

# TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y OTRAS MUESTRAS

## Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Explicar el fundamento de las técnicas más utilizadas en el recuento microbiano: microscópico, turbidimétrico, dilución y siembra en placa o tubo; filtración y siembra en placa, reducción de indicadores óxido-reducción.
- Establecer la cantidad de microorganismos en una muestra mediante la aplicación de las técnicas más adecuadas.
- Relacionar los resultados obtenidos y explicar las causas que determinan la variación de éstos.

## Introducción

El crecimiento de los microorganismos presentes en sustratos que se encuentren en condiciones que lo propicien, se traducirá primero en el aumento de los componentes celulares, y en seguida por el aumento del tamaño y el incremento del número de células. Los estudios relacionados con el análisis de muestras como agua, alimentos, leche y aire requieren de una enumeración cuantitativa de los microorganismos presentes en estos compuestos, ya que la calidad microbiológica de estos productos está en relación directa con la calidad sanitaria y la seguridad para el consumo de ellos.

Por lo heterogéneo de los microorganismos y de las muestras, existen muchos métodos para tales fines que incluyen métodos microscópicos o directos, el uso de contadores electrónicos de células como el contador Coulter, métodos químicos que permiten estimar la masa celular o constituyentes celulares, lecturas turbidimétricas que se pueden relacionar con el aumento de la masa celular y el método de cuenta en placa de unidades formadoras de colonias.

# PRÁCTICA 7.1

## Técnica de Cuenta Directa: Método de Breed y Método Redox.

### **Materiales**

#### Muestras

Leche pasteurizada  
Leche no pasteurizada  
Leche cruda o bronca (de establo)  
Vino caducado o una muestra microbiana preparada

#### Material por mesa

Solución de tiocianato de azul de metileno (para reductasas)  
Frasco gotero con azul de metileno

#### Material por equipo:

Microscopio  
Objetivo micrométrico  
Ocular micrométrico

#### Material que deben tener los alumnos:

Mecheros  
Gradillas  
Portaobjetos  
Tubos de ensayo de 16x150 vacíos con tapón de rosca estériles  
Pipetas de 10 mL estériles  
Pipetas de 1.0 mL estériles  
Pipetas de 0.1 mL estériles  
Pipetero

## Metodología

### Método de Breed (cuenta directa).

- En un portaobjetos limpio y desengrasado, marcar un área de 2 cm<sup>2</sup>, e invertir el portaobjetos.
- A partir de la muestra de leche o de la muestra microbiana preparada, tomar con una pipeta estéril, 0.01 mL y transferir al portaobjetos y extender en el área marcada de 2 cm<sup>2</sup> con el asa.
- Dejar secar al aire.

### **Muestra de leche**

- Sumergir el frote en xilol durante 2 min.
- Sacarlo del xilol y sumergirlo en etanol durante otros 2 min.
- Sacar el frote del etanol y cubrirlo con solución de azul de metileno durante 2 min. Lavar con agua. Dejar secar al aire.

### **Muestra microbiana preparada**

- Fijar a la flama el frote.
- Teñir la preparación con azul de metileno de Loeffler.
- Eliminar el exceso con agua de la llave.
- Dejar secar, para observar con el objetivo de inmersión.

### **Determinación del área del campo microscópico**

- Colocar en la platina del microscopio el objetivo micrométrico.
- Medir el diámetro del campo microscópico. La reglilla del objetivo micrométrico está dividida en espacios de 10 m (0.01 mm ó 0.001 cm).
- Determinar el área del campo microscópico aplicando la siguiente fórmula:

$$\frac{(r^2) (3.1416)}{100} = \text{Área del campo microscópico en cm}^2$$

### **Número de microorganismos por campo microscópico**

- Colocar en la platina del microscopio la preparación previamente teñida y contar el número de microorganismos que se observan en un campo microscópico. Cambiar el campo microscópico y contar nuevamente el número de microorganismos. Repetir este ejercicio hasta registrar 10 campos microscópicos.

### **Determinación del número de campos microscópicos**

Aplicar la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Área de la preparación}}{\text{Área del campo microscópico}} = \text{Número de campos microscópicos}$$

### Cálculo del número de microorganismos presentes en la muestra)

Resolver con la siguiente fórmula:

$$\left( \begin{array}{c} \text{Número de} \\ \text{microorganismos} \\ \text{por campo} \end{array} \right) \left( \begin{array}{c} \text{Número de campos} \\ \text{microscópicos} \end{array} \right) = \left( \begin{array}{c} \text{Número de} \\ \text{microorganismos en la} \\ \text{preparación} \end{array} \right) \times 100 = \begin{array}{c} \text{Número de} \\ \text{microorganismos por} \\ \text{mL de muestra} \end{array}$$

### Método Redox (reducción del azul de metileno).

Reducción del azul de metileno:

1. Agitar la muestra de leche pasteurizada y transferir 10 mL a un tubo de ensayo.
2. Agitar la muestra de leche cruda y transferir 10 mL a otro tubo de ensayo.
3. Agregar a cada tubo 1 mL de la solución de colorante, mezclar bien y colocarlos en un baño de agua a 37°C (o en la incubadora).
4. Después de 10 minutos, asegurar los tapones e invertir lentamente los tubos tres veces para distribuir la capa de crema.
5. Observar cada 30 minutos y continuar la incubación hasta que registre decoloración del colorante.
6. Anotar los resultados obtenidos en la práctica, de acuerdo con la clasificación indicada en el Cuadro 20.

**Cuadro 20.** Clasificación de la calidad de leche y número de microorganismos, mediante la técnica de reducción del tiocianato de azul de metileno.

Calidad	Tiempo (°C) de incubación en el que se presenta la decoloración	Número de microorganismos / mL
Excelente	No se decolora en 5.5 h	< de 500 000
Buena	Se decolora entre las 2 y 5.5 h	500,000 a 4 000 000
Mala	Se decolora entre los 20 minutos y 2 h	4 a 20 millones
Muy mala	Se decolora en 20 minutos	> de 20 millones

### Precauciones generales

- Registra los tiempos adecuadamente para observar el cambio de color en las muestras de leche empleadas para cuantificar microorganismos mediante la técnica de Redox.

### Disposición de desechos

1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10 % a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95 % durante 24 horas.

2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
3. Las muestras de leche con colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio.

### **Guía para redactar la discusión de resultados**

1. ¿Cuál fue la problemática a la que te enfrentaste para llevar a cabo los métodos de Breed y Redox?
2. Discute acerca de la eficacia de los métodos empleados para conocer la calidad y cantidad de microorganismos presentes en la leche.

### **Literatura de consulta**

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20<sup>th</sup> ed. Washington.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

## **Materiales**

### Material por grupo

Nefelómetro o espectrofotómetro

Curva de McFarland recién preparada

### Material por equipo

Matraz nefelométrico conteniendo un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* de 24 hrs.

Pipeta graduada 1.0 mL estéril

Tubos de ensaye con 9.0 mL de SSIE

Piseta con agua destilada

Papel absorbente

Celdas para nefelómetro o para espectrofotómetro

## **Metodología**

### Cálculo del número de microorganismos presentes en la muestra problema

1. Agitar suavemente el matraz que contiene el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, y preparar diferentes diluciones en tubos con SSI (muestra problema). Etiquetar los tubos con la dilución correspondiente.
2. Agregar 1 gota de formaldehído a los tubos con la muestra problema.
3. Vaciar el contenido de cada una de las muestra problema en celdas espectrofotométricas y proceder a tomar la lectura de densidad óptica (D.O.) o % de transmitancia.
4. Seguir las instrucciones de uso y cuidado del espectrofotómetro.
5. Insertar la celda con la muestra problema en el espectrofotómetro y tomar la lectura del % de transmitancia.
6. Construir una gráfica ( $x$ =Número de microorganismos,  $y$ =% transmitancia) con la Curva de McFarland. Registrar los resultados en el Cuadro 21.
7. Obtener la ecuación de la recta ( $y=mx+b$ ) a partir de la curva. Despejar  $x$  e interpolar los datos obtenidos para cada muestra problema en la curva de McFarland.

## **Precauciones generales**

- Procura homogenizar perfectamente tus cultivos al realizar cada dilución, y antes de leer el % transmitancia.
- Leer previamente el uso y cuidado del espectrofotómetro.

**Cuadro 21.** Datos para elaborar la curva de McFarland

<b>Tubo</b>	<b>Número de microorganismos (x)</b>	<b>Densidad Óptica (y)</b>
<b>1</b>		
<b>2</b>		
<b>3</b>		
<b>4</b>		
<b>5</b>		
<b>6</b>		
<b>7</b>		
<b>8</b>		
<b>9</b>		
<b>10</b>		

### **Disposición de desechos**

1. Desechar en la tarja el contenido de los tubos en los que preparó las diluciones microbianas y posteriormente lavarlos.

### **Literatura de consulta**

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Madigan, M. T., J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice may Iberia, España.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20<sup>th</sup> edition. Washington.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

## PRÁCTICA 7.3

### Método del Dilución y vertido en placa

#### Materiales

##### Muestra

Muestra sólida (materia prima, suelo, alimento)

##### Material por grupo

Baño de agua a 50° C

Balanza

Espátulas

Papel encerado

Vortex

##### Material por equipo

Mechero

Gradilla

Tubos de ensaye con 9 mL de SSIE

Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 90 mL de solución salina isotónica estéril (SSIE)

Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 150 mL de agar triptona glucosa extracto de levadura (TGEA) estéril.

Pipetas graduadas de 1 mL estériles

Cajas Petri de plástico desechable estériles

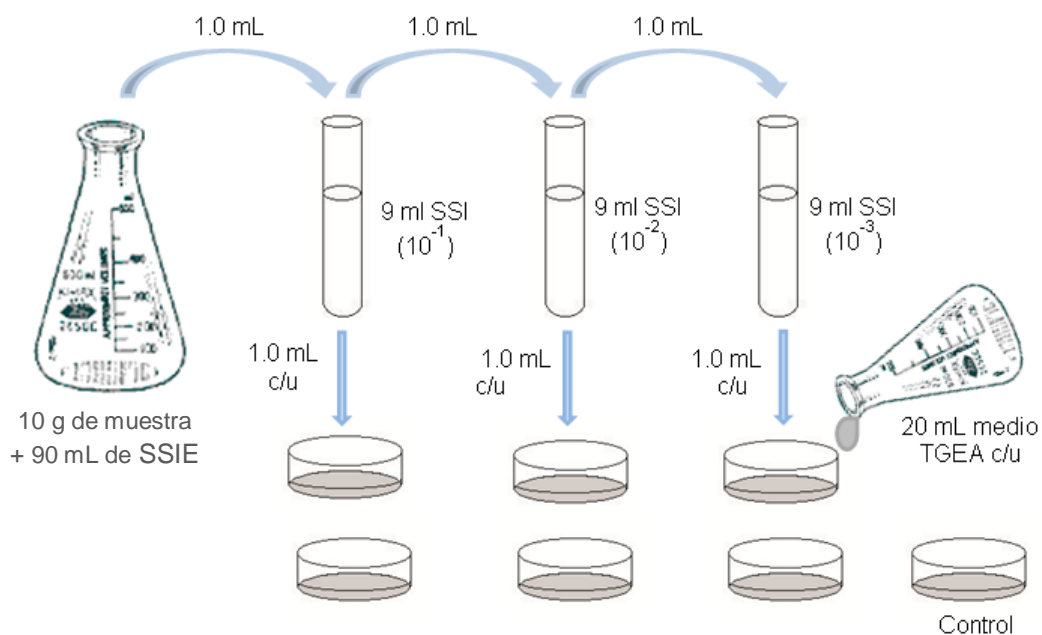
1 colador

#### Metodología

1. Etiquetar los tubos con las siguientes diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Así como las cajas Petri por duplicado (Figura 11).
2. Pesar 10 g de muestra en el papel encerado y mezclar con la SSIE del matraz (Suspensión).
3. Homogenizar vigorosamente, en vórtex, durante 5 minutos.
4. En condiciones asépticas, realizar tres diluciones decimales a partir de la suspensión: tomar 1.0 mL e inocular el tubo  $10^{-1}$ ; subir y bajar la suspensión, tres veces, con la misma pipeta para homogenizar la dilución. Repetir la operación hasta concluir con la dilución  $10^{-3}$ .
5. A partir de la dilución  $10^{-3}$ , agitar y tomar 1.0 mL y depositar en una caja Petri vacía (por duplicado). Repetir con la dilución  $10^{-2}$  y  $10^{-1}$ .
6. Verter, en cada caja el medio TGEA previamente fundido (aproximadamente 20 mL) y a una temperatura de 45° C.



7. Homogeneizar **cuidadosamente**; para ello mezclar el inóculo con el medio, colocando la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía adelante atrás y 5 en sentido horizontal.
8. Dejar solidificar e invertir las cajas.
9. La caja Petri etiquetada como "Control" no es inoculada con la muestra.
10. Incubar a 37° C durante 24 horas.
11. Al término de la incubación, hacer el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL. Las colonias pueden encontrarse sobre, inmersas y debajo del medio de cultivo. Registrar resultados en el Cuadro 22.



**Figura 11.** Método de dilución y vertido en placa.

### Determinación de microorganismos mesófilos aerobios

**Cuadro 22.** Registro de las UFC obtenidas mediante la técnicas de dilución y vertido en placa.

Repetición de cada dilución	Dilución		
	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$
<b>A</b>			
<b>B</b>			
<b>X</b>			

X=Promedio de las UFC de ambas repeticiones.

## **Precauciones generales**

- Procura que el medio de cultivo (TGEA) esté a 45° C para verterlo en las cajas de Petri con las muestras.
- Homogenizar perfectamente el medio de cultivo con la muestra, en las cajas Petri.
- Procura mantener limpias la superficie de las cajas para tener una cuenta de UFC confiable.

## **Disposición de desechos**

1. La muestra se desecha mediante un colador. Los residuos sólidos se desechan en la basura y el líquido en la tarja.
2. Esteriliza los tubos en los que preparó las diluciones microbianas y posteriormente desecha el contenido en la tarja y lavarlos.
3. Las placas Petri se desechan en los contenedores correspondientes para este material.

## **Guía para redactar la discusión de resultados**

1. En la técnica de dilución y siembra por placa vertida ¿se observa el efecto de dilución? Fundamenta tu respuesta.
2. ¿Se obtuvieron resultados similares con la técnicas turbidimétrica y la de dilución y vertido en placa? ¿Por qué?
3. ¿Cuál de las dos técnicas la consideras más confiable? ¿Por qué?
4. ¿Qué precauciones propondrías para mejorar las técnicas de dilución y siembra por placa vertida y el método turbidimétrico?

## **Literatura de consulta**

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Madigan, M. T., J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice may Iberia, España.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20<sup>th</sup> edition. Washington.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

## PRÁCTICA 7.4

### Método de Filtración

#### Materiales

##### Material por equipo:

Equipo *Millipore* para filtración (matraz, soporte, embudo, pinzas) estéril  
Membrana *Millipore* estériles de 5 cm de diámetro y 0.45 µm de poro  
Matraz Erlenmeyer con 100 mL de solución salina isotónica estéril (SSIE)  
Placa Petri de agar bilis rojo violeta (ABRV) o con agar ENDO  
Vaso de precipitado de 250 mL  
Pinzas *Millipore*  
Manguera para vacío

##### Material que deben tener los alumnos:

Muestra de agua potable (agua de filtro, sistema Biozone<sup>MR</sup>, purificadora (rellenadora))  
Mecheros  
Gradillas  
Asas  
Etanol (96°) para flamear pinzas  
Pinzas de punta roma

#### Metodología

1. En condiciones de asepsia, montar el equipo *Millipore* y conectarlo al sistema de vacío.
2. Mantener el vacío cerrado.
3. Con las pinzas *Millipore*, previamente flameadas con alcohol y enfriadas, colocar la membrana *Millipore* en el soporte, montar nuevamente el embudo y fijarlo con la pinza adaptadora.
4. Agitar suavemente el frasco que contiene la muestra de agua y verter un volumen conocido de ella en el embudo del equipo *Millipore*.
5. Abrir la llave del vacío.
6. Filtrar. Cuando haya pasado toda la muestra, verter la SSIE (100 mL) y lavar el embudo.
7. Cerrar el vacío. Desmontar el embudo.
8. Retirar la membrana tomándola con las pinzas *Millipore*, previamente flameadas con alcohol y enfriadas. Depositar la membrana asépticamente sobre la placa de ABRV o agar ENDO. Procurar que la cuadrícula quede hacia arriba, y asegurar que el contacto de la membrana con el medio sea uniforme, sin dejar burbujas de aire.
9. Incubar a 37° C durante 24-48 h.

10. Al término de la incubación: Revisar las membranas sobre las placas y ubicar la presencia de colonias características de bacterias coliformes.
11. Utilizar un cuentacolonia, de ser necesario, para contar las UFC características y calcular el número de UFC /100 mL de muestra.
12. Consultar la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que señala los límites permitidos de bacterias coliformes fecales y confirmar si el agua analizada reúne y cumple con lo establecido.

### **Precauciones generales**

- Si la muestra de agua, que se usará para la cuantificación de bacterias coliformes mediante la técnica de filtración, está turbia (presencia de sólidos), será necesario diluirla o cambiar de muestra.

### **Disposición de desechos**

1. Después de realizar las lecturas correspondientes, sellar las cajas de Petri de plástico con la membrana *Millipore* y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

### **Guía para redactar la discusión de resultados**

1. ¿Qué ventajas y desventajas encuentras al utilizar esta técnica respecto a la técnica de dilución y vertido en placa?
2. ¿Qué otros microorganismos podrías cuantificar mediante esta técnica? Fundamenta tu respuesta.

### **Literatura de consulta**

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Madigan, M. T., J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice may Iberia, España.
- Norma Oficial Mexicana 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.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20<sup>th</sup> edition. Washington.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

## PRÁCTICA 7.5

# Análisis microbiológico del agua por el Método del Número Más Probable (NMP)

### Objetivos

- Explicar el concepto microbiológico de indicador de contaminación.
- Evaluar la calidad sanitaria de muestras de agua mediante el recuento de mesófilos aeróbios y la búsqueda de microorganismos coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.
- Diferenciar los organismos coliformes totales de los microorganismos coliformes fecales.

### Introducción

La determinación de la calidad bacteriológica reviste gran importancia en el ámbito de la salud pública ya que permite garantizar la inocuidad del agua destinada al consumo evitando así las epidemias gastrointestinales.

El agua destinada al consumo humano puede ser contaminada por las aguas residuales o por desechos humanos y animales que pueden contener microorganismos patógenos (principalmente intestinales) como son las causantes de la tifoidea (*Salmonella typhi*), la disentería (*Shigella dysenteriae*) o el cólera (*Vibrio cholerae*) entre otros.

Sin embargo, la detección de microorganismos patógenos es poco práctica por las siguientes razones:

- a) No siempre están presentes en la fuente de contaminación (material fecal), pero pueden aparecer repentinamente.
- b) Al diluirse en el agua, pueden quedar en concentraciones no detectables por los métodos de laboratorio.
- c) Sobreviven relativamente poco tiempo en el agua, por lo que pueden desaparecer antes de detectarlos.
- d) Los resultados del análisis bacteriológico del agua se obtienen después que ésta ha sido consumida, por lo cual si hay patógenos, la población habrá estado expuesta a la infección.

Todo esto hace indispensable una medida de control más efectiva como es la detección del peligro potencial; es decir, la advertencia del riesgo de contaminación con microorganismos patógenos antes de que aparezcan. Para detectar ese peligro potencial se utilizan “indicadores de contaminación” que reúnen las siguientes características:

- a) Se encuentran como flora normal en la fuente de contaminación, es decir, en la materia fecal, independientemente de que haya o no microorganismos patógenos.
- b) Son más resistentes y sobreviven en el agua más tiempo que los patógenos.
- c) Su detección en el laboratorio es relativamente rápida, fácil y confiable.

Las bacterias coliformes reúnen las características anteriores, ya que se encuentran en grandes cantidades en el tracto intestinal del hombre de los mamíferos y por lo tanto en sus heces y es fácil diferenciar las especies coliformes de origen fecal de las que no lo son. La sobrevivencia de coliformes en el agua es mayor que la de cualquier bacteria enteropatógena y su identificación es fácil y confiable.

Por tanto, el aspecto más importante del análisis bacteriológico del agua es la determinación de coliformes que puede hacerse por el método del número más probable (NMP), la determinación de bacterias mesófilas aerobias o por el método de filtración de membrana.

## **MUESTREO 1. Agua almacenada**

### **Materiales**

#### Muestra

Agua almacenada (cisterna)

#### Material por grupo

Tiosulfato de sodio (10%)

Etanol

Algodón

#### Material por equipo

Frasco de boca ancha con tapa

Papel kraft

Pipeta 1 mL

### **Metodología**

#### Preparación de frascos para la toma de muestra

1. Lavar perfectamente el frasco, eliminando todo resto de jabón o detergente.
2. Agregar al frasco tiosulfato de sodio (10%): 0.5 mL / 500 mL volumen del frasco.
3. Cubrir la tapa y el cuello del frasco con una tira de papel kraft. No cerrar herméticamente.
4. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min.

### Toma de la muestra

1. Lavarse y desinfectarse las manos.
2. A partir de grifos: desinfectar el grifo con algodón y etanol. Dejar correr el agua por 3 minutos.
3. Generar una zona aséptica cuando sea posible hacerlo.
4. Destapar el frasco, y llenar hasta  $\frac{3}{4}$  partes del recipiente y tapar inmediatamente.
5. A partir de depósitos naturales y cuerpos receptores: retirar la cubierta de papel y sostener el frasco por la base e introducirlo aproximadamente 30 cm en el agua.
6. Llenar hasta  $\frac{3}{4}$  partes del recipiente y tapar inmediatamente.
7. En ambos casos, etiquetar el frasco y elaborar una hoja de registro de datos.
8. Conservar la muestra en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio.

## **MUESTREO 2. Hielo**

### **Materiales**

#### Muestra

Hielo para raspados (sin adicionar jarabe) o hielo granizado (reparten para tiendas)

#### Material por equipo

Bolsa de plástico con cierre (*ziploc*)

Pipeta de 1 mL

### **Metodología**

#### Toma de muestra

1. Comprar con un día de anterioridad 3 vasos de hielo para raspado o del granizado y colocarlo en la bolsa plástica.
2. Cerrar inmediatamente y refrigerar (no congelar) hasta su análisis en el laboratorio.

## **DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES FECALES EN AGUA O HIELO**

### **Materiales**

#### Muestra

Tubos de ensaye con tapón de rosca (22x175) con 10 mL de caldo lauril sulfato de sodio (CLSS) triple concentración (3X), con campana de Durham.

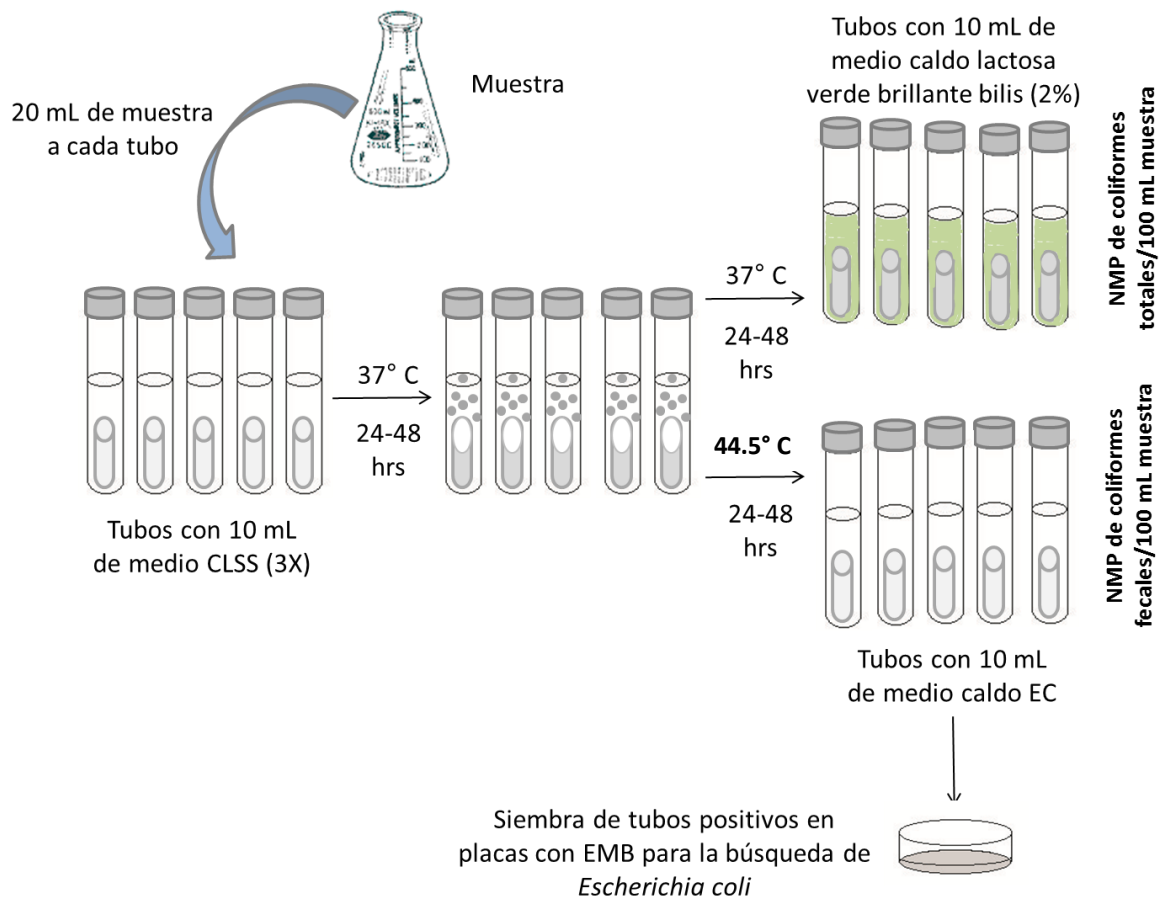
Tubos de ensaye con tapón de rosca (16x150) con caldo de bilis verde brillante (2%), con campana de Durham.

Tubos de ensaye con tapón de rosca (16x150) con caldo EC, con campana de Durham.  
Pipetas graduadas de 1.0 mL

## Metodología

### Prueba presuntiva de microorganismos coliformes totales

1. A partir de la muestra de agua inocular 20 mL en cada uno de los tubos con CLSS (3X) con campana de Durham (Figura 12).
2. Incubar los medios a 35° C durante 24 hrs.
3. Observar si hay formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham), si no se observara tal producción, incubar 24 horas más.



**Figura 12.** Determinación del Número Más Probable de microorganismos coliformes.



### Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales

1. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos que contienen caldo de bilis verde brillante (2%) con campana de Durham.
2. Agitar suavemente los tubos con el medio para su homogeneización.
3. Incubar a 35° C durante 24 a 48 hrs.
4. Registrar como tubos positivos aquellos tubos con medio donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas, después del periodo de incubación.
5. Consultar el Cuadro 23 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes totales / 100 mL.

**Cuadro 23.** NMP de organismos coliformes por 100 mL de muestra.

Número de tubos positivos	NMP / 100 mL
0	< 1.1
1	1.1
2	2.6
3	4.6
4	8.0
5	> 8.0

CCAYAC-M-004 (2006). Estimación de la densidad microbiana por la técnica del NMP, detección de coliformes totales y coliformes fecales y *E. coli* por NMP (COFEPRIS).

### Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales

1. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo durante la prueba presuntiva a tubos con caldo EC.
2. Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
3. Incubar a 44.5° C durante 24 a 48 hrs.
4. Registrar como positivos todos los tubos en donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas, después del periodo de incubación.
5. Consultar el Cuadro 23 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes fecales / 100 mL.

### Control de calidad para coliformes fecales

Inocular en tubos con caldo EC una cepa de *Escherichia coli* como control positivo y una de *Enterobacter aerogenes* como control negativo e incubar junto con las muestras.

## IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES

### Materiales

Microscopio

Juego de colorantes Gram

Gradilla

Placa con agar Cuenta Estándar

Placa con agar EMB

Tubos de ensaye (13x100) con medio SIM

Tubos de ensaye (13x100) con medio RM/VP

Tubos de ensaye (13x100) con medio Citrato de Simmon's

Tubos de ensaye (16x150) con 2 mL de SSI estéril

Metodología

### Prueba confirmativa para *Escherichia coli*

1. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos en EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB para su aislamiento.
2. Incubar las placas a 35° C durante 18 a 24 horas.
3. Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Si no hay colonias con morfología típica probar una o más colonias lo más parecida a *E. coli* de cada placa y sembrarlas en agar Cuenta Estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas.
4. Incubar las placas a 35° C durante 18 a 24 horas.
5. Hacer un frotis y teñir con Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram negativos.

### Identificación bioquímica de *Escherichia coli* mediante pruebas IMViC

A partir de las placas con agar Cuenta Estándar, seleccionar una colonia, resuspenderla en 2 mL de SSI estéril para realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

#### a) Producción de indol

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con medio SIM.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. Adicionar entre 0.2 y 0.3 mL de reactivo de Ehrlich o Kovacs.
4. La presencia de un anillo rojo en la superficie del tubo se considera como prueba positiva para la presencia de indol.

b) Producción de ácidos mixtos (prueba RM)

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga caldo RM/VP.
2. Incubar a 35° C durante 48 horas.
3. Adicionar 5 gotas de solución Rojo de Metilo.
4. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo en el medio. Un color amarillo es una prueba negativa.

c) Producción de metabolitos neutros (prueba VP).

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga caldo RM/VP.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. Adicionar 0.6 mL de KOH (40%), agitar y 0.2 mL de alfa-naftol. Agitar.
4. Dejar reposar el tubo destapado durante 10 minutos. Se considera una prueba positiva cuando se desarrollo un color rosa en la superficie.

d) Utilización del citrato

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga el medio Citrato de Simmon's.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. El desarrollo del cultivo que se observa con la turbiedad del medio y el vire del indicador a azul, se considera como prueba positiva.

### **Disposición de desechos**

- Esterilizar los tubos en los que preparó las suspensiones bacterianas y posteriormente lavarlos.

### **Guía para redactar la discusión de resultados**

1. ¿Cuáles son los puntos críticos para realizar las técnicas del NMP?
2. ¿Cuáles fueron las dificultades a las que te enfrentaste al realizar la lectura de ésta técnica?
3. Discute sobre la información que te proporciona esta técnica.

### **Literatura de consulta**

- CCAYAC-M-004 (2006) "Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable".
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8<sup>th</sup> ed.
- Food and Drug Administration (2003) "Bacteriological Analytical Manual" 9<sup>th</sup> ed. Arlington, VA:AOAC.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993. Bienes y servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10<sup>a</sup> Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Norma Oficial Mexicana 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.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5<sup>a</sup> edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20<sup>th</sup> ed. Washington.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1<sup>a</sup> edición. Atlante S. R. L. Argentina