

DATA D'INICI : 20 / 3 / 2003

DATA DE FINALITZACIÓ : 1 / 4 / 2003

TÍTOL : DETERMINACIÓ PRESSUMTIVA I CONFIRMATIVA DE ESTREPTOCOCS FECALS. I DETERMINACIÓ CONFIRMATIVA DE CLOSTRIDIUM SULFITO-REDUCTORS.

OBJECTIU : Determinar pressumtivament i confirmar l'existència de estreptococs fecals de l'aigua d'un reactor, mitjançant la taula del NMP.

Determinar confirmativament els clostridium sulfite reductors d'un aigua d'un reactor.

FONAMENT TEÒRIC :

	Potables		Sanitàriament permessa
clostridium sulfite-reductors	absència / 20/ mL	2 / 20 mL	
streptococs fecals	absència / 20/ mL	10 / 100 mL	

Solució tamponada estèril : Permet el creixement del microorganisme però no permet que es reproduïxi.

Dilució : passar de major concentració a menor mitjançant transferències de volum.

Medi d'enriquiment : medi on hi ha microorganismes que provoca la duplicació d'aquest concentrant-los encara , que sinó hi ha microorganismes no enriqueix1.5

Medi selectiu : afavoreix el creixement d'uns microorganismes determinats i inhibeix el creixement dels altres.

Estreptococs fecals : cocs gram positius anaerobis facultatius, fermenten sucres en producció d'àcid

Clostridium sulfite reductors : anaerobis estrictes.

PROCEDIMENT :

Preparar dilucions:

- Agafar els tubs amb la solució tamponada estèril
- Obrir la mostra de l'aigua del reactor, flamejant la boca del tap
- Introduir 1mL de la mostra al primer tub
- Flamejar el tub i tapar
- Homogeneïtzar el tub (dilució 10-1)
- Canviar la punta de la micropipeta
- Agafar 1mL de la dilució -1
- Introduir-la en un altre tub amb solució tamponada estèril.
- Flamejar el tub i tapar
- Homogeneïtzar el tub (dilució 10-2)
- Canviar la punta de la micropipeta
- Agafar 1mL de la dilució -2

- Així fins arribar a la dilució desitjada, en aquest cas 10⁻⁵

Prova presumptiva d'estreptococs (medi rothe simple) :

- Obrir el tub amb major dilució (10⁻⁵)
- Flamejar el tub i el tap a la flama del bec bunsen
- Introduir la micropipeta i pipetejar 1mL
- Agafar el tub amb el medi rothe i obrir-lo flamejant el tap i el tub
- Introduir el mil·lilitre de mostra
- Homogeneïtzar per rotació suau
- Repetir la sembra per triplicat de cada dilució
- Incubar a 37°C durant 48h com a màxim
- Lectura de tubs positius
- Consulta a la taula del NMP

Prova presumptiva d'estreptococs fecals (medi rothe doble concentrat) :

- El procediment és el mateix però el medi de cultiu està preparat doblement concentrat
- Es repeteix la sembra per triplicat per a cadascuna de les dilucions con al anterior

Prova confirmativa d'estreptococs fecals (medi EVA) :

- Agafar la dilució més baixa que hagi donat positiva a la prova anterior
- flamejant el tap i el tub
- Introduir la micropipeta i pipetejar 0.5mL
- Agafar el tub amb el medi EVA obrir-lo flamejant el tap i el tub
- Introduir la mostra
- Homogeneïtzar per rotació suau
- Repetir la sembra per triplicat de cada dilució
- Incubar a 37°C durant 48h com a màxim
- Lectura de tubs positius

Prova de la determinació confirmativa de Clostridium sulfito-reductors (medi SPS):

- Començar per la dilució inicial (10⁻⁵)
- Flamejar el tub i el tap a la flama del bec bunsen
- Introduir la micropipeta i pipetejar 1mL de la dilució
- Agafar el tub amb el medi SPS i obrir-lo flamejant el tap i el tub
- Introduir el mil·lilitre de mostra sembrant-lo des de la part inferior fins a la part superior del medi expulsant-lo molt poc a poc
- Homogeneïtzar per rotació molt suaument
- Deixar solidificar
- Fer les sembres per duplicat
- Anar a la campana i posar 5mL de vaselina estèril.
- Incubar a 46°C durant 24h
- Observar els tubs
- Fer la lectura

MATERIAL :

- Bec bunsen
- Homogeneïtzador

- Tubs d'assaig grans i petits
- Gradeta
- Vas de precipitats 500mL
- Proveta 100mL
- Proveta 10mL
- Espàtula
- Vareta de vidre
- Trespeus
- Reixeta
- Encenedor
- Micropipeta
- Puntetes de micropipeta estèrils
- Pipeta pasteur
- Campana estèril

REACTIUS :

- Solució tamponada estèril
- Potassi hidrogen fosfat

KH_2PO_4

p.m.:136.09 g/mol

puresa:98%

- Sulfat de magnesi

MgSO_4

p.m.:246.48g

puresa:100%

- Medi rothe simple i doble concentrat (R22 , S45)
- Medi àcida i violeta lila (EVA) (R22 , S45)
- SPS
- Aigua destil·lada
- Vaselina estèril

FRASES DE SEGURETAT:

Medi Rothe i EVA:

- R22 nociu per ingestió
- S45 en cas d'accident o malestar anar immediatament al metge (si es possible mostrar etiqueta)

DADES EXPERIMENTALS :

Pesos dels medis

MEDIS DE CULTIU	PES REAL EN GRAMS
-----------------	-------------------

Rothe simple concentrat	8.661
Medi àcida i violeta lila	5.390
SPS	1.500

Resultats de la lectura dels tubs (reactor):

	10	1	10-1	10-2	10-3	10-4	10-5
Rothe	3	3	3	3	3	3	1
EVA	3	3	3	3	3	1	1
SPS	-----	-----	incomptables	1900ufc	3500ufc	No creixement	50000ufc

CÀLCULS I RESULTATS :

Rothe simple

34.7g

250mL x ----- = 8.675 g

1000mL

EVA

35.8g

150mL x ----- = 5.37 g

1000mL

– Taula NMP (311) $75 / 0.01 = 7500\text{ufc}$

Rothe simple

40 g

200mL x ----- = 8.00 g

1000mL

Dilució 10-2

$5 + 33 / 2 = 19$ colònies ; $19 \cdot 100 / 1 = \mathbf{1900\text{ufc}}$

Dilució 10-3

$7 + 2 / 2 = 3.5$ colònies ; $3.5 \cdot 1000 / 1 = \mathbf{350\text{ufc}}$

Dilució 10-4

No es detecta creixement

Dilució 10⁻⁵

$1 + 0 / 2 = 0.5$ colònies ; $0.5 \cdot 100000 / 1 = 50000 \text{ufc}$

Dilució 10⁻² + Dilució 10⁻³ : $1900 + 3500 / 2 = 2700 \text{ufc clostridium}$

OBSERVACIONS I CONCLUSIONS :

- La prova en medi EVA només és fa per a les dilucions que en el medi rothe hagin donat positives.
- Per fer les sembres si se sembra de menys a mes concentrat no cal canviar la punta de la micropipeta.
- La sembra en el medi rothe és per a la determinació presumptiva d'estreptococs fecals.
- A mesura que augmentava la dilució la contaminació era menor.
- La lectura dels tubs era positiva degut al sediment verdós i la turbidesa del medi
- Suposo que aquest aigua té una gran contaminació ja que en totes les dilucions ha sortit almenys un tub positiu.
- Crec que hauríem d'haver elevat el grau de dilució degut a la elevada contaminació del reactor.
- La sembra en el medi EVA és per a la determinació confirmativa d'estreptococs fecals.
- Només es sembren els tubs que han donat positiu a l'anterior prova.
- En els tubs positius es forma turbidesa i sediment blau
- La majoria de tubs han donat positiu en la confirmativa i el nombre de UFC d'estreptococs fecals és de 7500/mL
- Aquest aigua té una elevada contaminació fecal.

ANNEX :

Medi Rothe (34,7 g per litre, esterilitzar 15 minuts a 121°C)

Composició g/L

Sodio azida 0.2

D(+) Glucosa 7.5

Extracte de carn 4.5

Peptona 15.0

Clorur sòdic 7.5

Medi EVA (35.8 g per litre, esterilitzar 15 minuts a 121°C)

Composició g/L

Sodio azida 0.4

D(+) Glucosa 5.0

Violeta de etilo 0.0008

Mescla de Peptona 15.0

Clorur sòdic 5.0

Potasio dihidrogeno fosfato 2.7

Medi SPS (40 g per litre, esterilitzar 15 minuts a 121°C)

Composició g/L

Sulfit de sodi 0.5

Sulfat de polimixina 0.01

Sulfadiazina 0.12

Peptona de caseina 15.0

Extracte de llevadura 10.0

Citrat de ferro 0.5

Agar bacteriològic 13.0