados de carga microbiana.

Es preciso ajustar el volumen a filtrar para que, en la medida de lo posible, pueda situarse dentro de esos límites.

Para cada tipo de muestra se presupone una cantidad de carga microbiana más o menos determinada.

Este hecho da una orientación para elegir los volúmenes que es necesario analizar (Tabla 21.1).

Sin embargo, si la muestra ya ha sido analizada con anterioridad, se utiliza preferentemente esa información para escoger las alícuotas a filtrar.

**Procedimiento:**

Según los límites de recuento para cada indicador (Tabla 21.2) y el tipo de muestra (Tabla 21.1), se escoge el volumen a filtrar.

### 2. FILTRACIÓN

La población bacteriana contenida en un volumen conocido de agua se concentra al ser retenida en una membrana filtrante (Figuras 21.1-21.3).

El mecanismo de filtración ha de asegurar una distribución homogénea de esa población por toda la superficie de la membrana.

Utilizando el mismo embudo para cada muestra se efectúan las filtraciones para cada indicador.

Si hubiera que efectuar diluciones para obtener alguna alícuota, se empieza filtrando la más diluida.

Entre muestra y muestra, se deberá cambiar o esterilizar el embudo.

## 3. INCUBACIÓN

A continuación la membrana se deposita sobre el medio selectivo-diferencial adecuado y se incuba en las condiciones propias del grupo en estudio en ese medio.

Incubar cada medio según la Tabla 21.2

## 4. RECUENTO

La superficie filtrante es, a la vez, la superficie de cultivo y constituye una limitación para el desarrollo colonial a partir de un determinado número de U.F.C. por placa.

El tamaño de las colonias también acota el número máximo de éstas que puede albergar una membrana filtrante.

En consecuencia, para cada medio de cultivo y cada microorganismo se establece un recuento máximo admisible según el tamaño de la superficie filtrante.

Por encima de este valor no se desarrollan todos los microorganismos que se pretende contar y las colonias obtenidas no mostrarán plenamente la morfología diferencial deseada.

Asimismo, y debido a la variabilidad estadística de los recuentos, se recomienda un límite mínimo de recuento de 20 colonias.

Según los límites de recuento establecidos para cada medio se escoge la placa más adecuada (Tabla 21.2).

Se efectúa el recuento de esta placa, si es necesario, con la ayuda del cuentacolonias.

Para el medio m-Endo es preferible utilizar iluminación natural.

## 5. CONFIRMACIÓN

Como en cualquier medio diferencial la morfología colonial constituye únicamente un indicio, más o menos seguro, de la identidad de esa colonia.

Su pertenencia al grupo microbiano en estudio sólo se confirma después de la realización de pruebas (Tabla 21.3).

El número de colonias que es necesario confirmar depende de varios factores, sobre todo del valor predictivo de la morfología colonial típica descrita para cada medio de cultivo (Figuras 21.4 y 21.5).

Asimismo es necesario confirmar aquellas colonias de morfología mal definida y que no se sabe si incluirlas o no en el recuento. En las aguas de consumo público la confirmación es preceptiva.

En cualquier caso se efectúa la confirmación sobre un número de colonias y se multiplica el recuento inicial por el porcentaje de confirmaciones positivas.

## 6. CÁLCULO

A partir del recuento confirmado y del volumen filtrado se calcula la concentración microbiana en la muestra referida a un volumen estandarizado.

Corregir el recuento inicial de acuerdo con el porcentaje de confirmaciones y calcular la concentración referida a 100 mL.

## V. CUESTIONARIO

1. Elaborar un cuadro con los resultados de la cuantificación obtenidos por los diferentes equipos.

2. Basándose en la normatividad vigente, cada equipo señalará la calidad del agua analizada. Comparar resultados con los demás equipos.

3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de filtración por membrana respecto al de placa vertida y NMP en el análisis de agua?

4. Consultar el fundamento de la prueba de la oxidasa.

5. Consultar el fundamento de la pruebas de la ß-Galactosidasa (ONPG) y de la catalasa.

**Tabla 21.1 Volúmenes sugeridos para el recuento de indicadores de contaminación fecal mediante filtración por membrana**

| TIPO DE MUESTRA | 100 mL | 30 mL | 25 mL | 20 mL | 10 mL | 5 mL | 1 mL | 0.1 mL | 0.01 mL | 0.001 mL | 0.0001 mL |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Aguas de consumo cloradas* | CT<br>CF<br>EF | | | <br><br>Cl | | | | | | | |
| Aguas de consumo no cloradas* y aguas naturales "limpias" | CT<br>CF<br>EF | CF | CT<br><br>EF | <br><br><br>Cl | CF | CT<br><br>EF<br><br>Cl | | | | | |
| Aguas marinas de zonas de baño | CT<br>CF<br>EF | | | | CT<br>CF<br>EF | | CT<br>CF<br>EF | CT | | | |
| Aguas residuales urbanas depuradas | | | | | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT | |
| Aguas residuales urbanas crudas | | | | | | | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT<br>CF<br>EF<br>Cl | CT |

**CT** = Coliformes totales
**CF** = Coliformes fecales
**EF** = Estreptococos fecales.
**Cl** = Clostridios sulfito reductores.
• = Para las aguas de consumo se han ajustado los volúmenes para obtener el mejor aprovechamiento de los límites de recuento de los medios de cultivo.

**Tabla 21.2 Uso de los medios de cultivo recomendados para el recuento de indicadores de contaminación fecal mediante filtración por membrana**

| MICROORGANISMO INDICADOR | CONDICIONES DE INCUBACIÓN | MEDIO DE CULTIVO | DIFERENCIACIÓN COLONIAL | LÍMITES DE RECUENTO MÍNIMO RECOMENDADO | LÍMITES DE RECUENTO MÁXIMO ADMISIBLE |
|---|---|---|---|---|---|
| **COLIFORMES TOTALES** | 37 °C, 24 h, Aerobiosis | m-Endo LES | "Colonias con brillo metálico". Debido a la reducción de la Fucsina por los aldehídos del metabolismo de la lactosa | 20 colonias sospechosas | 80 colonias sospechosas y/o 200 en total |
| **COLIFORMES FECALES** | 44 °C, 24h, Aerobiosis | m-FC | "Colonias azules" Debido a la reducción del azul de anilina. | 20 colonias sospechosas | 60 colonias sospechosas y/o 200 en total |
| **ESTREPTOCOCOS FECALES** | 37 °C, 48h, Aerobiosis | KF-*Streptococcus* | "Colonias de rosa a rojo ladrillo" Debido a la reducción del cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) | 20 colonias sospechosas | 80 colonias sospechosas y/o 200 en total |
| **CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES** | Trat. previo muestra: 5 min. 80 °C, "37 °C, 24h, Anaerobiosis Doble capa" | SPS Sulfito-Polimixina-Sulfa diazina | "Colonias negras" Debido a la precipitación del sulfuro de hierro por el ácido sulfhídrico. | 20 colonias sospechosas | 40 colonias sospechosas |

**Tabla 21.3 Valor predictivo y pruebas confirmatorias de los medios de cultivo recomendados para el recuento de indicadores de contaminación fecal mediante filtración por membrana**

| MEDIO DE CULTIVO | VALOR PREDICTIVO DE LA MORFOLOGÍA COLONIAL TÍPICA* | PRUEBAS CONFIRMATORIAS |
|---|---|---|
| **m-Endo LES** | **"REGULAR":** Presenta falsos positivos. Es necesario confirmar. | Sembrar con el asa bacteriológica las colonias a confirmar en una placa de TSA. Incubar por 24 h a 37 °C. Sobre el crecimiento obtenido de cada colonia efectuar la prueba de la oxidasa. |
| **m-FC** | **"BUENO":** Solo hay que confirmar si se duda en la apreciación del color. | Sobre las colonias oxidasa negativas efectuar la prueba de la β-galactosidasa (ONPG). "Son coliformes las colonias oxidasa negativas y ONPG positivas". |
| **KF-*Streptococcus*** | **"BAJO":** Siempre es necesario confirmar. | Resembrar las colonias a confirmar en una placa de BHIA (agar infusión de cerebro y corazón).Incubar por 24 h a 37 °C. Sobre el crecimiento obtenido de cada colonia efectuar la prueba de la catalasa. Sembrar las colonias catalasa negativas sobre BEA (agar de bilis y esculina) Incubar de 4-8 h, a 37 °C. Hacer una primera lectura a las 4 h. "Son estreptococos fecales las colonias catalasa negativas y que viran a negro el medio de BEA, (hidrólisis de la esculina)" |
| **SPS (Sulfito-polimixina-sulfadiazina)** | **"MUY BUENO":** No es necesaria la confirmación. | |

*Únicamente para las placas que no superen el límite de recuento máximo admisible.

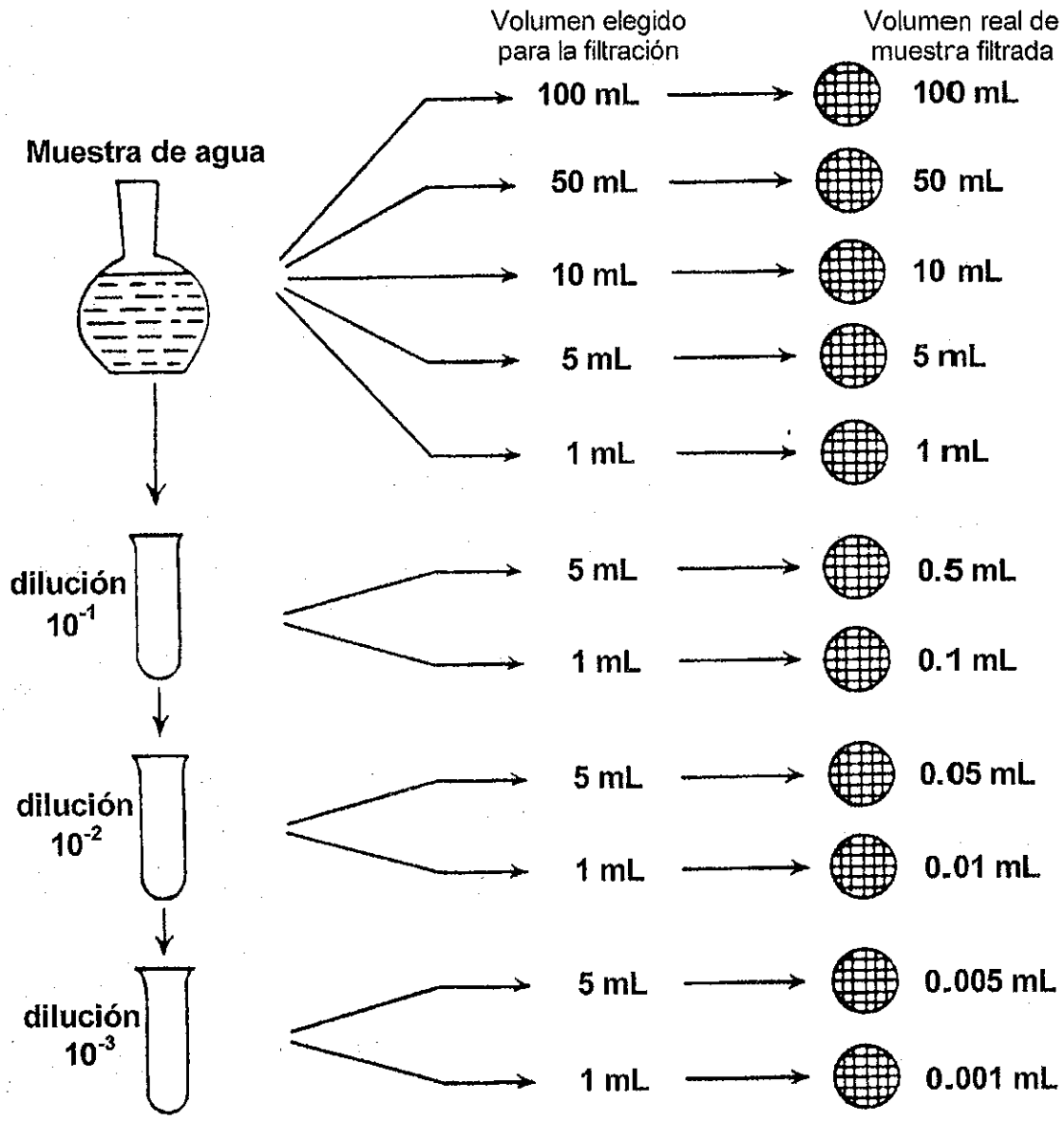
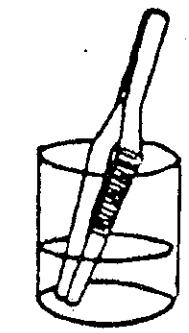
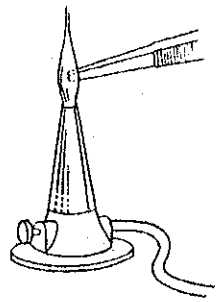


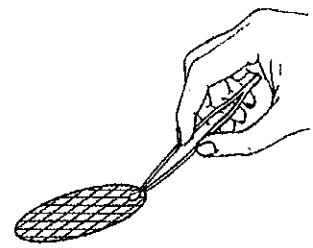

**Figura 21.1 Volumen de agua a filtrar y volumen real filtrado**



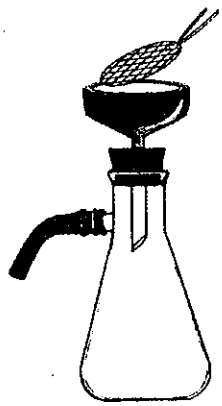
Sumergir las pinzas en alcohol.



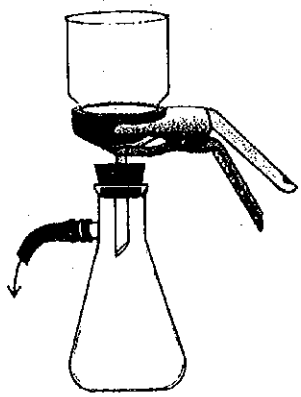
Flamearlas para su esterilización.



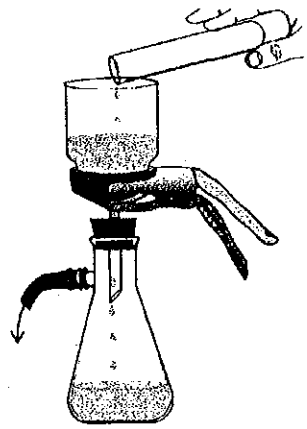
Tomar con ellas la membrana de acetato de celulosa



Colocarla sobre el soporte de la base del filtro, con la cuadrícula hacia arriba.

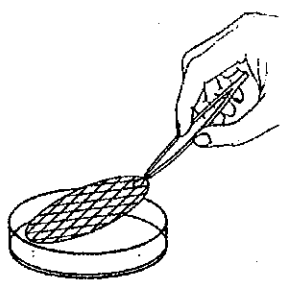


Ensamblar el embudo

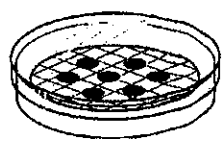


Filtrar la muestra de agua

Desensamblar el embudo y retirar la membrana con pinzas estériles

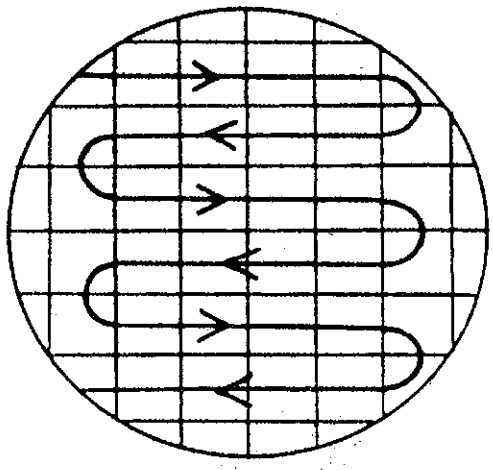


Colocarla en el centro de la superficie del medio de agar Endo, con la cuadrícula hacia arriba

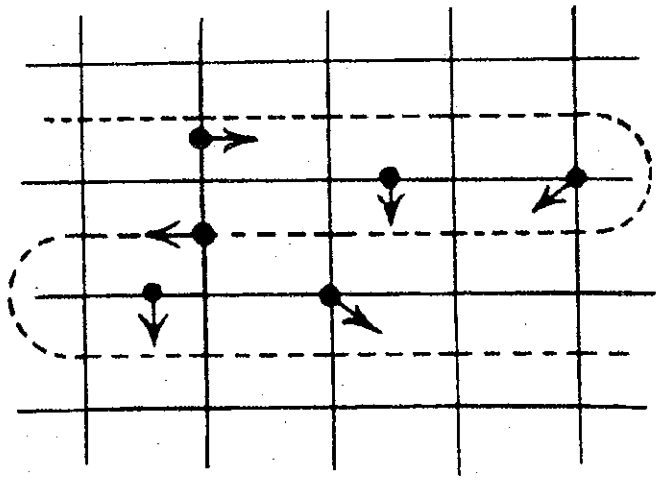


Después de la incubación contar el número de colonias sobre el filtro.

**Figura 21.2 Análisis de agua por el método de filtración por membrana**



Trayectoria para realizar el recuento de colonias



Criterio en el recuento de colonias

**Figura 21.3 Recuento de colonias**

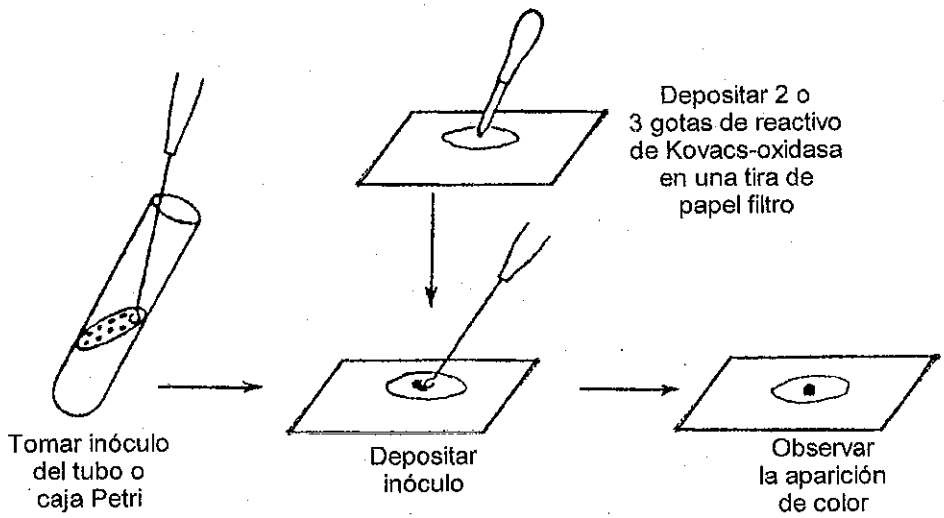
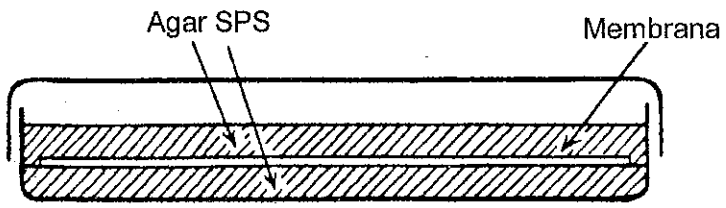
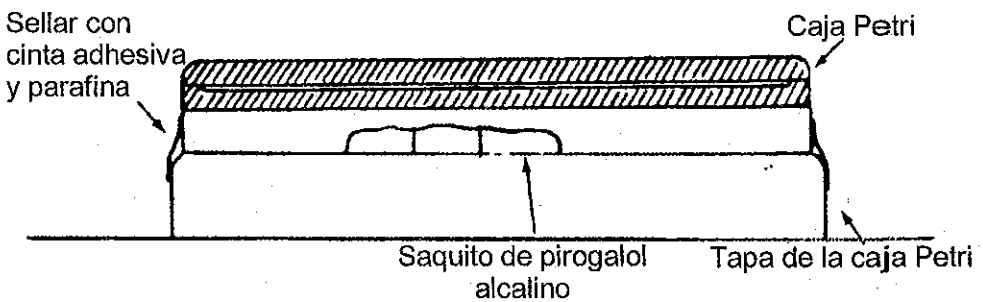



**Figura 21.4 Prueba de la oxidasa**




Recubrimiento de la membrana con doble capa de agar.




Condiciones de anaerobiosis con el uso de pirogalol alcalino.

**Figura 21.5 Cultivo en caja por la técnica de filtración de membrana de clostridios sulfito reductores en condiciones de anaerobiosis**

# PRÁCTICA Núm. 22

# INVESTIGACIÓN DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN DESECHOS SÓLIDOS Y COMPOSTA

## I. OBJETIVO

Determinar la presencia de coliformes totales y fecales en un desecho sólido por el método del número más probable (NMP) utilizando la técnica de tubos de fermentación múltiple.

## II. INTRODUCCIÓN

Al igual que en el agua, es importante, sobre todo desde el punto de vista sanitario, la realización del análisis microbiológico de los desechos sólidos para conocer la naturaleza de los microorganismos presentes en éstos, por ejemplo en la basura, para lo cual se requiere de una muestra representativa la cual llega al laboratorio una vez que se ha llevado a cabo todo el proceso de recolección, cuarteo y molienda correspondiente. También se puede realizar esta determinación en composta.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestra de basura o composta, mínimo 50 g
- Matraz Erlenmeyer de 1 L conteniendo 450 mL de agua peptonada estéril al 0.1%
- Homogeneizador Waring Blendor estéril
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Matraz de 500 mL estéril
- 7 tubos de 18 x 150 mm conteniendo 9 mL exactos de agua de dilución estéril, cada uno
- 7 Pipetas de 1 mL estériles
- 20 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo 10 mL de caldo lactosado estéril de concentración sencilla, cada uno
- 20 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo 10 mL de caldo lactosa bilis verde brillante (LBVB ) estéril, cada uno
- 15 tubos de 18 x 150 mm con campana Durham, conteniendo 10 mL de caldo *Escherichia coli* (E.C.) estéril, cada uno
- 2 Cajas de petri conteniendo agar endo estéril
- 5 Tubos de 18 x 150 mm conteniendo agar nutritivo inclinado estéril

- Colorantes para tinción de Gram
- Asa bacteriológica
- Gradillas para tubos de 18 x 150 y de 13 x 100 mm
- Agitador de tubos Vortex
- Incubadora a 35 °C
- Baño incubador fecal a una temperatura constante de 44.5 °C
- Aceite de inmersión
- 5 Tubos de 13 x 100 mm conteniendo medio de SIM estéril
- 5 Tubos de 13 x 100 mm conteniendo medio de MR-VP estéril
- 5 Tubos de 13 x 100 mm conteniendo medio de Simmons estéril
- Reactivos para ensayos bioquímicos
- Microscopio

## IV. TÉCNICA

### PRUEBA PRESUNTIVA

1. Pesar 50 g de muestra (basura cruda o composta).
2. Agregar 450 mL exactos de agua peptonada estéril al 0.1% para obtener una dilución de $10^{-1}$.
3. Llevar la muestra diluida al homogeneizador Waring Blendor estéril.
4. Agitar durante 3 minutos a velocidad máxima (8,000 rpm).
5. Vaciar el homogeneizado en un matraz estéril y etiquetar.
6. Preparar 7 tubos de 18 x 150 mm con 9 mL de agua de dilución estéril.
7. Tomar una alícuota de 1 mL del homogeneizado con una pipeta estéril y llevarlo a uno de los tubos para obtener una dilución de $10^{-2}$.
8. Agitar el tubo y tomar alícuota de 1 mL con otra pipeta estéril y llevarlo a otro tubo para obtener dilución de $10^{-3}$.
9. Proceder de la misma manera hasta obtener una dilución de $10^{-4}$ o hasta donde sea necesario.
10. Inocular asépticamente con 1 mL de muestra por quintuplicado, tubos de fermentación conteniendo caldo lactosado o caldo lauril triptosa, a partir de las últimas 4 diluciones.

11. Incubar por 24 horas a 35 °C.

12. Observar turbidez y producción de gas:

**INTERPRETACIÓN:**

**Después de 24 horas de incubación:**

- **Producción de turbidez y gas:**

**Prueba presuntiva positiva.**

Efectuar prueba confirmativa para todos los tubos positivos.

- **Ausencia de gas o producción de gas dudosa:**

Incubación adicional por 24 horas más (Total 48 horas).

**Después de 48 horas de incubación:**

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

  Prueba presuntiva positiva, por lo tanto, Efectuar prueba confirmativa para todos los tubos positivos.

- **Ausencia de gas para todos los tubos aun cuando haya turbidez:**

Prueba presuntiva negativa, por lo tanto, **GRUPO COLIFORME AUSENTE.**

**PRUEBA CONFIRMATIVA PARA COLIFORMES TOTALES**

1. Por cada tubo positivo durante la prueba presuntiva, inocular asépticamente con 3 asadas un tubo de fermentación conteniendo caldo LBVB.

2. Incubar 48 horas a 35 °C.

3. Observar turbidez y producción de gas dentro de la campana Durham.

**NOTA:**

Si a las 24 h de incubación todos los tubos dieran positivos, se da por terminado el análisis y se procede a hacer los cálculos de NMP.

**INTERPRETACIÓN:**

- **Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aún cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **negativos**.

- **Si en los tubos se observa presencia de turbidez y gas:**

  Se consideran **positivos.**

  Establecer el código y calcular el número más probable usando la Tabla 17.1

- **Si todos los tubos dan negativos o todos dan positivos:**

  Con base en los grados de dilución analizados, considerar la necesidad de repetir el análisis a partir de grados de dilución menores (mayores volúmenes de muestra) o mayores (menores volúmenes de muestra), respectivamente.

**PRUEBA CONFIRMATIVA PARA COLIFORMES FECALES.**

1. Por cada tubo positivo durante la prueba presuntiva, inocular asépticamente con 3 asadas un tubo de fermentación conteniendo caldo EC.

2. Incubar en baño de agua durante 24 horas a 44.5°C.

3. Observar turbidez y producción de gas dentro de la campana Durham.

**INTERPRETACIÓN:**

- **Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aún cuando se observe turbidez:**

  Se consideran **negativos**.

- **Si en los tubos se observa presencia de turbidez y gas:**

  Se consideran **positivos.**

  Establecer el código y calcular el número más probable usando la Tabla 17.1

- **Si todos los tubos dan negativos ó todos dan positivos:**

  Con base en los grados de dilución analizados, considerar la necesidad de repetir el análisis a partir de grados de dilución menores (mayores volúmenes de muestra) o mayores (menores volúmenes de muestra), respectivamente.

## DIFERENCIACIÓN DE COLIFORMES

1. A partir de tubos positivos con prueba confirmativa, inocular con el asa bacteriológica en condiciones asépticas sobre agar Endo-C, con la técnica de dilución por estría con el objeto de obtener colonias aisladas.

2. Incubar durante 24 horas a 35 °C.

3. Observar el desarrollo. Los coliformes forman colonias rojas sobre agar Endo-C. Las colonias de *Escherichia coli* muestran además, brillo metálico verdoso.

4. Tomar material de las colonias de coliformes características que estén aisladas y sembrar en cada caso en un tubo con agar inclinado estéril.

5. Incubar durante 24 horas a 35°C.

6. A partir de los cultivos de agar inclinado, preparar frotis, teñirlos al Gram y examinar al microscopio:

   Si se observan solamente bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, se confirma la pureza de los cultivos.

7. A partir de cada uno de los cultivos puros, inocular los siguientes medios: SIM, MR-VP y Citrato de Simmons, para efectuar las reacciones del IMVyC:

   **I** = Indol.
   **M** = Rojo de Metilo.
   **V** = Voges Proskauer.
   **y** = Solo para dar eufonía.
   **C** = Citrato, como única fuente de carbono.

8. Incubar a 35 °C durante 24 horas.

9. Realizar los siguientes ensayos bioquímicos:

**INDOL:**

Cubrir el cultivo en medio de SIM con aproximadamente 5 mm de espesor con el reactivo de Kovac y dejar reposar durante 2 minutos.

**Reacción positiva:** Capa reactiva color cereza.

**Reacción negativa:** Capa reactiva **NO** rojo cereza.

**ROJO DE METILO:**

Añadir 5 gotas de solución indicadora de rojo de metilo a 5 mL de cultivo (MR-VP).

**Reacción positiva:** Inequívoco color rojo.

**Reacción negativa:** Inequívoco color amarillo.

La aparición de un tono de color intermedio permite deducir con gran probabilidad la **existencia de un cultivo impuro.**

**VOGES PROSKAUER:**

A 1 mL de cultivo (MR-VP), añadir 0.6 mL de solución de alfa-naftol al 5% y 0.2 mL de solución de KOH al 40%. Si la reacción no da positiva dentro de los primeros 10 minutos de reposo, leer la reacción después de 2-4 horas.

**Reacción positiva:**

Formación de un anillo de color rojo ladrillo o rojo carmín en la superficie del medio el cual va bajando poco a poco a través del cultivo.

**Reacción negativa:**

Ausencia de coloración roja.

**CITRATO:**

Observar el cultivo en el medio de Simmons.

**Reacción positiva:**

Crecimiento y en la mayoría de los casos vire del color verde del medio a verde azulado ó totalmente azul.

**Reacción negativa:**

Sin crecimiento.

10. Con base a los resultados, consultar las Tablas bioquímicas correspondientes para la identificación de los coliformes.

## V. CUESTIONARIO

1. ¿Qué importancia tiene el análisis microbiológico de los desechos sólidos?

2. ¿Que otro tipo de microorganismos se pueden identificar en los desechos sólidos?

3. ¿Qué relación tiene la investigación de coliformes en los desechos sólidos con la presencia de enterobacterias patógenas?

4. ¿Qué papel desempeñan los microorganismos en el proceso de obtención de composta?

5. Mencionar dos aplicaciones de la composta.

# PRÁCTICA Núm. 23

# DETERMINACIÓN DE BACTERIAS SULFATORREDUCTORAS EN AGUA

## I. OBJETIVO

Demostrar la presencia de bacterias sulfatorreductoras en agua, por el método del número más probable (NMP).

## II. INTRODUCCIÓN

La corrosión en general es un fenómeno de destrucción de los materiales de construcción, principalmente de los metales, causando un proceso de óxido-reducción.

Existen muchas causas de la corrosión. Una de ellas es la corrosión microbiológica, la cual ocurre como resultado directo o indirecto de la actividad de los organismos vivos. Los microorganismos productores de la corrosión pueden ser hongos, algas y bacterias.

Estas últimas se clasifican en aerobias (ferrobacterias y sulfobacterias) y anaerobias (sulfatorreductoras).

La corrosión microbiológica puede ser representada por los siguientes tipos de fenómenos:

1) Producción de metabolitos ácidos. Los microorganismos pueden excretar ácidos orgánicos y/o inorgánicos.

2) Corrosión debida a la producción de celdas de aireación diferencial. Estas celdas se presentan cuando el metal recibe más oxígeno en unas zonas que en otras, causando la oxidación de las zonas menos aireadas.

3) Destrucción de cubiertas protectoras sobre el metal, que son metabolizadas por los microorganismos.

4) Consumo de sustancias inhibidoras de la corrosión y facilitando de esa forma la acción de iones agresivos presentes en el medio o producidos por el metabolismo microbiano.

El agua siempre contiene bacterias, aún cuando su suministro se hace a través de modernas redes de distribución.

Existen ciertas bacterias que pueden soportar dosis muy fuertes de cloro, como es el caso de las sulfatorreductoras, que no sufren alteraciones al estar en contacto con concentraciones de 20 ppm de dicho elemento.

El agua destinada al uso doméstico contiene menor cantidad de microorganismos que las aguas de extracción industrial, sin embargo no es extraño encontrar bacterias de corrosión en agua potable, las cuales pueden provenir del sitio de bombeo o de las tuberías mismas en el momento de la instalación de éstas.

Las bacterias sulfatorreductoras pertenecen a la única Familia *Spirillaceae* cuyo representante es *Desulfovibrio desulfuricans.*

Se les encontrará bajo las capas de herrumbre que se hallan en contacto con el metal debido a que son anaerobias obligadas. Estas bacterias transforman los sulfatos en ácido sulfhídrico, el cual se combinará con las sales ferrosas para dar un sulfuro negro.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestra de agua (100 mL), de consumo "clorada", natural "limpia" o residual
- 5 Tubos de 20 x 200 mm conteniendo 20 mL cada uno de medio para bacterias sulfato-reductoras (Medio de Baars)
- 10 Tubos de 18 x 150 mm conteniendo cada uno 10 mL de medio para bacterias sulfatorreductoras
- 1 Tubo conteniendo 10 mL de parafina o vaselina estéril
- 1 Pipeta graduada de 10 mL, estéril
- 2 Pipetas graduadas de 1 mL, estéril
- Gradilla para tubos de 18 x 150 mm
- Gradilla para tubos de 20 x 200 mm
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor

## IV. TÉCNICA

1. Agitar vigorosamente la muestra para homogeneizar.

2. A partir de la muestra previamente homogeneizada y con pipeta estéril, tomar alícuotas de 10, 1.0 y 0.1 mL e inocular por quintuplicado, los tubos de 20 x 200 mm y 18 x 150 mm con medio para bacterias sulfatorreductoras.

**NOTA:**

Si se sospecha que el agua contiene elevada carga bacteriana, proceder a preparar las diluciones correspondientes.

3. Añadir una capa de vaselina o parafina estéril de unos 3 mm de espesor para conseguir condiciones de anaerobiosis.

4. Incubar durante 7 días a 37 °C.

5. Observar si hay formación de un precipitado negro en el fondo o en las paredes del tubo, lo cual indicará la presencia de bacterias sulfatorreductoras.

## CÁLCULO Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS:

De acuerdo a los tubos positivos, establecer el código y leer el resultado en la Tabla 17.1 del NMP.

El resultado es directo cuando se manejan los volúmenes de 10, 1.0 y 0.1mL.

Si fue necesario utilizar diluciones, el resultado de la Tabla se divide entre la dilución promedio al igual que se hizo para el cálculo del NMP de coliformes totales y fecales.

**Los resultados se expresarán así:**

NMP de bacterias sulfatorreductoras: _____/100 mL

## V. CUESTIONARIO

1. Consultar la composición de 2 medios para bacterias sulfatorreductoras.

2. Explicar el mecanismo de la corrosión biológica.

3. Mencionar 3 especies de *Desulfovibrio.*

4. Mencionar otros géneros bacterianos que produzcan corrosión en metales.

5. Además de agua, ¿En qué otro ambiente se pueden encontrar las bacterias sulfatorreductoras?

# PRÁCTICA Núm. 24

# INVESTIGACIÓN DE PROTOZOOS Y HELMINTOS PATÓGENOS EN AGUA

## I. OBJETIVO

Investigar la presencia de protozoos y helmintos, parásitos intestinales, en diferentes tipos de agua: de consumo humano, destinadas a riego agrícola y aguas estancadas.

## II. INTRODUCCIÓN

Agentes parasitarios que pueden ser objeto de investigación en aguas de consumo y riego agrícola son algunos protozoarios como: *Entamoeba histolytica, Giardia lamblia, Cryptosporidium spp.* y algunos helmintos como: *Ascaris lumbricoides, Trichiuris trichiura, Taenia solium, Enterobius vermicularis,* etc.

En aguas estancadas (naturales, piscinas, sistemas de calefacción y refrigeración, etc.), pueden vivir facultativamente en forma parásita: amibas de vida libre como *Acanthamoeba sp.* y *Naegleria sp.* que suelen provocar inflamaciones de mucosas.

Las técnicas de investigación de protozoos parásitos intestinales están basadas en la detección del parásito tras la filtración de grandes volúmenes de agua.

Los quistes del protozoo se identifican por examen microscópico del material retenido en el filtro, directamente o previa concentración, o tras realizar técnicas de inmunofluorescencia mediante la utilización de anticuerpos monoclonales como es el caso de la detección de *Cryptosporidium spp.* en el agua de consumo humano.

La investigación de amibas de vida libre, "amebas limax", se realiza habitualmente mediante cultivo "*in vitro*" en medios apropiados P.ej. el Medio de Chang. De acuerdo a Chang, pequeñas amibas de vida libre crecen bien sobre agar BST (Buffered Sucrose Tryptose), en asociación con bacterias Gram negativas.

La primera cepa patógena de *Naegleria fowleri* fue aislada por Lubor Cerva en junio de 1968 (Medio de Cerva). Cerva usó cajas Petri con 1% de Difco Bacto Agar, al cual añadió una suspensión de cultivo de *Aerobacter aerogenes* muerto térmicamente. Las cajas de Petri fueron colocadas en forma invertida en bolsas de plástico cerradas herméticamente e incubadas a 37 °C.

Cerva desarrolló también un medio líquido axénico compuesto de 2% de Bacto Casitone (Difco) en agua destilada con 10% de suero de caballo fresco y 0.5% de cloruro de sodio. La utilización de los medios depende del propósito de estudio.

**Identificación:**

Esta se llevará al cabo considerando la morfología.

**Capacidad patógena:**

Esta se determinará por el medio de la inoculación animal o cultivo celular.

## III. MATERIAL Y SUBSTANCIAS

- Muestras de agua de diverso origen. (Mínimo 2 L)
- Equipo de filtración Millipore estéril
- Bomba de vacío
- Centrífuga de alta velocidad
- Tubos para centrífuga
- Microscopio
- Mechero Bunsen
- Cerillos o encendedor
- Gradilla
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Pipetas Pasteur
- Cajas Petri conteniendo medio BST agar (Apéndice A)
- Suspensión de bacteria Gram negativa
- Solución sobresaturada de Sulfato de Zinc (Apéndice C)

## IV. TÉCNICA

### PARTE A

### PARÁSITOS INTESTINALES: PROTOZOOS Y HELMINTOS

1. Filtrar la muestra a través de membrana millipore. Si la muestra es de agua de consumo humano se deben filtrar de 100 a 400 L y si es de agua estancada natural ó para riego agrícola, por lo menos 2 L.

Si se trata de estas últimas se recomienda filtrar previamente en condiciones de esterilidad a través de gasa y utilizando un embudo de filtración rápida, con el objeto de eliminar las partes gruesas que pudiera contener el agua y facilitar la filtración a través de la membrana millipore.

2. Retirar el filtro, trozarlo, colocarlo en un tubo de centrífuga y lavarlo con agua destilada.

3. Centrifugar a 2300 rpm durante 3 minutos.

4. Decantar y agregar nuevamente agua destilada con objeto de efectuar otro lavado.

5. Centrifugar a 2300 rpm durante 3 minutos.

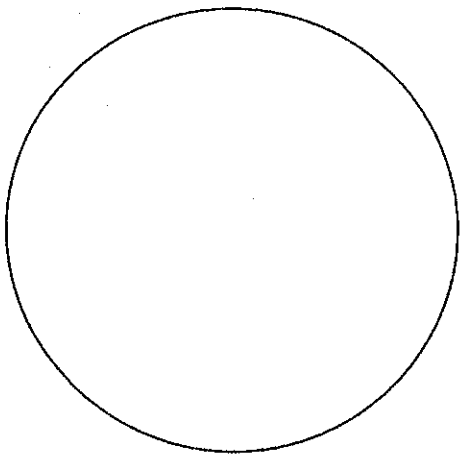
6. Repetir los pasos 4 y 5 dos o tres veces más hasta que el sobrenadante resulte transparente.

7. Decantar y añadir una solución sobresaturada de sulfato de zinc (Técnica de Faust), y volver a centrifugar en las mismas condiciones.

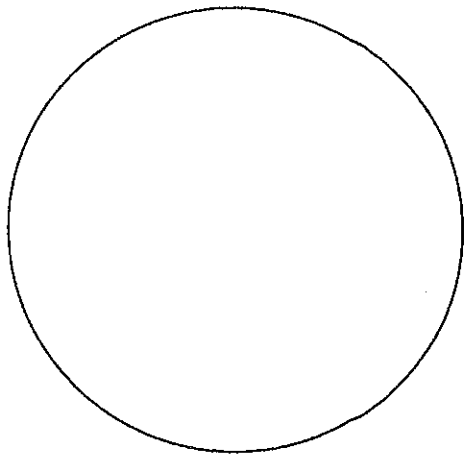
8. Recoger una gota del sobrenadante con una pipeta Pasteur y colocarla sobre un portaobjetos, colocar un cubreobjetos sobre la gota y observar al microscopio primero con el objetivo seco débil (10X) y posteriormente con el seco fuerte (40X) los quistes de Protozoos y huevecillos de Helmintos presentes en la muestra.

9. Otra forma de recoger el sobrenadante es, después de la última centrifugación, colocar sobre el tubo un cubreobjetos tocando el menisco, se retira, se coloca sobre el portaobjetos y se observa al microscopio.

10. Dibujar lo observado.



***Seco fuerte***



***Seco débil***

11. Comparar los quistes y huevecillos observados, con los esquemas y fotografías proporcionados por el instructor, para lograr su identificación (Figuras 24.1-24.2).

**PARTE B**

**AMIBAS DE VIDA LIBRE: *Acanthamoeba sp.* y *Naegleria sp***

1. Filtrar un litro de agua en filtro de membrana de 1-2 $\mu$.

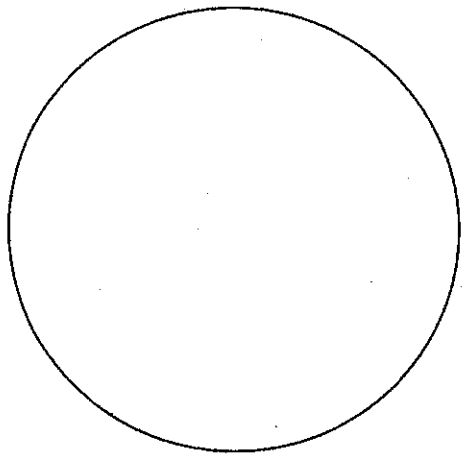
2. Sembrar el filtro en el medio BST ó en algún otro medio adecuado añadido de algún germen para alimentar las amibas. Se pueden mantener en medios axénicos, pero el crecimiento disminuye su capacidad invasora.

   También pueden añadirse antibióticos para reducir la contaminación bacteriana.

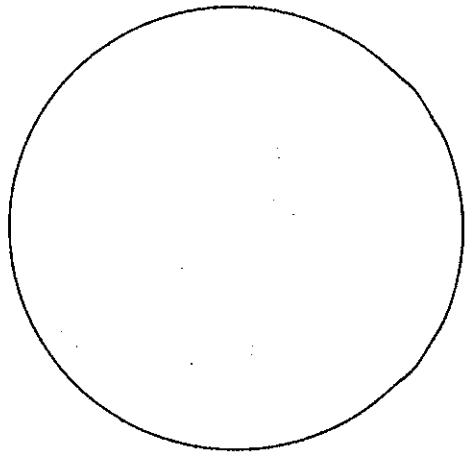
3. Incubar a 37 °C por 24 h.

4. Observar al microscopio para examinar su morfología.

5. Dibujar lo observado.



***Seco fuerte***



***Seco débil***

***Naegleria sp.*** posee quistes redondos y los pseudópodos lobulados. Los trofozoítos se mueven muy rápidamente.

***Acanthamoeba sp.*** tiene los pseudópodos acantopedios (más finos) y los trofozoítos se mueven más lentamente, el quiste tiene aspecto poligonal (Figura 24.3).

## V. CUESTIONARIO

1. Dibujar 3 quistes y 3 huevecillos diferentes a los observados en la práctica.

2. ¿Cuál es el fundamento de la Técnica de Faust?

3. Consultar otras técnicas para la investigación de Protozoos y Helmintos.

4. ¿Qué importancia tiene la presencia de Helmintos en agua destinada al riego agrícola?

5. De acuerdo a la normatividad mexicana vigente ¿Cuál es el límite de Helmintos permisible en el agua destinada al riego agrícola?

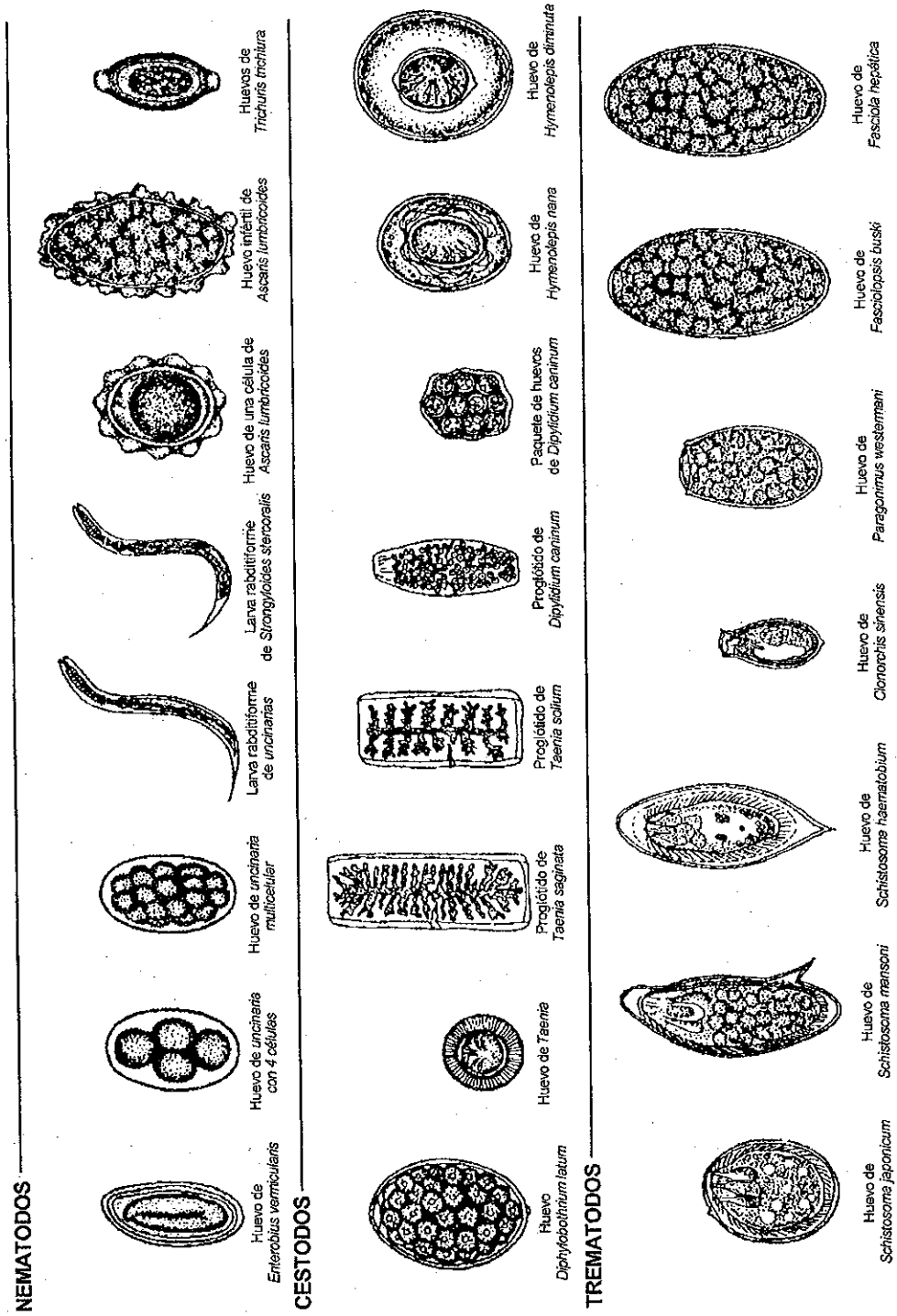



**Figura 24.1 Estadíos de helmintos intestinales**

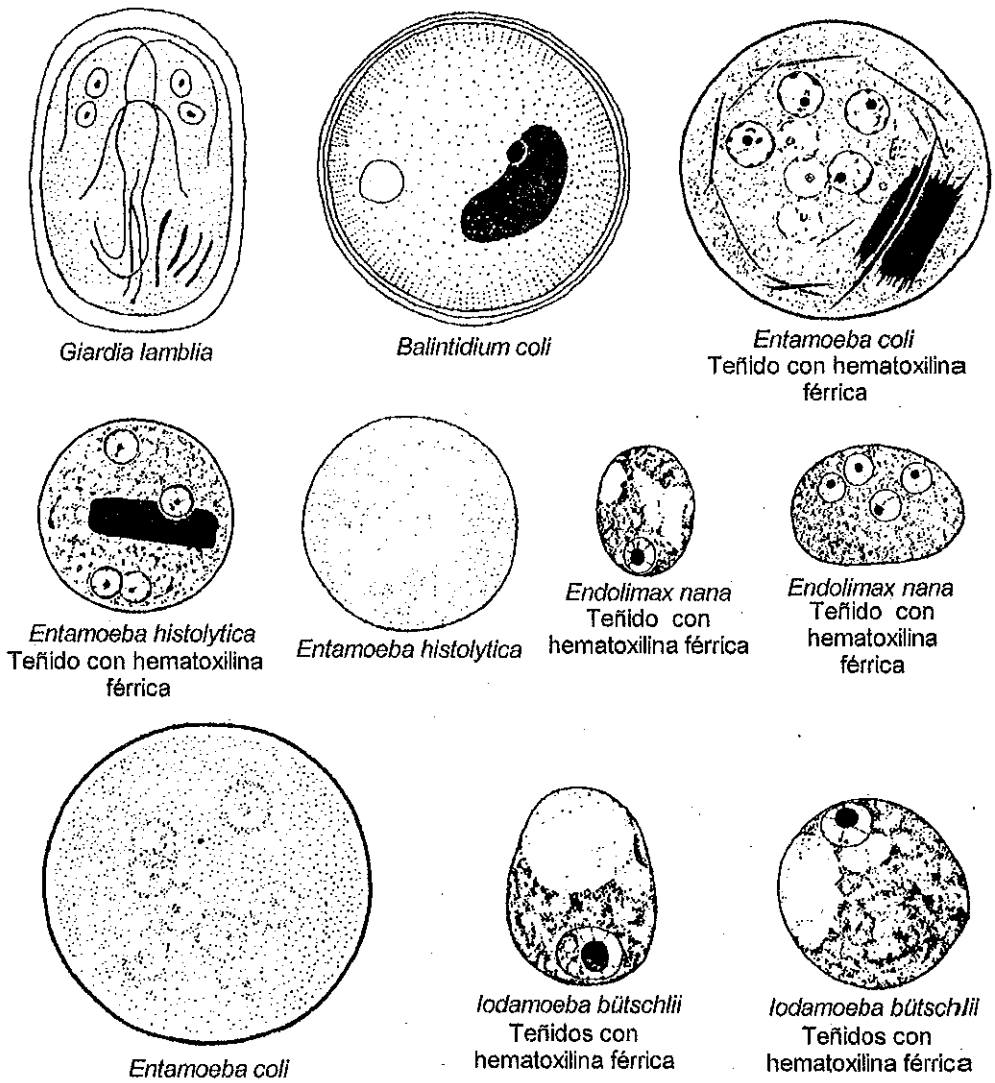



**Figura 24.2 Quistes de protozoarios parásitos intestinales**

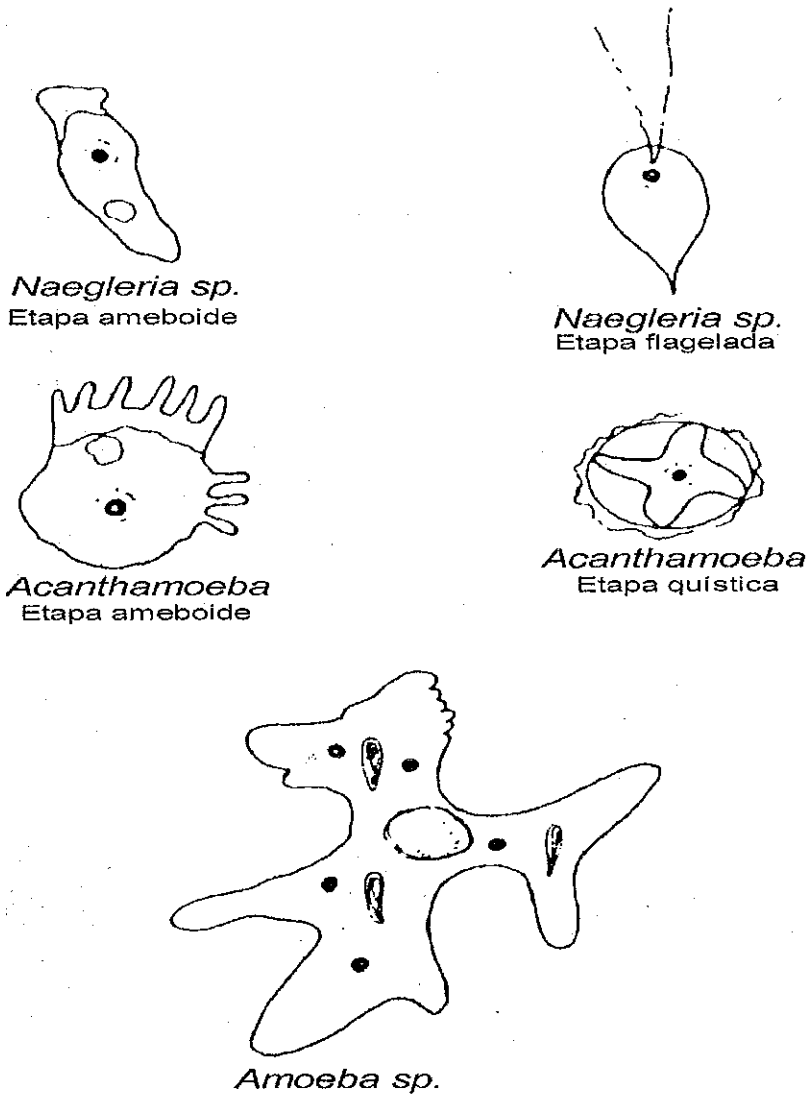



**Figura 24.3 Amibas de vida libre**

# APÉNDICE A

## COMPOSICIÓN Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

1. **AGAR NUTRITIVO. Bacto Nutrient Agar (Difco)**

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne..... | 3 | g |
| Peptona..... | 5 | g |
| Agar..... | 15 | g |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 23 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121°C).
4) Distribuir en la forma deseada.

2. **CALDO NUTRITIVO. Bacto Nutrient Broth (Difco)**

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne..... | 3 | g |
| Peptona..... | 5 | g |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver 8 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Distribuir en tubos.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

3. **CALDO ROJO DE FENOL CARBOHIDRATOS*. Bacto Phenol Red Carbohydrate* Broths (Difco)**

*Dextrosa, lactosa, maltosa o algún otro, para realizar pruebas de fermentación de carbohidratos.

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona proteasa No.3 Difco | 10 | g |
| Extracto de carne | 1 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Rojo de fenol | 0.018 | g |
| Carbohidrato deseado* | 5 | g |

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

**Base de Caldo Rojo de Fenol. Bacto Phenol Red Broth Base. (Difco).**

1) Suspender 16 g de Bacto Base de Caldo Rojo de Fenol y 5 a 10 g (0.5 a 1.0%) del carbohidrato deseado en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Agitar para disolver completamente.
3) Distribuir en tubos de ensayo que contengan campana Durham.
4) Esterilizar en autoclave a 110 °C durante 10 minutos o por filtración y en condiciones asépticas distribuir el medio en tubos estériles, con campana Durham.

   Si se prefiere, el medio basal puede ser preparado sin el carbohidrato y añadir posteriormente una solución del carbohidrato deseado esterilizada por filtración o en autoclave al medio basal previamente esterilizado y enfriado.

**Caldos Rojo de Fenol Carbohidratos. Bacto Phenol Red Carbohydrate Broths. (Difco)**

1) Suspender 21 g del caldo carbohidrato rojo de fenol apropiado en 1 litro de agua destilada o desmineralizada y agitar para disolver completamente.
2) Distribuir en tubos conteniendo campana Durham.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 4. AGAR ALMIDÓN. Bacto Starch Agar

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne..... | 3 | g |
| Almidón soluble, Difco..... | 10 | g |
| Agar..... | 12 | g |

pH final: 7.5 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 25 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
4) Distribuir en la forma deseada.

## 5. AGAR GELATINA. Bacto Nutrient Gelatin

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne..... | 3 | g |
| Peptona..... | 5 | g |
| Gelatina..... | 120 | g |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver 8 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Distribuir en tubos.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 6. CALDO NITRATO. Bacto Nitrate Broth (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Peptona | 5 | g |
| Nitrato de potasio | 1 | g |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver la cantidad apropiada en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Distribuir en tubos.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 7. CALDO UREA. Bacto Urea Broth

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de levadura | 0.1 | g |
| Fosfato de potasio, monobásico | 9.1 | g |
| Fosfato de potasio, dibásico | 9.5 | g |
| Urea, Difco | 20 | g |
| Rojo de fenol | 0.01 | g |

pH final: 6.8 ± 0.1 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Permitir que el medio vuelva a la temperatura ambiente antes de abrir el frasco.
2) Suspender 38.7 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
3) Mezclar bien para disolver completamente.
4) Esterilizar por filtración y distribuir asépticamente en pequeños tubos de ensayo estériles (14x125 mm ó equivalente).

No hervir o autoclavear el medio.

## 8. AGAR TRIPLE AZÚCAR-HIERRO. Bacto Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Extracto de levadura | 3 | g |
| Peptona | 15 | g |
| Peptona proteosa, Difco | 5 | g |
| Dextrosa | 1 | g |
| Lactosa | 10 | g |
| Sacarosa | 10 | g |
| Sulfato ferroso | 0.2 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Tiosulfato de sodio | 0.3 | g |
| Agar | 12 | g |
| Rojo de fenol | 0.024 | g |

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 65 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Distribuir en tubos.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
5) Dejar solidificar en forma inclinada procurando que en el fondo del tubo quede una buena cantidad de agar.

## 9. MEDIO DE SIM. BACTO SIM MEDIUM. (Difco)

Recomendado para determinar: Producción de sulfuro de hidrógeno, formación de indol y motilidad.

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Peptona | 30 | g |
| Hierro peptonizado, Difco | 0.2 | g |
| Tiosulfato de sodio | 0.025 | g |
| Agar | 3 | g |

pH final: 7.3 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 36 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Distribuir en tubos a una profundidad de aproximadamente 3 pulgadas ó aproximadamente 15 mL para tubos de tamaño estándar.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
5) Dejar solidificar el medio en posición vertical.

## 10. AGAR CITRATO DE SIMMONS. BACTO SIMMONS CITRATE AGAR (Difco).

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Sulfato de magnesio | 0.2 | g |
| Difosfato de amonio | 1 | g |
| Fosfato dipotásico | 1 | g |
| Citrato de sodio | 2 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Azul de bromotimol | 0.08 | g |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 24.2 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Distribuir en tubos.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
5) Inclinar los tubos y dejar solidificar.

El medio debe tener un color verde esmeralda.

## 11. CALDO RM - VP. BACTO MR – VP MEDIUM. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona amortiguada | 7 | g |
| Fosfato dipotásico | 5 | g |
| Dextrosa | 5 | g |

pH final: 6.9 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver 17 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Distribuir en tubos, en volúmenes de 10 mL.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 12. AGAR ANAERÓBICO. BACTO ANAEROBIC AGAR. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Casitona | 20 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Dextrosa | 10 | g |
| Agar | 20 | g |
| Tioglicolato de sodio, Difco | 2 | g |
| Sulfoxilato formaldehído de sodio | 1 | g |
| Azul de metileno | 0.002 | g |

pH final: 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 58 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Distribuir en la forma requerida.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 13. MEDIO FLUIDO DE TIOGLICOLATO. FLUID THIOGLYCOLLATE MEDIUM

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de levadura | 5 | g |
| Casitona | 15 | g |
| Dextrosa | 5.5 | g |
| Cloruro de sodio | 2.5 | g |
| L-cisteína, Difco | 0.5 | g |
| Tioglicolato de sodio | 0.5 | g |
| Agar | 0.75 | g |
| Resarzurina | 0.001 | g |

pH final: 7.1 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 29.8 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Distribuir en tubos.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 14. AGAR DEXTROSA SABOURAUD. SABOURAUD DEXTROSA AGAR. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Neopeptona, Difco | 10 | g |
| Dextrosa | 40 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 5.6 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 65 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Distribuir en la forma deseada.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

No recalentar para evitar el ablandamiento del medio.

## 15. AGAR CUENTA ESTÁNDAR. BACTO PLATE COUNT AGAR. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Triptona | 5 | g |
| Extracto de levadura | 2.5 | g |
| Dextrosa (glucosa) | 1 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 23.5 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 16. CALDO LACTOSADO. BACTO LACTOSE BROTH. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Peptona | 5 | g |
| Lactosa | 5 | g |

pH final: 6.9 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 13 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar levemente hasta completa disolución.
3) Distribuir en tubos de 18 x 150 mm si se trata de concentración sencilla y de 20 x 180 mm si se trata de doble concentración.
4) Colocar un vial de fermentación (campana Durham) invertido en cada tubo.
5) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
6) Antes de abrir el autoclave, dejar que la temperatura baje a 75 °C para evitar atrapamiento de burbujas de aire en los viales invertidos.

## 17. CALDO LACTOSA BILIS VERDE BRILLANTE (LBVB). BACTO BRILLIANT GREEN BILE 2%. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona | 10 | g |
| Bilis de buey | 20 | g |
| Lactosa | 10 | g |
| Verde brillante | 0.0133 | g |

pH final: 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 40 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar levemente hasta completa disolución.
3) Distribuir la cantidad requerida en tubos de ensayo.
4) Colocar un vial de fermentación (campana Durham) invertido en cada tubo.

5) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
6) Antes de abrir el autoclave, dejar que la temperatura baje a 75 °C para evitar atrapamiento de burbujas de aire en los viales invertidos.

## 18. CALDO EC (*Escherichia coli*). BACTO EC MEDIUM (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Triptosa | 20 | g |
| Lactosa | 5 | g |
| Sales biliares No. 3 | 1.5 | g |
| Fosfato dipotásico | 4 | g |
| Fosfato monopotásico | 1.5 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |

pH final: 6.9 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 37 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar levemente hasta completa disolución.
3) Distribuir en tubos.
4) Colocar un vial de fermentación (campana Durham) invertido en cada tubo.
5) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
6) Antes de abrir el autoclave, dejar que la temperatura baje a 75 °C para evitar atrapamiento de burbujas de aire en los viales invertidos.

## 19. AGAR ENDO. BACTO ENDO AGAR. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona | 10 | g |
| Lactosa | 10 | g |
| Fosfato dipotásico | 3.5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Fucsina básica | 0.5 | g |
| Sulfito de sodio | 2.5 | g |

pH final: 7.5 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 41.5 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
4) Al sacar el medio del autoclave, agitar ligeramente el matraz para distribuir uniformemente el precipitado floculante característico que se forma durante el calentamiento.

Si el Agar Endo es inoculado el mismo día, puede ser usado sin esterilizar en autoclave. Bajo estas condiciones el medio necesita ser calentado solamente a ebullición para disolver completamente antes de vaciarlo en las placas.

## 20. AGAR ENDO LES. BACTO m ENDO AGAR LES (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de levadura | 1.2 | g |
| Peptona de caseína | 3.7 | g |
| Tiopeptona | 3.7 | g |
| Triptosa | 7.5 | g |
| Lactosa | 9.4 | g |
| Fosfato de potasio, dibásico | 3.3 | g |
| Fosfato de potasio, monobásico | 1 | g |
| Cloruro de sodio | 3.7 | g |
| Desoxicolato de sodio | 0.1 | g |
| Lauril sulfato de sodio | 0.05 | g |
| Sulfito de sodio | 1.6 | g |
| Fucsina básica | 0.8 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 51 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada a la cual han sido añadidos 20 mL de alcohol etílico.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Enfriar a 45-50 °C.
4) Distribuir 4 mL en cajas Petri de 50-60 mm y dejar solidificar.

**NOTAS:**

Si se usan cajas Petri más grandes distribuir suficiente medio para dar una profundidad equivalente a las de las cajas de 60 mm.

El medio preparado presenta un color rosa, ligeramente opalescente, puede tener un precipitado.

## 21. AGAR m-FC. BACTO m-FC MEDIUM (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Triptosa | 10 | g |
| Extracto de levadura | 3 | g |
| Peptona proteosa No. 3, Difco | 5 | g |
| Lactosa | 12.5 | g |
| Sales biliares No. 3 | 1.5 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Agar | 15 | g |
| Azul de anilina | 0.1 | g |

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 52 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Añadir 10 mL de ácido rosólico al 1% en una solución de NaOH 0.2N y continuar calentando por 1 minuto.
4) Enfriar a 50 °C, vaciar en cajas de Petri y dejar solidificar.

## 22. AGAR KF-ESTREPTOCOCOS. BACTO KF STREPTOCOCCUS AGAR (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona proteosa No. 3, Difco | 10 | g |
| Extracto de levadura | 10 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Glicerofosfato de sodio | 10 | g |
| Maltosa | 20 | g |
| Lactosa | 1 | g |
| Azida de sodio | 0.4 | g |
| Púrpura de bromo cresol | 0.015 | g |
| Agar | 20 | g |

pH final: 7.2 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 76.4 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada fría y calentar a ebullición hasta completa disolución.
2) Continuar calentando por 5 minutos más.
3) Distribuir en cantidades de 100 mL o como se desee en matraces.
4) No esterilizar en autoclave. Recalentar bajará el pH y el medio será menos productivo.
5) Enfriar a 50 °C y añadir 1 mL de una solución de TTC al 1% (cloruro de trifeniltetrazolium al 1%) por cada 100 mL de medio estéril.
6) Mezclar para obtener una distribución uniforme del TTC en el medio.
7) Dejar enfriar a 45 °C y vaciar en placas.

## 23. AGAR SULFITO-POLIMIXINA-SULFADIAZINA (SPS). SPS AGAR (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Triptona | 15 | g |
| Extracto de levadura | 10 | g |
| Citrato férrico | 0.5 | g |
| Sulfito de sodio | 0.5 | g |
| Tioglicolato de sodio | 0.1 | g |

| | | |
|---|---|---|
| Monooleato sorbitán | 0.05 | g |
| Sulfadiazina | 0.12 | g |
| Sulfato de polimixina B | 0.01 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 41 g en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición para disolver completamente.
3) Distribuir en tubos ó en cajas según se requiera.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 24. AGAR INFUSIÓN DE CEREBRO-CORAZÓN. (BHI-Agar)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Infusión de cerebro | 12.5 | g |
| Infusión de corazón | 5 | g |
| Peptona proteosa | 10 | g |
| Glucosa | 2 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Fosfato de sodio, monobásico | 2.5 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 7.4 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender la cantidad indicada del medio en un litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 25. AGAR DE BILIS Y ESCULINA (BEA). BACTO BILE ESCULIN AGAR. (Difco)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Peptona | 5 | g |
| Bilis de buey | 40 | g |
| Esculina | 1 | g |
| Citrato férrico | 0.5 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 6.6 ± 0.2 a 25°C.

**Método de preparación:**

1) Suspender la cantidad apropiada en 1 litro de agua destilada o desmineralizada.
2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Distribuir en tubos o matraces según se requiera.
4) Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C). Recalentar puede causar oscurecimiento del medio.
5) Enfriar a 50-55 °C y vaciar en cajas Petri estériles. Si es en tubo, dejar solidificar el medio en posición inclinada.

## 26. AGAR TRIPTONA EXTRACTO DE GLUCOSA. BACTO TRYPTONE GLUCOSE EXTRACT AGAR

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de carne | 3 | g |
| Triptona | 5 | g |
| Dextrosa (glucosa) | 1 | g |
| Agar | 15 | g |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Suspender 24 g en un litro de agua destilada o desmineralizada.

2) Calentar a ebullición hasta completa disolución.
3) Esterilizar en autoclave por 5 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 27. CALDO GLUCOSA-FOSFATO-AZIDA (Rothe)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona bacteriológica | 20 | g |
| Glucosa | 5 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Fosfato monobásico de sodio | 2.7 | g |
| Fosfato dibásico de sodio | 2.7 | g |
| Azida de sodio | 0.2 | g |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver los componentes en agua destilada o desmineralizada. Si se requiere doble concentración disolver el doble de componentes.
2) Distribuir en tubos de 18 x 150 si el medio es de concentración simple y en tubos de 20 x 180 si es de doble concentración, en volúmenes de 10 mL.
3) Esterilizar en autoclave por 5 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 28. CALDO GLUCOSA-FOSFATO-AZIDA-ETIL-VIOLETA (Litsky)

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Peptona bacteriológica | 20 | g |
| Glucosa | 5 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Fosfato de sodio, monobásico | 2.7 | g |
| Fosfato de sodio, dibásico | 2.7 | g |
| Azida de sodio | 0.3 | g |
| Solución acuosa de etil-violeta 0.01% (p/v) | 5 | mL |

pH final: 6.8 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Disolver los componentes en agua destilada o desmineralizada. Si se requiere doble concentración disolver el doble de componentes.
2) Distribuir en tubos de 18 x 150 en volúmenes de 10 mL.
3) Esterilizar en autoclave por 5 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 29. MEDIO AXÉNICO DE CERVA

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Casitona (Difco) | 2 | g |
| Suero de ternera o caballo | 100 | mL |
| Penicilina | 500,000 | U |
| Estreptomicina | 50,000 | µg |
| Agua bidestilada | 900 | mL |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Mezclar los componentes.
2) Esterilizar por filtración.

## 30. MODIFICACIÓN DEL MEDIO DE CERVA PARA *Naegleria fowleri*

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Casitona (Difco) | 20 | g |
| Acido fólico | 2 | mg |
| Glucosa | 1 | g |
| Suero fetal de ternera (fluido) | 50 | mL |
| Penicilina | 500,000 | U |
| Estreptomicina | 50,000 | µg |
| Agua bidestilada | 950 | mL |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Mezclar los componentes.
2) Esterilizar por filtración.

**NOTA:**

Si se desea solidificar el medio agregarle 1% de Bacto agar, añadido de una suspensión de cultivo de *Aerobacter aerogenes* muerto térmicamente.

## 31. MEDIO DE E. Willaert PARA *Naegleria y Achantamoeba*

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Casitona (Difco) | 20 | g |
| Cloruro de sodio | 5 | g |
| Glucosa | 1 | g |
| Acido fólico | 2 | mg |
| Biotina | 20 | µg |
| Penicilina | 500,000 | U |
| Estreptomicina | 50,000 | µg |
| Agua bidestilada | 1000 | mL |

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

**Método de preparación:**

1) Mezclar los componentes.
2) Esterilizar por filtración.

## 32. MEDIO DE CHANG. BUFFERED SUCROSE TRIPTOSE AGAR (BST)

**Fórmula:**

BST Agar con adición de bacterias Gram negativas.

pH final: 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

## 33. MEDIO BASAL DE BOLD

Recomendado para algas de agua dulce, especialmente: *Chlorella sp., Volvox sp. y Scenedesmus sp.*

**Fórmula:**

- Soluciones patrones de macronutrientes.

| | | |
|---|---|---|
| Nitrato de sodio | 10 | g |
| Cloruro de calcio dihidratado | 1 | g |
| Sulfato de magnesio heptahidratado | 3 | g |
| Fosfato de potasio, dibásico | 7 | g |
| Fosfato de potasio, monobásico | 3 | g |
| Cloruro de sodio | 1 | g |

**Método de preparación:**

1) Disolver cada una de las sales en 400 mL de agua destilada o desmineralizada.
2) Almacenar las 6 soluciones en frascos color ámbar y en refrigeración.

- Soluciones patrón de micronutrientes.

| | | |
|---|---|---|
| Ácido etilendiamintetracético | 50 | g |
| Hidróxido de potasio | 31 | g |
| Agua | 1000 | mL |
| Ácido bórico | 11.42 | g |
| Agua destilada | 1000 | mL |

Sulfato de hierro heptahidratado.....
Agua acidificada.....1000 mL (1 mL de Acido Sulfúrico por cada litro de agua).

| | | |
|---|---|---|
| Sulfato de zinc heptahidratado | 8.82 | g |
| Cloruro de manganeso dihidratado | 1.44 | g |
| Trióxido de molibdeno | 0.71 | g |
| Sulfato de cobre pentahidratado | 1.57 | g |
| Nitrato de cobalto hexahidratado | 0.49 | g |
| Agua | 1000 | mL |

**Método de preparación:**

1) A 900 mL de agua destilada agregar 10 mL de cada una de las soluciones de macronutrientes y 1 mL de las soluciones de micronutrientes.
2) Ajustar el pH a 6.8-7.2
3) Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C)

## 34. MEDIO MET 44

Recomendado para el cultivo de diatomeas y dinoflagelados.

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

- Solución basal

| | | |
|---|---|---|
| Nitrato de sodio | 3.4 | mg |
| Fosfato de sodio, dibásico dodecahidratado | 0.925 | mg |
| Cloruro de manganeso tetrahidratado | 14.4 | µg |
| Silicato de sodio nonahidratado | 10.14 | mg |
| Sulfato ferroso heptahidratado | 60.0 | µg |
| Etilendiamintetracetato de sodio dihidratado | 0.803 | mg |
| Vitamina B12 * | 1 | mL |
| Biotina * | 1 | mL |
| Tiamina $HCl^+$ | 1 | mL |
| Agua destilada | 1000 | mL |

*(0.5 mg en 100 mL de agua)

**Método de preparación:**

1) En 800 mL de agua disolver una a una las tres primeras sales.
2) Disolver el silicato de sodio y el sulfato ferroso en 100 mL de agua, acidificar la solución con ácido sulfúrico y mezclarla con el resto del medio.
3) Disolver el etilendiamintetracetato de sodio en 100 mL de agua, acidificar con ácido clorhídrico y mezclar con el resto del medio.
4) Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).
5) Al medio estéril y en condiciones de asepsia agregar 1.0 mL de cada una de las soluciones de vitaminas previamente esterilizadas por filtración.

## 35. MEDIO ERD-SAHREIBER ENRIQUECIDO

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

| | | |
|---|---|---|
| Extracto de suelo | 3.4 | mL |
| Nitrato de sodio | 0.2 | g |
| Fosfato de sodio, dibásico dodecahidratado | 0.03 | g |
| Agua de la llave | 1000 | mL |

pH final 7.2

**Método de preparación: Para preparar el extracto de suelo**

1) Mezclar 1 litro de agua con 1 kilo de suelo y poner en autoclave durante 2 horas a 121 °C.
2) Filtrar y conservar el filtrado en refrigeración.
3) Para solidificar el medio, agregar agar al 1.5%.

## 36. MEDIO DE BAARS. Para Bacterias Sulfatorreductoras

**Fórmula:**

Ingredientes por litro:

| | | |
|---|---|---|
| Fosfato dipotásico | 0.5 | g |
| Cloruro de amonio | 1 | g |
| Sulfato de calcio | 1 | g |
| Sulfato de magnesio 7 $H_2O$ | 2 | g |
| Lactato de sodio al 70% | 5 | g |
| Agua de la llave | 1000 | mL |

**Método de preparación:**

1) Disolver y ajustar el pH entre 7 y 7.5
2) Esterilizar durante veinte minutos a 121 °C.
3) Preparar por separado una solución de sulfato ferroso y de amonio. 6 $H_2O$ al 1%, y esterilizar con vapor durante sesenta minutos por tres días seguidos.
4) Agregar 5 mL de esta solución a 100 mL del medio en el momento de empleo. El medio presenta un precipitado. Cultivar en anaerobiosis.

# APÉNDICE B

## PREPARACIÓN DE COLORANTES

## I. TINCIÓN SIMPLE

### a) Safranina.

Safranina..... 0.5 g
Agua destilada..... 100 mL

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el agua.

### b) Cristal violeta

Cristal violeta..... 1 g
Agua destilada..... 100 mL

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el agua.

### c) Azul de metileno

Azul de metileno..... 3 mL
Etanol de 96%..... 20 mL
Agua destilada..... 100 mL

**Preparación:**

- Disolver el colorante en alcohol.
- Agregar el agua y filtrar.

## II. TINCIÓN DE GRAM

### a) Cristal violeta y oxalato de amonio. (Reactivo de Hucker)

**Solución A:**

Cristal violeta (pureza del colorante de por lo menos, el 90%)..... 2 g
Etanol (95%)..... 20 mL

**Solución B:**

Oxalato de amonio..... 0.8 g
Agua destilada..... 80 mL

- Mezclar cada uno de los solutos en su disolvente respectivo.
- Dejar la solución de oxalato de amonio en reposo durante una noche o calentar ligeramente hasta que se solubilice.
- Mezclar las dos soluciones y filtrar.

**b) Solución de yodo yodurado. (Lugol)**

Yodo (químicamente puro)..... 1 g
Yoduro de potasio..... 2 g
Agua destilada..... 300 mL

**Preparación:**

- Combinar el yodo y el yoduro de potasio con la ayuda de un mortero.
- Lavar el contenido de éste con pequeñas alícuotas de agua destilada.
- Agregar agua suficiente para obtener un total de 300 mL.
- Agitar fuertemente.
- Almacenar la solución en una botella oscura y con tapón de vidrio.

**c) Alcohol acetona**

Alcohol etílico (95%)..... 500 mL
Acetona..... 300 mL

**Preparación:**

- Mezclar los ingredientes respectivos de cada combinación para su uso.

**d) Safranina**

Safranina (pureza del colorante, 90%)..... 0.25 g
Alcohol etílico (95%)..... 10 mL
Agua destilada..... 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el alcohol.
- Agregar el agua destilada.
- Filtrar.
- Almacenar en frasco con tapón de vidrio.

## III. TINCIÓN DE ESPORAS. (Método de Schaeffer y Fulton)

### a) Verde de malaquita al 5%

| | | |
|---|---|---|
| Verde de malaquita..... | 5 | g |
| Agua destilada..... | 100 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el agua y dejar en reposo durante una hora y media.
- Filtrar.
- Guardar en frasco oscuro.

### b) Safranina al 0.5%

| | | |
|---|---|---|
| Safranina..... | 0.5 | g |
| Agua destilada..... | 100 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el colorante y filtrar.

## IV. TINCIÓN PARA FLAGELOS. (Método de Leifson)

### Colorante de Leifson*

| | | |
|---|---|---|
| Disolución acuosa saturada de $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ o $AlNH_4(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$.. | 20 | mL |
| Disolución acuosa al 20% de ácido tánico..... | 10 | mL |
| Agua destilada..... | 40 | mL |
| Alcohol etílico al 95%..... | 15 | mL |
| Disolución saturada en alcohol etílico al 95% de fucsina básica..... | 3 | mL |

**Preparación:**

- Mezclar los ingredientes en el orden citado.
- Guardar en un frasco bien tapado.

* Se encuentra en el comercio en forma de polvo.

## V. TINCIÓN DE FLAGELOS. (Alternativa)

**Solución A:**

Fucsina básica..... 1.2 g
Etanol (95%)..... 100 mL

- Disolver el colorante.
- Filtrar y tapar perfectamente para evitar la evaporación.

**Solución B:**

Acido tánico..... 3 g
Agua destilada..... 100 mL

- Disolver el reactivo.

Si la mezcal no se usa pronto adicionar fenol al 0.2% para prevenir el desarrollo de hongos.

**Solución C:**

Cloruro de sodio..... 1.5 g
Agua destilada..... 100 mL

- Disolver el reactivo.

Esta solución es estable a temperatura ambiente.

**Preparación:**

- Mezclar cantidades iguales de las soluciones A, B y C.
- Guardar en frasco de vidrio y mantener bien tapado.

**NOTA:**

La solución es estable por 5 semanas a temperatura ambiente y en refrigeración dura varios meses.

**Colorante de contraste.**

p-Rosa anilina o azul de metileno..... 1 g
Agua destilada..... 100 mL

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el agua.

## VI. LACTOFENOL AZUL DE ALGODÓN

Agua destilada..... 20.0 mL
Cristales de fenol Q. P..... 20.0 g
Acido láctico..... 20.0 mL
Glicerina..... 20.0 mL
Azul de algodón..... 0.05 g

**Preparación:**

- Disolver el fenol en el agua.
- Agregar el ácido y la glicerina.
- Calentar a 70 °C.
- Adicionar el colorante.
- Guardar en frasco de vidrio.

# APÉNDICE C

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y REACTIVOS

## 1. AGUA DE DILUCIÓN CON SOLUCIÓN BUFFER

**Solución I**

- Disolver 34 g de fosfato monobásico de potasio ($KH_2PO_4$) en 500 mL de agua destilada.
- Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N.
- Aforar a un litro con agua destilada.

**Solución II**

- Disolver 50 g de sulfato de magnesio ($MgSO_4.7H_2O$) en 1000 mL de agua destilada.

**Preparación:**

- En un matraz volumétrico añadir 1.25 mL de la solución I y 5 mL de la II.
- Aforar a un litro con agua destilada.

## 2. VOGES PROSKAUER

### A. Solución de alfa naftol

| | | |
|---|---|---|
| α-Naftol | 5.0 | g |
| Alcohol etílico (95%) | cbp 100 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el alfa naftol en el alcohol.

### B. KOH

| | | |
|---|---|---|
| Hidróxido de potasio químicamente puro | 40 | g |
| Creatina | 0.3 | g |
| Agua destilada | cbp 100 | mL |

**Preparación:**

- Agregar el hidróxido de potasio a 75 mL de agua destilada, agitando y enfriando constantemente.

- Cuando la solución está más o menos a temperatura ambiente agregar la creatina y suficiente agua destilada para obtener un volumen final de 100 mL.

## 3. REACTIVO DE ROJO DE METILO

| | | |
|---|---|---|
| Rojo de metilo | 0.1 | g |
| Alcohol etílico (95%) | 250 | mL |
| Agua destilada | 250 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el colorante en el alcohol.
- Agregar el agua destilada.
- Filtrar la preparación.

## 4. REACTIVO DE KOVAC

| | | |
|---|---|---|
| Para-dimetil-amino-benzaldehído | 1 | g |
| Alcohol amílico ó butílico | 80 | mL |
| Acido clorhídrico químicamente puro | 20 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el para-dimetil-amino-benzaldehído en alcohol butílico ó amílico.
- Añadir el ácido clorhídrico.
- Conservar en un frasco ámbar con tapón de vidrio, en sitio oscuro.
- También se sugiere que esta solución se refrigere.

**NOTA:**

El reactivo debe tener una coloración amarillo claro ó café claro.

## 5. MEZCLA CRÓMICA

| | | |
|---|---|---|
| Dicromato de potasio | 6.5 | g |
| Agua destilada | 10 | mL |
| Acido sulfúrico | 100 | mL |

**Preparación:**

- Disolver el dicromato en agua.

- Calentar la solución ligeramente y dejar enfriar.
- Agregar el ácido poco a poco, mezclando con cuidado.

## 6. SOLUCIÓN SALINA DE PEPTONA

Peptona..... 1 g
Cloruro de sodio..... 8.5 g
Agua destilada.....cbp 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver los componentes hirviéndolos en aproximadamente 950 mL de agua.
- Ajustar el pH con solución de Hidróxido de Sodio 1 mol/L o Acido Clorhídrico 1 mol/L de modo que después de la esterilización sea de 7.0 ± 0.1.
- Aforar a 1000 mL con agua destilada.
- Distribuir en volúmenes convenientes.
- Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).

## 7. SOLUCIÓN SALINA. (Isotónica)

Cloruro de sodio..... 8.5 g
Agua destilada..... 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver el reactivo en el agua destilada.

## 8. PIROGALOL ALCALINO. Usado para conseguir condiciones de Anaerobiosis

Pirogalol..... 3 g
Tierra de infusorios..... 18 g
Carbonato de potasio..... 3 g

**Preparación:**

- Mezclar el pirogalol y la tierra de infusorios y adicionar el carbonato de potasio en un mortero.
- Mezclar al momento de usarse, después de 5 horas pierde actividad.

- Para su uso se pone una pequeña porción en un saquito de papel filtro.

## 9. SULFATO DE ZINC, GRAVEDAD ESPECÍFICA DE 1.3

Sulfato de zinc..... 800 g
Agua destilada..... 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver 800 g de sulfato de zinc en 1000 mL de agua destilada y agitar en la parrilla eléctrica hasta homogeneizar.
- Medir la densidad con un hidrómetro.
- Para alcanzar la densidad deseada, agregar reactivo ó agua según el caso.

## 10. REACTIVO PARA OXIDASA

Clorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina..... 0.1 g
Agua destilada.....cbp 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver el reactivo en el agua destilada.

**NOTA:**

Este reactivo no es estable y por consiguiente debe prepararse para utilizarlo en pequeñas cantidades cada vez que se necesite.

## 11. REACTIVO PARA OXIDASA. (Alternativa)

N, N-Clorhidrato de dimetil-p-fenilendiamina..... 1.0 g
Agua destilada.....cbp 100 mL

pH = 5.5

**Preparación:**

- Disolver el reactivo en el agua destilada.

**NOTA:**

Este reactivo deber ser preparado al momento de usarse.

## 12. REACTIVO PARA LA PRUEBA DE CITOCROMO-OXIDASA.

Solución al 1% de Oxalato de p-aminodimetilanilina.

## 13. ONPG. Prueba de β-galactosidasa

O-nitrofenil β--D-galactopiranósido..... 1.0 g (0.0003M)
Agua destilada..... 1000 mL

**Preparación:**

- Disolver el reactivo en el agua destilada.

## 14. REACTIVO PARA LA PRUEBA DE LA CATALASA

Solución acuosa de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes %.

## 15. ÁCIDO TRICLOROACÉTICO. Reactivo para la prueba de la hidrólisis de gelatina

Ácido tricloroacético Q.P..... 5 g
Agua destilada..... 100 mL

**Preparación:**

- Disolver el ácido, agitando constantemente.

**NOTA:**

También existen preparaciones comerciales de ácido tricloroacético al 5%.

## 16. SOLUCIÓN DE α-NAFTILAMINA. Reactivo para la reducción del nitrato

α- Naftilamina..... 5 g
Ácido sulfúrico concentrado y Q. P..... 8 mL
Agua destilada..... 992 mL

**Preparación:**

- Agregar el ácido al agua destilada y mezclar perfectamente; luego, introducir el α-naftilamina y agitar hasta que el ingrediente se disuelva.

## 17. ÁCIDO SULFANÍLICO. Reactivo para la prueba del nitrito

Ácido sulfanílico Q.P..... 8 g
Ácido sulfúrico Q.P..... 48 mL
Agua destilada.....cbp 1000 mL

**Preparación:**

- Agregar el ácido sulfúrico en 500 mL de agua destilada agitando y enfriando constantemente.
- A continuación, añadir el ácido sulfanílico, agitando y enfriando también de un modo constante.
- Por último, agregar agua destilada hasta obtener un volumen final de 1000 mL.

## 18. PRUEBA PARA LA REDUCCIÓN DE NITRATO. (general)

**Disolución A**

Ácido sulfanílico..... 8 g
Ácido acético 5N..... 1000 mL

**Disolución B**

α- Naftilamina..... 5 g
Ácido acético 5N..... 1000 mL

Fíltrese a través de algodón absorbente lavado.

## BIBLIOGRAFÍA


- APHA, AWWA, WPCF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Washington, D. C., U.S.A. 18th Edition, 1992.

- Atlas, R.M., "Microbiología Fundamentos y Aplicaciones", CECSA, México, 1990.

- Burdon, K.L. y Williams, A.B., Microbiología, Publicaciones Cultural, S.A, México, D.F., 1978.

- Calmet Tarruella, M., R.M. Calzado, I.M. González, J.M. Oliva Solé, Seminario MC3II: "ANALISIS MICROBIOLOGICO", Curso de Técnicos del Agua: 2ª. Edición, Terrassa-Barcelona, España, 1992.

- Chantereau, J., Corrosión Bacteriana, Ed. Limusa, 1ª edición, 1985.

- Davidsohn, I. y Wells, Todd-Sanford Diagnóstico Clínico por el Laboratorio, Editorial Marín, S. A., 1986.

- Difco Manual, "Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology", Tenth Edition, Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232 USA, 1984.

- Freeman, B.A., "Microbiología de Burrows", 22ª Edición Interamericana, Mc Graw Hill, 1989.

- Grainger, J.M. y J.M. Lynch, Microbiological Methods for Environmental Biotechnology, Academic Press, 1984.

- Kemmer, F. N., Mc.Callion, J., Manual del Agua: Su Naturaleza, Tratamiento y Aplicaciones, Nalco Chemical Company, McGraw Hill, México, 1989.

- Kleyn, J., M. Bicknell & Gilstrap M., Microbiology Experiments, A Health Science Perspective, Second Edition, McGraw Hill Companies, Inc., 1999.

- Koneman,E.W., S.D. Allen, V.R. Dowell, W.M.Janda, H.M. Sommers y W.C. Winn, Diagnóstico Microbiológico, Texto y Atlas Color, 3ª Edición, Editorial Medica Panamericana, S.A., 1992.

- Mac Faddin, J.F., "Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica", Ed. Médica Panamericana, México, 1990.

- Manual of BBL Products and Laboratory Procedures, Sixth Edition, USA, 1988.

- Manual de Operación, Laboratorio, Planta Industrializadora de Desechos Sólidos, Determinaciones Microbiológicas, Ed. Departamento del Distrito Federal, 1975.

- Madigan, M.T., J.M. Martinko, y J. Parker, "Brock Biología de los Microorganismos", Prentice Hall Hispanoamericana, S. A., Octava Edición, 1998.

- McKinney, R. E. Microbiología para Ingenieros Sanitarios, McGraw-Hill, 1972.

- Mitchel, R., Water Pollution Microbiology, Ed. Wiley Interscience, 1972.

- NOM-AA-42-1987, Calidad del Agua, Determinación del Número más Probable (NMP) de Coliformes Totales, Coliformes Fecales (Termotolerantes) y *Escherichia coli Presuntiva,* DGN.

- NOM-AA-102-1987. Calidad del Agua. Detección y Enumeración de organismos coliformes, organismos coliformes termotolerantes y *Escherichia coli* Presuntiva – Método de Filtración en membrana, DGN.

- NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios, Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

- Modificación a la NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental, Agua para uso y consumo humano, límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.

- NOM-001-ECOL-1996 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca.

- NOM-003-ECOL-1997. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas, que se reusen en servicios al público, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de septiembre de 1998.

- Pelczar, M. J., Jr, E.C.S. Chan y N.R. Krieg., "Microbiology Concepts and Aplication", McGraw Hill, 1993.

- Ramírez-Gama, R.M., B. Luna Millán, A. Mejía Chávez, O. Velázquez Madrazo, G. Tsuzuki Reyes, L. Vierna García, L.Hernández Gómez I. Müggenburg, "Manual de Prácticas de Microbiología General", Facultad de Química, UNAM, Última edición 2001.

- Rodríguez, M. A., Microbiología Médica, Manual de Laboratorio, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N. L., 1971.

- Stanier, R.Y., E.A. Adelberg, J. L. Ingraham, "Microbiología", Repla, S.A., México, 1986.

- Velasco C.O., Carmen,G.B., Manual de Técnicas de Laboratorio, Volumen II, Segunda Parte, Diagnóstico Parasitológico, Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, Secretaria de Salud, México, D.F 1994.

- Wistreich y Lechtman, Prácticas de Laboratorio de Microbiología, Limusa, 1978.

**MICROBIOLOGÍA APLICADA**

MANUAL DE LABORATORIO

Este material fue aprobado para su publicación por el Consejo Editorial de la División de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Unidad Azcapotzalco de la UAM, en su sesión del día 25 de junio del 2003.

*Microbiología aplicada. Manual de laboratorio*

Se terminó de imprimir en el mes de
abril de 2009 en los talleres de la sección
de Impresión y Reproducción de la
Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Azcapotzalco

Se imprimieron 100 ejemplares
más sobrantes para reposición

La edición estuvo a cargo de la
sección de Producción y Distribución Editoriales
de la Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Azcapotzalco