

IES	PG / MICRO / 003	Hoja 1 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO		
C.M.			Fecha: 26-01-2001
Laboratorio			

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la preparación de medios de cultivo.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento podrá aplicarse para la preparación de medios de cultivo en placa o en tubo, recto o inclinado, partiendo de preparados comerciales liofilizados.

### 3.- REFERENCIAS:

- F. CALVO, V. PUIG. *Microbiología*. Ed. Ecir – Valencia.
- E. LEAO DE MATTOS SOUNIS. *Curso práctico de microbiología*. Ed. McGraw–Hill.

### 4.- GENERAL:

La clasificación de los medios es:

- Según su consistencia
  - Sólidos: que llevan una sustancia que se llama agar, que da consistencia sólida y va a ser el soporte de los compuestos necesarios en la nutrición de las bacterias.
  - Semisólidos: tienen menos agar, una proporción de 0.1% a 0.5%.
  - Líquidos: se llaman caldos.
- Según su composición
  - Medios sintéticos: que son medios de cultivo de composición conocida o definida, se utilizan muy poco y suelen hacerse para cultivar una especie de bacterias determinada.
  - Medios generales: tienen una composición en la que crecen la mayor parte de los microorganismos. Aportan los componentes nutritivos más comunes para todas las bacterias. (PCA, TSA, APHA).
  - Medios enriquecidos: son medios generales a los que se les añade sustancias que aumentan su poder nutritivo y pueden crecer heterótrofos exigentes.
  - Medios selectivos: se le adicionan al agar nutritivo, sustancias que inhiben el crecimiento de un grupo de microorganismos, sin aceptar el desarrollo de otras.
  - Medios diferenciales: llevan reactivos que nos permiten diferenciar entre todas las bacterias crecidas unas de otras.
  - Medios de caracterización: se utilizan para identificar bacterias, dan lugar a una respuesta concreta al metabolismo bacteriano.

IES	PG / MICRO / 003	Hoja 2 de 4
Manuel Antonio	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	
		Ed. 0

C.M.

Laboratorio

Fecha:

26-01-2001

La composición de los medios y caldos:

Todos los medios llevan agua, peptonas (que son compuestos intermedios de hidrólisis de las proteínas), extracto de carne (se prepara a partir de carne de vaca troceada y macerada, suministra componentes nitrogenados, también no nitrogenados y alguna vitamina), extracto de levadura (se somete la levadura a una extracción con agua y se evapora, luego a sequedad y tiene la misma función que el extracto de carne pero es mucho más barata), gelatina (se prepara hidrolizando colágeno en agua hirviendo), agar (componente para dar consistencia a los medios, se extrae de esta alga, la *Gelidium corneum*), cloruro sódico (para mantener la presión osmótica), sustancias inorgánicas (Na, K, Ca...), sustancias orgánicas (como fuentes de carbono y nitrógeno fundamentalmente e hidrógeno), productos fermentables (monosacáridos, disacáridos y tienen dos funciones: producir energía y para la identificación y clasificación de los microorganismos).

### 5.-MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Vaso de precipitados	1	
Baño termostático	1	
Agitador magnético	1	
Placas petri	4	PCA
Autoclave	1	TSA
Frasco de vidrio pírex	1	APHA
Nevera	1	Agua
Mechero Bunsen	1	
Cabina de flujo laminar	1	

### 6.- PROCEDIMIENTO:

#### 6.1.- Método operatorio:

- Se pesa la cantidad de medio especificada por el fabricante
- Se vierte el medio en un frasco pírex y se completa con el agua necesaria para completar el medio a preparar
- Se pone a ebullición en un agitador con calefacción.
- Se pasa al autoclave, se esteriliza a 121°C unos 20 min.
- Se deja enfriar hasta unos 55 – 60°C.
- Se llenan las placas y/o tubos.
- Las placas se dejan gelificar (solidificar) tapadas sobre la mesa o en la campana y los tubos se dejan gelificar inclinados.
- Se elimina el vaho (\*) y se guarda en la nevera.

IES

Manuel Antonio

PG / MICRO / 003

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Hoja 3 de 4

Ed. 0

C.M.

Laboratorio

Fecha: 26-01-2001

### 6.2.- Diagrama de flujo:

PESAR MEDIO DE CULTIVO
---------------------------

!

DISOLVER EN AGUA
------------------

!

EBULLICIÓN
------------

!

ESTERILIZAR 121°C, 20MIN
--------------------------

!

ENFRIAR " 60°C

!

RELLENAR PLACAS Y/O TUBOS
---------------------------

!

||

PLACAS		TUBOS
--------	--	-------

!!!

SIEMBRA		NO SIEMBRA
---------	--	------------

!! IGUAL QUE PARA LAS PLACAS

INCUBAR		NEVERA
---------	--	--------

!

OBSERVACIÓN
RECuento...

IES	PG / MICRO / 003	Hoja 4 de 4	
Manuel Antonio	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	Ed. 0	
C.M.			Fecha:
Laboratorio			26-01-2001

### 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

En el frasco pone que es una concentración de 40g/l de TSA

Cogemos 400ml de agua.

40g \_\_\_\_ 1000ml

x \_\_\_\_ 400ml x = 16g de TSA hay que utilizar para preparar el medio.

### 8.-INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Se observará la perfecta gelificación de las placas y tubos sin la formación de grumos, burbujas o fisuras en el gel.

### 9.- ANEXOS:

(\*) Para eliminar el vaho: poner la placa boca abajo y con la tapa apoyada en ésta.

\_\_\_\_\_

|| \_\_\_\_\_ || \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ ||

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 1 de 9
Manuel Antonio		Ed. 0

	MICROORGANISMOS DEL AIRE		
C.M.			Fecha:
Laboratorio			26-01-2001

### 1.- OBJETO:

Es evaluar o determinar la carga de microorganismos que hay en el aire de un recinto de trabajo.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento se va a aplicar para evaluar la carga o la cantidad microbiana de aire en un recinto de trabajo u ocio así como en un ambiente externo.

### 3.- REFERENCIAS:

- F.CALVO, V. PUIG. *Microbiología*. Ed. Ecir – Valencia.
- X. PÉREZ PINTOS, A. SAN JUAN. *Biología en el laboratorio*. Ed. Asig. Xistid.

### 4.- GENERAL:

Según el medio en el que nos situemos vamos a encontrar diferentes microorganismos y diferentes concentraciones. Por ejemplo en un aula como esta hay distinta carga microbiana si el aula está vacía que si el aula está llena de alumnos y a la vez están tosiendo.

También se comprobó que por ejemplo en pinares o bosques la carga microbiana es muy pequeña porque no hay contaminación.

También influye la altura, a nivel de que encontremos microorganismos. Por ejemplo a 500m de altura encontraremos aproximadamente de 1000 a 2500 microorganismos por m<sup>3</sup>. Pero si subimos a 1000 m de altura encontraremos 500 microorganismos aproximadamente y si se sube a una altura de 20Km solo se encuentran esporas o mohos.

En las zonas polares es muy difícil encontrar microorganismos.

Si un animal está enfermo alrededor de él hay muchos microorganismos en el aire y a veces incluso patógenos.

### EL AIRE

El aire es el elemento indispensable para la mayoría de las criaturas vivientes por su componente oxígeno O<sub>2</sub>, que es esencial para las funciones metabólicas. A partir de la Revolución industrial inició un proceso de contaminación acelerado por la quema de combustibles fósiles, debido al desarrollo de proyectos de industrialización. La atmósfera terrestre ha recibido en los últimos ciento cincuenta años una carga de gases y de sustancias

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 2 de 9	
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE	Ed. 0	
C.M.			

más alta de la que ella está capacitada para manejar mediante la biorremediación, el dióxido de carbono, los clorofluorocarbonos CFC, el metano, los óxidos del nitrógeno y el ozono, que hemos estado descargando en la atmósfera durante siglo y medio, combinados con el

proceso acelerado de devastación de los bosques y selvas tropicales han generado el conocido Efecto Invernadero.

Las condiciones creadas a partir del Efecto Invernadero van desde la elevación de la temperatura del planeta, destrucción de la capa de ozono, aumento del cáncer en la piel por irradiación solar, aumento de afecciones respiratorias con preponderancia del asma alérgica y bronquial, afecciones visuales por incidencia de rayos ultravioleta, hasta el desequilibrio en el ciclo hídrico producto de la elevación de la temperatura, produciendo los famosos desastres naturales como inundaciones y sequías, con la secuela de enfermedades bacterianas y víricas que se reactivan al encontrar temperaturas óptimas como son generalmente altas.

Cabe destacar de la gran proliferación de alergias cutáneas y respiratorias de las últimas décadas producto del Efecto Invernadero y de la lluvia ácida producto de los dióxidos de azufre y los óxidos de nitrógeno, esta lluvia ácida que afecta desde embalses de agua hasta la destrucción masiva de cultivos o bosques con su irremediable consecuencia. El dióxido de azufre y los óxidos de nitrógeno, compuestos contaminantes generados por las centrales térmicas que queman carbón o por los automóviles, pasan a la atmósfera. Por efecto de la lluvia, pueden experimentar cambios y caer a la tierra en forma de lluvia o nieve acidificadas. Esta lluvia destruye la flora y la fauna de los ríos, daña los bosques e incluso ataca los muros de los edificios.

Otra preocupación es que el aire es vehículo ideal, para el transporte de una amplia gama de microorganismos patógenos derivados de la descomposición, de los desechos sólidos acumulados en nuestras ciudades y que muchas veces conjugados con otros, desatan brotes infecciosos que por su origen son verdaderos quebraderos de cabeza para los profesionales de la salud.

### CALIDAD DEL AIRE

Al ser el aire uno de los principales vehículos de infección de las personas y de la alteración de los productos alimentarios y farmacéuticos, ya en la década de los 70 se intentó controlar su riesgo potencial desde el punto de vista microbiológico. Se comenzó dejando placas abiertas unos minutos, pero este método carece de repetitividad, es sólo cualitativo y las UFC obtenidas no se pueden relacionar con un volumen determinado de aire.

El aire es, en muchos aspectos, tanto físicos como biológicos, comparable a un océano, con sus masas fluidas diferenciadas, mezclas de masas, turbulencias heterogéneas, plancton/aeroplancton suspendido, bentos ligado a las superficies... Pero también es a menudo comparable con una red hidrográfica con ríos (pasillos), torrentes turbulentos

IES Manuel Antonio	PG / MICRO / 004 MICROORGANISMOS DEL AIRE	Hoja 3 de 9	
C.M. Laboratorio		Ed. 0	Fecha: 26-01-2001

(corredores) y lagunas (salas estancadas). Lo mismo que nadie muestrearía el plancton en un torrente sin hacerlo además en la laguna receptora de aguas estancadas, no se debe limitar un muestreo a las salas, sino que deben tomarse muestras en distintas alturas y rincones de los locales, en sus inmediaciones, puertas y pasillos e incluso en el aire de la calle del edificio.

Desde el punto de vista del muestreo, distinguiremos varios tipos básicos de aire: el de la industria alimentaria y cocinas, el de la industria farmacéutica, quirófanos y demás salas blancas, el de los edificios herméticos, el desinfectado y el que emite contaminantes biológicos.

El aire que respiramos no es una simple mezcla de nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono con vapor de agua. En suspensión se encuentran más o menos numerosas partículas inertes de polvo (las más peligrosas y numerosas son inferiores a 5 micras y se representan en concentraciones superiores a millones por litro en aires confinados), humos y otras impurezas y, lo que es más importante, una más o menos rica flora y fauna denominada aeroplancton.

Ácaros, polen, esporas y microorganismos son componentes naturales del aire, y están inmersos en un ascendente impacto en la salud humana, desde tres puntos de vista: alergias, infecciones e intoxicaciones.

Las partículas inertes donde se concentran antígenos procedentes de ácaros, polen y esporas fúngicas, sobre todo, tanto bacterias, como hongos y como virus, bien patógenos o bien oportunistas, provocan numerosas clases de enfermedades infecciosas o toxigénicas cuyo único vehículo de infección es el aire. De la misma forma que un agua contaminada, aunque con una flora cualitativa diferente, el aire es vehículo de infinidad de enfermedades microbianas transmitidas por él: alergias al polen, a los ácaros, a los mohos; toxinas procedentes de mohos (micotoxinas: aflatoxinas, patulina, tricotecenos...) y de bacterias (endotoxinas estafilocócicas y de clostridios...); infecciones fúngicas (aspergilosis...), bacterianas (legionelosis, tuberculosis, tosferina, difteria, meningitis, enfermedades provocadas por estafilococos, estreptococos, pseudomonas, bacillus y otras cepas nosocomiales mutadas...) y víricas (gripe, sarampión, meningitis, resfriados comunes...).

Por ello es imprescindible conocer la calidad microbiana de un aire confinado, como el más elemental mecanismo de prevención de enfermedades. Más grave aún se presenta el tema en los lugares de alto riesgo para personas inmunodeprimidas, como guarderías, residencias de ancianos, quirófanos y U.V.I., sobre todo.

Por otro lado, no menos importante, numerosos microorganismos son alternativos de alimentos; su control es necesario en las fábricas, cocinas, cámaras frigoríficas; De nada sirve controlar el alimento y sus materias primas si durante su posterior empaquetado o transporte se contamina con microorganismos indeseables. La imagen de la empresa está en juego. Un queso, un salchichón excelentes, son invendibles cuando, tras una fabricación esmerada, se ven invadidos por mohos verdes en su almacenamiento o transporte. Si la

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 4 de 9	Fecha: 26-01-2001
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

industria hubiese controlado periódicamente la calidad microbiológica del aire, habría sabido que tenía que cambiar de desinfectante ambiental.

Los laboratorios y las fábricas de medicamentos son especialmente sensibles a la presencia de todo tipo de aeroplancton contaminante, por lo que deben ser los más estrictos en su control.

Podemos clasificar los contaminantes biológicos del aire como:

- Seres vivos: bacterias, levaduras, mohos, virus, protozoos (amebas) y artrópodos (ácaros).
- Subproductos biológicos (polen, esporas, pelos, caspa, excrementos y cadáveres de insectos, arácnidos, madera, papel, plumas, endotoxinas bacterianas, micotoxinas fúngicas...)

El origen de estos contaminantes biológicos es, por orden decreciente de importancia:

- Las personas son las fuentes más impresionantes de contaminantes biológicos.
- Polvo (de papel, sobre todo) y otras suciedades (tierra de las macetas).
- Entrada de aire exterior mal ubicada junto a la salida del aire interior, cocinas, WC.

La proliferación de estos contaminantes biológicos se da en las zonas húmedas del edificio (humedades, aguas estancadas en bandejas de recolección que no drenan y proceden de torres de refrigeración, humidificadores...), filtros de aire, moquetas, cortinas textiles, pinturas porosas.

Las medidas preventivas serán las que disminuyan tanto el origen como la proliferación de contaminantes biológicos: menor densidad de población por sala, limpieza, no incluir aire exterior contaminado biológicamente, mantener unas condiciones de humedad ambiental nunca superiores al 70% de Humedad Relativa, eliminar las goteras e infiltraciones inmediatamente que se detectan, mantenimiento de filtros para que no se rompan (en tal caso se convierten en lo opuesto para lo que se han diseñado, en emisores de concentrados en vez de eliminadores), diseño sin material textil ni material poroso, reducir proporción de aire interno contaminado recirculado.

Interpretación sobre la legislación sobre agentes biológicos: la legislación se ha actualizado en el Real Decreto 664/97 de 12/5/97, adaptación de las Directivas de las Comunidades Europeas 90/679, 93/88 y 95/30 (BOE 124 de 24 de Mayo de 1997). Una de las novedades más sobresaliente es que no considera como agente biológico solamente aquellos microorganismos capaces de producir enfermedades infecciosas, sino además aquellos microorganismos y/o subproductos biológicos que pueden originar alergias o toxicidad. El ámbito de aplicación es cualquier trabajo en que se pueda estar expuesto a agentes biológicos.

Es importante definir que, en este sentido hay dos tipos de trabajadores: con decisión consciente de trabajar con microorganismos (los microbiólogos y biotecnólogos,

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 5 de 9	Ed. 0
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE		
C.M.			Fecha: 26-01-2001
Laboratorio			

básicamente) y aquellos cuya exposición sería accidental: mantenimiento de aires acondicionados por ejemplo, que al limpiar el filtro se exponen a los microorganismos allí concentrados pero no trabajan conscientemente con ellos, o bien personal de las depuradoras de aguas residuales, cuya función es depurar agua, no trabajar junto al aerosol microbiano que el agua residual emite; o bien empleados de tiendas de animales de compañía, cuya función es comercializar periquitos, no respirar la mortal clamidia que puedan contener sus heces o bien los operarios de mataderos, cuyo trabajo es sacrificar animales para consumo o destrucción, no exponerse a sus enterobacterias y a sus enfermedades...

## INDICADORES DE CONTAMINACIÓN DEL AIRE

Como regla muy simple, ningún aire sucio debe contener más de 1000 microorganismos por metro cúbico. Ningún aire en lugares más limpios (oficinas, cocinas, salas de espera...) debe tener más de 100 ufc/m<sup>3</sup>.

Tan importante como el recuento total es la identificación de la flora. La identificación de los microorganismos aislados mediante el muestreo ambiental juega un papel fundamental a la hora de determinar posibles fuentes de contaminación, así como para poder estudiar cuales serán los desinfectantes más adecuados. En general, se puede establecer que las bacterias Gram negativas son indicadoras de problemas de contaminación en el agua, los cocos Gram positivos indican contaminación de origen humano y los bacilos Gram positivos esporulados, las levaduras y los mohos son indicadores de contaminación a partir del suelo.

Hongos:

Además es muy importante realizar un recuento selectivo de hongos (levaduras y mohos). La significación de la contaminación fúngica por mohos proviene no sólo del potencial de los hongos para deteriorar los alimentos (capacidad alterativa), sino también del potencial de muchos de ellos para producir gran variedad de micotoxinas, metabolitos fúngicos con actividad tóxica a los que el ser humano es susceptible, así como de su capacidad para provocar reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos y de su poder patogénico (micosis). La contaminación por hongos es un serio problema en ambientes cerrados, pequeños, mal ventilados o húmedos. Un incorrecto uso del aire implica la proliferación de levaduras y mohos. Estos microorganismos alteran las propiedades organolépticas de los alimentos; algunos producen terribles toxinas cancerígenas y la respiración de altas concentraciones de esporas fúngicas se asocia a procesos de reacciones alérgicas, hipersensibilidad e incluso asma. Son los microorganismos más asociados al síndrome del edificio enfermo. Sus esporas son fácilmente dispersadas por el aire. Del mismo modo que en las bacterias, en los hongos es fundamental la identificación y cuantificación.

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 6 de 9	Fecha: 26-01-2001
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

Los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* son los que elaboran las micotoxinas más importantes, entre las que cabe enumerar: aflatoxinas, patulina, tricoterrenos, ocratoxinas, zearalenona, ácido penicílico...

*Legionella pneumophila*:

Adquiere especial importancia en lugares públicos la búsqueda de *Legionella pneumophila*, bacteria Gram negativa típica de los aerosoles aire-agua (duchas, aires acondicionados, humidificadores, riesgos por aspersión, fuentes públicas...) asociada a fiebres de Pontiac y neumonías, que en personas inmunodeprimidas puede llevar a la muerte. Los brotes más significativos tienen lugar en edificios con aire acondicionado contaminado y cerca de torres de refrigeración (existe un claro gradiente decreciente de incidencia al alejarse unas decenas de metros). Su erradicación es difícil, dada su resistencia al cloro al refugiarse dentro de amebas y en el biofilm. Parece que el tratamiento preventivo con agua a 60°C, combinado con la hipercloración y la eliminación de biofilms es un método más efectivo.

Así pues en aire es recomendable buscar:

- Recuento total bacteriano (indicador de la higiene general, endotoxinas e infecciones bacterianas).
- Hongos (alergias, micotoxinas y aspergilosis): Recuento e identificación.
- *Legionella pneumophila* (legionelosis): Presencia.

- Micobacterias (tuberculosis de los diversos *Mycobacterium*): Presencia.

Los microorganismos pueden ser:

FORMA	PUNTEADA	CIRCULAR	FILAMENT	IRREGUL	RIZOIDE	
ELEVAC.	PLANA	ELEVADA	CONVEXA	PULVINAD	UMBILICAD	
BORDES	LISOS	ONDULADO	LOBULADO	DESGAST	FILAMENT	ESTRIADO

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 7 de 9	Ed. 0	Fecha: 26-01-2001
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE			
C.M.				
Laboratorio				

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Placas petri	2	PCA
Estufa de incubación	1	
Contador de colonias	1	
Microscopio óptico	1	

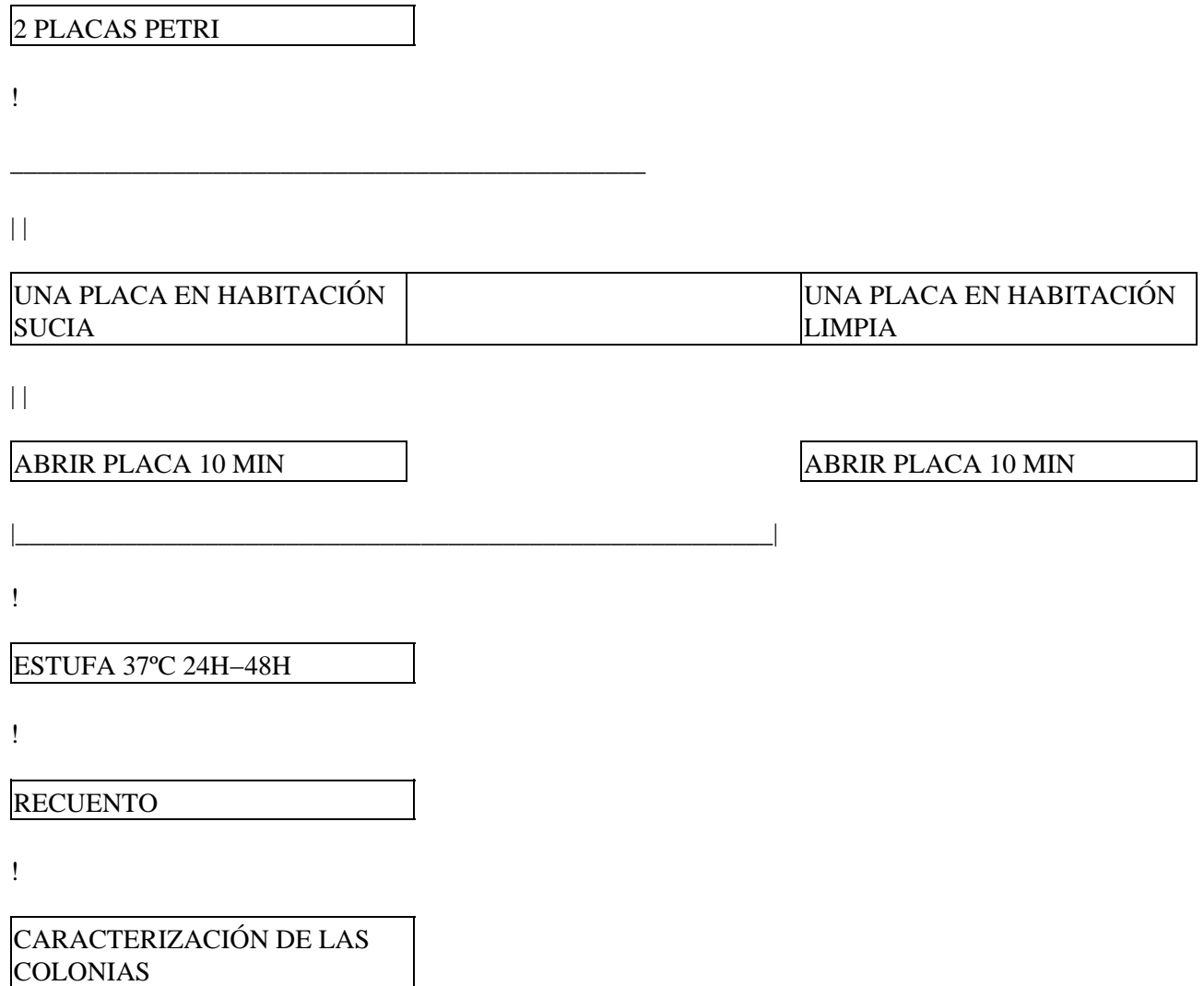
## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- Tomamos dos placas petri y se rellenan con el PCA.
- A continuación, una placa se abre en la habitación que deseamos saber la carga microbiana que contiene durante 10 min., al cabo de ese tiempo la cerramos (en habitación sucia).
- Hacemos lo mismo con la otra placa después de haber limpiado la habitación (en habitación limpia).
- Metemos las placas en la estufa de incubación a 37°C durante 24-48 horas.
- Al cabo de ese tiempo se hace un recuento de las colonias aparecidas en cada una de las placas (manualmente o con contador).
- Observar la caracterización de las colonias.

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 8 de 9	Ed. 0	Fecha: 26-01-2001
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE			
C.M.				
Laboratorio				

## 6.2.- Diagrama de flujo:



## 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Al no contemplarse cálculos no procede estimar incertidumbres.

## 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

En la placa en sucio se contaron 7 colonias en placa. Una de ellas era grande de color blanco, con forma irregular, tenía una pequeña elevación y sus bordes eran ondulados.

Las otras 6 eran amarillas, en comparación con la anterior eran pequeñas, con forma circular, con elevación convexa y bordes lisos.

En la placa en sucio aparecen dos pequeñas colonias, similares a las de las placas en sucio. Una de ellas era amarilla, circular, convexa y con bordes lisos. La otra era aproximadamente un poco más grande que un punto producido por un bolígrafo, pero más pequeña que la anterior y era igual que la blanca comentada antes, irregular, elevación pequeña y bordes ondulados.

IES	PG / MICRO / 004	Hoja 9 de 9
-----	------------------	-------------

Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DEL AIRE	Ed. 0	
C.M.			Fecha:
Laboratorio			26-01-2001

### 9.- ANEXOS:

La microflora del aire consta de una gran variedad de especies que llegan al aire procedentes del suelo, plantas, animales.

Se suelen encontrar:

- *Bacillus (subtilis, magaterium y careus)*.
- *B. Antracis* no lo vamos a encontrar.
- *Actinomicetos* son bacterias parecidas a hongos, son GRAM+ y forman colonias ramificadas.
- Levaduras y mohos.
- Enterobacterias suelen ser de color negro.
- *Halorum* son de color rojo.
- *Micrococos*, son de color amarillo
- *Streptococos* son de color blanco y los más típicos son el *pyógenes, salivarius, fecalis*.

IES	PG / MICRO / 005		
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DE LA BOCA	Hoja 1 de 3	
C.M.		Ed. 0	Fecha:
Laboratorio			26-01-2001

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es eliminar la carga microbiana de la boca y una posterior tinción diferencial.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento podrá aplicarse para la siembra de todo tipo de microorganismos aerobios y anaerobios facultativos excepto esporulados.

### 3.- REFERENCIAS:

- K.PIATKIN y otros. *Microbiología*. Ed. MIR– Moscú.
- E. SOUNIS. *Curso práctico de microbiología*. Ed. McGraw–Hill.
- CALVO Y PUIG. *Microbiología*. Ed. ECIR – Valencia.
- INGRAHAM E INGRAHAM. *Introducción a la microbiología*. Ed. Reverté.

### 4.- GENERAL:

La cavidad de la boca es un medio de cultivo excelente para los microorganismos porque tiene: temperatura idónea (37°), humedad, sustancias nutritivas y reacción débilmente básica que para las bacterias es idónea.

En la boca hay 160 especies distintas de microorganismos, y los que se encuentran habitualmente son: *Lactobacillus acidophilus*, *Treponema macrodentium*, *Streptococos* spp (distintas especies), *micrococos* spp.

También entran por el aire o por la comida y cada clase de microorganismos coloniza una parte de la boca. Por ejemplo: *Streptococcus salivarius* que está en la saliva, *Streptococcus mutans* y *sanguis* que están en los dientes, *Streptococcus minor* que está en los carrillos por dentro, *Bacillus melaninogenicus* y *Streptococcus mitis* que están entre los dientes y las encías.

Muchos están en la boca y son inofensivos pero hay otros que producen enfermedades como: caries, gingivitis. Enfermedades periodontales: estomatitis, periodontitis y paradontosis.

La caries es una enfermedad que produce la destrucción de los tejidos duros del diente, hay dos microorganismos que la producen que son: *Streptococcus mutans* y el *S. Sanguis*.

El *S. mutans* es un microorganismo con muchísimas cualidades para producir caries:

- Posee cápsula, que lo defiende de la saliva y se pega.

IES	PG / MICRO / 005	Hoja 2 de 3	Fecha: 26-01-2001
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DE LA BOCA		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

- Degrada la sacarosa (C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>) y da fructosa y glucosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> + C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Con la fructosa se alimenta, le sirve como energía y carbono, y

con la glucosa prepara un polímero que se llama glucano que lo forma en placa dental.

- Como resultado de su alimentación da lugar a ácidos que atacan el esmalte dental y así ayudan a la caries.

Los factores que influyen en el desarrollo de la caries son normalmente:

- Genéticos.
- Alimenticios.
- Fluoración de las aguas, si tienen más fluor está más protegida la boca.

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Asa de siembra	1	PCA, TSA o APHA
Placas Petri	2	
Mechero Bunsen	1	

Estufa de incubación	1	
Contador de colonias	1	
Lupa binocular para observación	1	

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1. Método operatorio:

- Se esteriliza un asa de siembra.
- Tocar dientes y/o encías.
- Hacer una siembra en estría.
- Cerrar e invertir la placa.
- Incubar 24–48h a 37°C.
- Recuento y observación de las colonias.
- Guardar la placa para realizar una tinción de GRAM.

IES	PG / MICRO / 005	Hoja 3 de 3	Ed. 0
Manuel Antonio	MICROORGANISMOS DE LA BOCA		
C.M.			Fecha: 26-01-2001
Laboratorio			

### 6.2.- Diagrama de flujo:

RASPAR SUAVEMENTE DIENTES Y ENCÍAS

!

SEMBRAR EN ESTRÍA

!

INCUBAR 37°C 24–48H

!

RECUENTO

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS

TINCIÓN DE GRAM

## 7.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Podemos ver colonias coloreadas o medios coloreados. Tienen color (pigmentación intracelular) las colonias:

- Blancas: *Streptococos*
- Amarillas: *Micrococos*
- Rojo y naranja: *Halorum salinarum*
- Negro: *enterobacterias*

El *Estafilococos aureos* es tóxico, se encuentra en la crema pastelera y es del mismo color.

Dan color al medio (pigmentación del medio):

- *Pseudomonas chlororaphis*: verdoso.
- *Pseudomonas aeruginosa*: verde azul que pasa a color café.

## 8.– ANEXOS:

Se realizará la tinción de GRAM a las bacterias.

IES	PG / MICRO / 006	Hoja 1 de 4	Ed. 0	Fecha: 09-02-2001
Manuel Antonio	TINCIÓN DE GRAM			
C.M.				
Laboratorio				

## 1.– OBJETO:

El objeto del presente documento es realizar la tinción de GRAM.

## 2.– ALCANCE:

El objetivo es aplicar la tinción de GRAM en todo tipo de bacterias.

## 3.– REFERENCIAS:

- E. LEAO DE MATTOS. *Curso práctico de microbiología*. Ed. McGraw–Hill.
- K.PIATTIN y KROOSHEIM. *Microbiología*. Ed. Moscú.
- INGROHAM E INGRAHAM. *Introducción a la microbiología*. Ed. Reverté.

## 4.– GENERAL:

La tinción de GRAM es la que más se emplea en microbiología y es una tinción diferencial que permite la separación o clasificación de las bacterias en dos grupos: Gram+ y Gram–.

El distinto comportamiento en la tinción se piensa que es debido a las diferentes capas superficiales o paredes de las dos bacterias (tipos de células).

En el proceso de tinción vamos a emplear 4 tipos de soluciones, que son:

- El cristal violeta (Vc), que es un colorante básico.
- Lugol (I2 + KI), que sirve para reforzar o potenciar la acción del cristal violeta.

- Alcohol, sirve para decolorar las células que están teñidas.
- Solución de contraste (fucsina 30s, safranina 1min) y es la que nos va a diferenciar el color final.

Los microorganismos no se decoloran fácilmente sino que retienen el color del colorante inicial (básico), las células que retienen este colorante básico inicial, son las que van a quedar teñidas de color violeta, mientras que las demás van a quedar de color rojizo.

Esto se debe a la diferencia en su pared celular y básicamente hay dos causas de diferencia que son:

- A la cantidad de fosfolípidos que tienen las Gram- es mayor que las Gram+.
- A los peptidoglicanos, que es mayor en las Gram+ que en las Gram-.

El alcohol en las Gram- va a extraer los lípidos de la pared con lo cual aumentan los

poros de esa pared y sale el colorante de cristal violeta. En las Gram+, que tienen menos lípidos, ocurre una deshidratación de la pared y por lo tanto disminuyen los poros de la pared, entonces no sale el cristal violeta.

IES	PG / MICRO / 006	Hoja 2 de 4	Fecha: 09-02-2001
Manuel Antonio	TINCIÓN DE GRAM		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

La fucsina es un colorante de contraste, en las Gram- va a quedar teñida de color rojo o rojizo y en las Gram+ queda de color azul (violeta).

Las Gram-, tienen gran cantidad de lípidos en su pared, el alcohol los extrae, origina grandes poros en su pared y a través de ellos el complejo cristal violeta – yodo, puede salir permitiendo que en su lugar sea ocupado por el colorante fucsina tomando por tanto un color entre rojo y rosado.

Las Gram+, al actuar el alcohol se produce deshidratación. Al complejo cristal violeta – yodo debido a que disminuyen los poros de la pared y quedan teñidos de color púrpura – violeta.

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Asa de siembra	1	Disoluciones de:  <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lugol</li> <li>• Fucsina</li> <li>• Alcohol</li> <li>• Cristal Violeta</li> </ul> Aceite de cedro
Mechero Bunsen	1	
Cubeta de tinción	1	
Portaobjetos	1	
Microscopio óptico	1	

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- Ponemos una gota de agua en el portaobjetos e inoculamos el material de estudio (secar al aire).
- Fijar el material al portaobjetos de modo que no sea arrastrado en el proceso de tinción (pasarle 4–5 veces por la llama).
- Colocar el portaobjetos sobre la cubeta de tinción y cubrir su superficie con el cristal violeta (Vc).
- Dejar actuar el Vc durante 1min y después lavar con agua.
- Coger el porta entre los dedos pulgar e índice y lavar con alcohol hasta que no se arrastre más color violeta (15–20s como mucho).
- Lavar con agua y dejar una fina capa sobre el preparado. A continuación cubrir con el colorante de contraste (fucsina), aproximadamente 30 segundos.
- Se lava con agua y se deja escurrir en posición vertical el exceso.
- Secar al aire.
- Poner una gota de aceite de cedro y observar al microscopio.

IES

Manuel Antonio

PG / MICRO / 006

TINCIÓN DE GRAM

Hoja 3 de 4

Ed. 0

C.M.

Laboratorio

Fecha: 09–02–2001

### 6.2.– Diagrama de flujo:

IES	PG / MICRO / 006	Hoja 4 de 4	Fecha: 09–02–2001
Manuel Antonio	TINCIÓN DE GRAM		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

### 7.– CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Al no contemplarse ningún tipo de cálculo no da lugar a la interpretación de incertidumbres.

### 8.– INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Según sea la muestra a analizar se pueden observar bacterias fuertemente teñidas o débilmente teñidas. En este caso se veían fuertemente teñidas de color fucsia que serían las Gram–, además de verse agrupadas, la colonia antes de la tinción era blanca.

En la segunda tinción sucede lo mismo pero la colonia era de color amarillo antes de la tinción.

En la tercera tinción era de color fucsia pero antes de la tinción era de color amarillo.

## 9.- ANEXOS:

La tinción de Gram es muy útil, ya que de una manera muy rápida podemos diferenciar las bacterias o nos va a servir para ver una posible infección y saber si se trata de endotoxinas (producidas por Gram- tóxicas) o bien de exotoxinas (Gram+ tóxicas muy superiores).

IES	PG / MICRO / 002	Hoja 1 de 4	Ed. 0	Fecha: 23-01-2001
Manuel Antonio	LOS MICROORGANISMOS DEL YOGUR			
C.M.				
Laboratorio				

## 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la observación microscópica de los microorganismos del yogur.

## 2.- ALCANCE:

Este procedimiento podrá aplicarse para la observación de los microorganismos del yogur.

## 3.- REFERENCIAS:

- X. PÉREZ PINTOS, A. SAN JUAN. *Biología en el laboratorio*. Ed. ASPG-Xistral.
- ETHEL HANXUER. *Biología para principiantes*. Ed. Esterning publistring. Co. INC.
- E. ESPREER. *Lactología industrial*. Ed. Acribia. Zaragoza.

## 4.- GENERAL:

Se entiende por yogur (yoghourt) el producto de leche coagulada, obtenida por fermentación láctea mediante la acción del *Lactobacillus vulgaricus* y el *Streptococcus termophilus* a partir de la leche pasteurizada.

Los microorganismos productores de la fermentación láctea deben estar vivos y estar presentes en el producto terminado en una cantidad mínima de 10 millones de microorganismos/ml o por gramo de producto:

1.  $10^7$  o / ml 1.  $10^7$  o / g

La composición química del yogur sería que la leche es fermentada por la acción de las bacterias citadas. La lactosa es transformada en ácido láctico y este ácido desnaturaliza a la caseína, como subproductos de esta fermentación aparecen sustancias aromáticas de buen sabor: glucosa o lactosa (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Al producirse el ácido láctico, el yogur adquiere un pH bajo menor que 7, que ayuda a la conservación del yogur e impide que el yogur sea contaminado por otros microorganismos.

Las propiedades del ácido láctico (CH<sub>3</sub>-CHOH-COH) son:

- Baja significativamente el contenido en lactosa del producto.
- Aumenta la concentración de ácido láctico que pasa de 0% al 1%.

- Aumenta el contenido en proteínas sencillas y aminoácidos libres.

IES	PG / MICRO / 002	Hoja 2 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	LOS MICROORGANISMOS DEL YOGUR		
C.M.			Fecha: 23-01-2001
Laboratorio			

- La acidificación provoca una precipitación muy fina de la caseína, lo cuál mejora su digestibilidad. Modifica el contenido en vitaminas, desaparecen algunas vitaminas de la leche y aparecen otras como la vitamina K que posee propiedades antihemorrágicas.

Por lo tanto, el producto final es un alimento predigerido que confiere al yogur su fácil digestión.

### 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Asa de siembra	1	
Mechero Bunsen	1	
Portaobjetos	1	Yogur bio natural
Cubreobjetos	1	Mezcla alcohol-acetona 1:1
Microscopio	1	Disolución azul de metileno
Cuentagotas	1	
Cubeta y soporte	1	

### 6.- PROCEDIMIENTO:

#### 6.1.- Método operatorio:

- Se coloca una gota de agua sobre el porta.
- Se toma una pequeña porción de yogur con un asa de siembra, se mezcla con el agua del porta y se extiende dejando una capa muy fina.
- Se fija la preparación a la llama de un mechero Bunsen hasta la sequedad.
- Se lava con disolución de alcohol-acetona 1:1 para arrastrar la grasa.
- Tinción simple: se cubre la preparación con azul de metileno durante 4 min.
- Se lava la preparación con agua y se coloca un cubre.
- Se observa la preparación en el microscopio con el menor aumento, pasando al máximo aumento (objetivos secos).

IES	PG / MICRO / 002	Hoja 3 de 4
Manuel Antonio	LOS MICROORGANISMOS DEL YOGUR	
		Ed. 0

C.M.
Laboratorio

Fecha: 23-01-2001
----------------------

## 6.2.- Diagrama de flujo:

IES	PG / MICRO / 002	Hoja 4 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	LOS MICROORGANISMOS DEL YOGUR		
C.M.			Fecha: 23-01-2001
Laboratorio			

## 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Al no contemplarse ningún cálculo no da lugar a la interpretación de incertidumbres.

## 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Se observan bacterias muy abundantes, en forma de bastoncitos (*Lactobacillus vulgaricus*) y rosarios ó series de cocos (*Streptococcus thermophilus*).

IES	AG / MICRO / 003	Hoja 1 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES		
C.M.			Fecha: 06-03-2001
Laboratorio			

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la realización de un recuento total de bacterias aeróbicas mesófilas en aguas naturales y de consumo.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento podrá aplicarse para la realización de recuentos aeróbicos de mesófilos en aguas naturales y de consumo no tratadas por procedimientos de potabilización. Mediante esta técnica también se podrá realizar recuento de mesófilas aeróbicas en leches, preparados lácticos, alimentos líquidos y bebidas no alcohólicas.

### 3.- REFERENCIAS:

- JESÚS GUINEA, JOSÉ SANCHO, R. PARES. *Análisis microbiológico de aguas*. Ed. Omega.
- BOE (13-08-83 y 13-05-87). *Parámetros microbiológicos*.
- BOE (21-01-82). *Toma de muestra de aguas*.

### 4.- GENERAL:

Bacterias aerobias son todas las bacterias heterótrofas, aeróbicas y anaerobias facultativas, mesófilas y

psicrótrofes, capaces de crecer en un medio de Agar nutritivo.

El fundamento se basa en contar el número de colonias desarrolladas en una placa con medio de cultivo sólido al que se ha sembrado por vertido un volumen conocido de agua problema, se incuba a una temperatura apropiada durante un tiempo apropiado.

En este procedimiento se determina el número total de gérmenes sin especificar si es o no patógena. Un recuento total bajo no asegura que la muestra esté exenta de patógenos o sus toxinas, tampoco un recuento alto significa que halla microorganismos patógenos. Pero si hay un recuento alto puede significar:

- Que la materia prima (el agua) está excesivamente contaminada.
- La posibilidad de que halla patógenos, ya que la mayoría de los patógenos son mesófilos.
- Tasas superiores a 106 gérmenes/ml indican contaminación en alimentos.

Por lo tanto un recuento alto de microorganismos puede indicar contaminación por bacterias extrañas al sistema y un recuento bajo suele indicar que la muestra está en buenas condiciones.

IES	AG / MICRO / 003	Hoja 2 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	RECUESTO AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES		
C.M.			Fecha: 06-03-2001
Laboratorio			

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Mechero bunsen	1	
Placas petri	4	
Pipeta automática	1	Medio de cultivo general
Estufa a 37°C	1	Agua
Estufa a 22°C	1	
Contador de colonias	1	

## 6.-PROCEDIMIENTO.

### 6.1.- Método operatorio:

- Se prepara el medio de cultivo según PG / MICRO / 003.
- Se vierte el medio sobre las dos placas petri, se deja enfriar el medio hasta aproximadamente 50°C (atemperar).
- Se vierte sobre una de las placas 1ml de agua problema y sobre otra de las placas 0'1ml de agua problema. Tapamos la placa.
- Agitar sobre un minuto y precaución que el medio no suba sobre las paredes de la placa.
- Dejar solidificar, invertir y se introducen en la estufa de incubación, se incuban a 37°C, 48 horas.

- Después de ese tiempo se cuentan las colonias.

IES	AG / MICRO / 003		
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES	Hoja 3 de 4	
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			Fecha: 06-03-2001

### 6.2.- Diagrama de flujo:

IES	AG / MICRO / 003		
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES	Hoja 4 de 4	
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			Fecha: 06-03-2001

### 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Si se ha sembrado más de una placa se seleccionará la que tenga entre 30 y 300 colonias descartando las de más. El recuento no se hará en placas que tengan menos de 30 colonias excepto en el caso de los que se han sembrado con agua sin diluir.

Este método sólo es indicativo de la potabilidad o no potabilidad en cuanto al recuento, sin tener en cuenta el resto de los parámetros.

### 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Transcurridas las 48 horas de incubación se cuentan las colonias:

0'1ml a 37°C = tiene muchas colonias, son incontables (rosas, amarillas y blancas)

1ml a 37°C = incontable (rosas, amarillas y blancas).

### 9.- ANEXOS:

Para determinar las bacterias aerobias a 22°C se seguirá la misma pauta descrita en este procedimiento con excepción de la temperatura y del tiempo de incubación que será 72°C.

0'1ml a 22°C = tiene pocas colonias (blancas)

1ml a 22°C = es incontable (rosas, amarillas y blancas).

IES	AG / MICRO / 004		
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS	Hoja 1 de 4	
		Ed. 0	

	NATURALES POR FILTRACIÓN	
C.M. Laboratorio		Fecha: 23-03-2001

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la realización de un recuento total de bacterias aerobias mesófilas en aguas naturales y de consumo por filtración.

### 2.- ALCANCE:

Se puede aplicar este procedimiento para realizar recuentos aerobios de mesófilos en aguas naturales y de consumo que no hayan sido tratadas por procedimientos de potabilización y mediante esta técnica también podemos realizar recuentos aerobios de mesófilos en leches preparados lácteos, alimentos líquidos y bebidas no alcohólicas.

### 3.- REFERENCIAS:

- EMILIO SOUNIS. *Curso práctico de microbiología*. Ed. McGraw-Hill.

### 4.- GENERAL:

La temperatura a 37°C tiene alguna relación con los microorganismos patógenos porque es la temperatura corporal (TOC).

Si hay un número muy elevado puede ser que la membrana esté contaminada o que la muestra esté contaminada momentáneamente.

El agua en su estado puro no es un medio adecuado. El agua natural que vamos a usar prácticamente proviene de dos fuentes que pueden ser a nivel de superficie de lagos y ríos y otra que puede ser de aguas subterráneas (pozos).

La contaminación del agua que vamos a analizar no es de microorganismos que caen con el agua de lluvia, ni de los que arrastre del suelo sino de los posibles desechos o desperdicios humanos, domésticos o industriales.

Esos desperdicios serían convenientes tratarlos para eliminar los microorganismos patógenos o malos olores.

IES	AG / MICRO / 004	
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES POR FILTRACIÓN	Hoja 2 de 4
C.M. Laboratorio		Ed. 0
		Fecha: 23-03-2001

### 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Mechero bunsen	1	APHA medio de cultivo

Equipo de filtración estéril	1	
Estufa de esterilización	1	
Contador de colonias	1	
Filtro de membrana estéril	1	
Pinzas estériles	1	
Bomba de vacío	1	
Estufa de incubación a 37°C	1	
Estufa de incubación a 22°C	1	

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- Preparar el medio de cultivo según el PG / MICRO / 003.
- Esterilizar los elementos del sistema de filtración que vayan a estar en contacto con el agua que vamos a analizar (en una estufa de esterilización a 130°C 20min).
- Colocar el filtro de membrana en el soporte de filtración utilizando unas pinzas estériles (estufa o llama).
- Se filtran 100ml de muestra o de una disolución, se homogeneiza y se filtra al vacío. Si se hace disolución, la disolución a realizar va a depender de la concentración de bacterias esperadas en la muestra. Para diluir la muestra se usará agua de triptona estéril.
- Finalizado el proceso se lavará el filtro con 30ml de esta agua de triptona.
- Mediante unas pinzas estériles se transfiere la membrana filtrante al medio de cultivo de modo que la superficie de filtración quede hacia arriba.
- Se invierte la placa y se incuba a 37°C durante 48horas.
- Se valúa y se interpretan los resultados.

IES	AG / MICRO / 004	Hoja 3 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES POR FILTRACIÓN		
C.M.			
Laboratorio			Fecha: 23-03-2001

### 6.2.- Diagrama de flujo:

IES	AG / MICRO / 004	Hoja 4 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	RECuento AERÓBICO TOTAL EN AGUAS NATURALES POR FILTRACIÓN		
C.M.			
			Fecha:

**7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:**

Si se han filtrado sobre más de un filtro (disco o membrana), se seleccionará la placa que contenga entre 30 y 300 colonias, descartando las demás. El recuento no se efectuará en placas que tengan menos de 30 colonias excepto en aquellas en que hallamos depositado un filtro o un disco, sobre el que se ha filtrado agua sin diluir.

Este método sólo es indicativo de la potabilidad en cuanto a recuento sin tener en cuenta los otros parámetros.

**8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se cuentan las colonias contenidas en el filtro; es recomendable el uso de una luz blanca que incida en el costado de la placa para así obtener un buen contraste entre colonias y el filtro.

VALORES PERMITIDOS	AGUAS POTABLES DE CONSUMO PÚBLICO		AGUAS DE BEBIDAS	AGUAS ENVASADAS
	AGUAS DE CONSUMO	AGUAS ACONDICIONADAS	PUNTO DE ALUMBRAMIENTO	DESPUÉS DEL EMBASADO
INCUBADAS A 37°C	10 UFC/ml	5 UFC/ml (máx. 20)	5 UFC/ml	20 UFC/ml
INCUBADAS A 22°C	100 UFC/ml	20 UFC/ml (máx. 100)	20 UFC/ml	100 UFC/ml

En donde UFC es unidad formadora de colonias.

Si se han observado muchas colonias indica que posiblemente el agua esté contaminada o se presume que esté contaminada aunque la existencia de muchos microorganismos no implica que necesariamente sean patógenos.

**9.- ANEXOS:**

Esta técnica descrita puede ser utilizada para otras muchas aplicaciones por ejemplo: podemos examinar grandes volúmenes de agua, casi cualquier volumen teóricamente y los microorganismos de cualquier tamaño quedarán retenidos en el disco. Podemos observar que esta membrana se puede pasar de un medio a otro con el objeto de seleccionar y diferenciar los microorganismos. Se pueden obtener resultados más rápidos que con medios convencionales, se pueden lograr estimaciones cuantitativas de ciertos tipos de bacterias como: coliformes, siempre y cuando utilicemos el medio adecuado.

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 1 de 5	Ed. 0
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA		
C.M.			Fecha: 03-04-2001
Laboratorio			

**1.- OBJETO:**

El objeto del presente documento es la realización de recuento de coliformes en aguas naturales y de consumo por el método del nº más probable (NMP).

## 2.- ALCANCE:

Este procedimiento podrá aplicarse para recuentos de coliformes en aguas naturales y de consumo no tratadas por procedimiento de potabilización.

## 3.- REFERENCIAS:

- JESÚS GUINEA, JOSÉ SANCHO, RAMÓN PARES. *Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados*. Ed. Omega. S. A.
- BOE nº139 (13-08-83). *Aguas de consumo público*.
- BOE nº226 (20-09-1990). *Aguas de consumo público*.
- BOE nº114 (13-05-87). *Aguas de bebida envasadas*.
- BOE nº178 (26-07-1991). *Aguas de bebida envasadas*.

## 4.- GENERAL:

El grupo de los coliformes se define en bacteriología como bacterias de la familia enterobacteriaceae, de forma bacilar (aerobias o anaerobias facultativas), algunas móviles, Gram -, no forman esporas y son capaces de fermentar la lactosa a 37° con desprendimiento de gas y formación de ácido. Los géneros que componen este grupo de coliformes son: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*... todos estos microorganismos menos la *Escherichia coli* pueden existir como saprófitos o ser de origen fecal. *E. coli* sólo puede existir en un intestino, fuera de ese hábitat vive muy poco.

Los coliformes se clasifican en 2 grupos: coliformes totales y coliformes fecales. Los coliformes totales son bacterias de forma bacilar, Gram -, etc., que fermentan la lactosa a 37° con producción de ácido y gas. Los coliformes fecales son bacterias de forma bacilar, Gram -, etc., que fermentan la lactosa a 44° con producción de ácido y gas, el ejemplo de estas últimas es *E. coli*. (37° y 44°) y es seguro que hay contaminación fecal.

Los coliformes totales positivos en análisis de aguas indica contaminación pero no especifica su origen. Los coliformes fecales, es decir, *E. coli* indica contaminación fecal reciente.

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 2 de 5
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA	
C.M.		Ed. 0
Laboratorio		Fecha: 03-04-2001

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Tubos de ensayo grandes 20x200	9	Caldo lactosado
Serotap	9	Púrpura de bromocresol
Campanas Durham	9	
Pipetas estériles de 10, 1 y 0'1ml	1	

Autoclave	1	
Cabina de flujo laminar	1	
Estufa de incubación	1	
	1	

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- Preparar caldo lactosado según PG / MICRO / 003, añadiendo 0'02g/L de púrpura de bromocresol.
- Se preparan 9 tubos de ensayo con sus correspondientes campanas Durham y serotap.
- Se vierten 10ml de caldo sobre los 3 primeros tubos y 5ml de caldo más 5ml de agua destilada en los 6 tubos restantes.
- Homogeneizar.
- Introducir en el autoclave y esterilizar a 121° durante 20min.
- Una vez terminada la esterilización se deja enfriar y se inocula el agua problema.
- Se vierte 10ml de agua problema en los 3 primeros tubos, 1ml en los 3 siguientes y 0'1ml en los 3 últimos.
- Se homogeneiza.
- Se incuban a 37° de 24 a 48horas para coliformes totales.
- Ver el índice de NMP en la tabla de colimetría.

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 3 de 5	Fecha: 03-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

### 6.2.- Diagrama de flujo.

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 4 de 5	Fecha: 03-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

## 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Para el cálculo se utiliza el nº más probable.

## 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	TUBOS POSITIVOS	TUBOS NEGATIVOS
--	-----------------	-----------------

FECALES (44°C)	10ml	–	–	–	0	0	0	
		1ml	–	–	–	0	0	0
		0'1ml	–	–	–	0	0	0
	TOTALES (37°C)	10ml	+	+	+	–	–	–
		1ml	+	+	+	–	–	–
		0'1ml	+	+	+	–	–	–

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 5 de 5	Ed. 0	Fecha: 03-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA			
C.M.				
Laboratorio				

### 9.- ANEXOS:

Para la determinación de coliformes fecales se repite todo el procedimiento y todo el diagrama de flujo con excepción de la temperatura de incubación que será 44°C en un tiempo máximo de 24h.

IES	AG / MICRO / 006	Hoja 1 de 4	Ed. 0	Fecha: 17-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA CONFIRMATIVA			
C.M.				
Laboratorio				

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la confirmación de coliformes (*E. coli*) en aguas naturales y de consumo.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento se puede aplicar para pruebas confirmativas de coliformes en aguas naturales siempre que la prueba presuntiva haya dado positiva.

### 3.- REFERENCIAS:

- JESÚS GUINEA, JOSÉ SANCHO, RAMÓN PARES. *Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados*. Ed. Omega. S. A.
- BOE nº139 (13-08-83). *Aguas de consumo público*.
- BOE nº226 (20-09-1990). *Aguas de consumo público*.
- BOE nº114 (13-05-87). *Aguas de bebida envasadas*.
- BOE nº178 (26-07-1991). *Aguas de bebida envasadas*.
- BOE (29-08-75). Decreto 607 / 1975.

### 4.- GENERAL:

El medio recomendado por la legislación es el Teague-Levine (EMB) que se refiere a eosina azul de

metileno. Este medio inhibe el crecimiento de las bacterias Gram + y a la vez provoca una precipitación muy característica (muy típica) de estos colorantes en las colonias de *E. coli* y el *Citrobacter* que adquieren por lo tanto un brillo metálico característico.

Como el medio lleva lactosa algunos coliformes la metabolizan parcialmente dando colonias incoloras o traslúcidas (L-), mientras que otros coliformes la metabolizan totalmente a los cuales les llamamos L + y dan colonias de color negro o bien pueden dar colonias de otro color pero siempre con el centro de la colonia negro.

Entonces diremos que *E. coli* y *Citrobacter* dan colonias de color negro con brillo metálico y existe alguna excepción como son el *Enterobacter aerógenes* que dan colonias de color rosa. Además existe otro muy importante como es la *Salmonella thyphi* y *Pseudomona aeruginosa* que son incoloras, no se ven.

IES	AG / MICRO / 006	Hoja 2 de 4	Ed. 0
Manuel Antonio	COLIMETRÍA CONFIRMATIVA		
C.M.			Fecha:
Laboratorio			17-04-2001

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Tubos positivos del		
AG / MICRO / 005	1	
Mechero bunsen	1	
Placa petri	1	Medio EMB
Autoclave	1	
Asa de siembra	1	
Estufa de incubación		

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- Preparar el medio de cultivo (EMB) según PG / MICRO / 003.
- Tomar un tubo + de la prueba presuntiva.
- Se siembra en estría sobre el medio (EMB).
- Se incuba entre 35-37°C, 24horas.
- Identificar colonias con brillo metálico.
- Realizar la prueba del IMVIC a las colonias confirmativas de *E. coli*.

### 6.2.- Diagrama de flujo.

IES	AG / MICRO / 006	Hoja 3 de 4	Fecha: 17-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA CONFIRMATIVA		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

### 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

No hay cálculos ni incertidumbre porque la prueba es positiva.

### 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

*Salmonella* y *Shigella* dan colonias desde incoloras a ámbar. Los coliformes que son lactosa + (L+) dan colonias negro azulado. *E. coli* da colonias negro azulado con brillo metálico.

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 1 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

### 1.- OBJETO:

El objeto del presente documento es la realización de una serie de pruebas que vamos a describir a continuación para identificar colonias que crecieron sobre la placa o tubo en medio sólido o líquido y sobre su caracterización bioquímica.

### 2.- ALCANCE:

Este procedimiento se puede aplicar para las pruebas del IMVIC (indol, rojo de metilo, Voges – proskauer, citrato).

### 3.- REFERENCIAS:

- K. PIATKIN. *Microbiología*. Ed. Mir – Moscú.
- EMILIO SOUNIS. *Curso práctico de microbiología*. Ed. McGraw–Hill.
- F.CALVO Y PUIG. *Microbiología*. Ed. Ecir. Valencia.
- E. COLLADO Y E. SIMEÓN. *Prácticas de microbiología*. Ed. Ecir. Valencia.

### 4.- GENERAL:

El IMVIC es una serie de pruebas que nos sirven para identificar enterobacterias, en concreto son 4 pruebas que nos sirve para la identificación bioquímica.

La primera prueba del IMVIC es la del Indol que nos sirve para investigar el metabolismo proteico y las otras tres nos sirven para investigar el metabolismo hidrocarbonado (hidratos de carbono).

Se utilizan estas pruebas en la identificación de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* que tiene géneros tan importantes como *E. coli*, *Salmonella*, *Proteus*, *Klebsiella* y *Yersinia*.

• PRUEBA DEL INDOL:

Estudia la utilización de prótidos por parte de los microorganismos (bacterias).

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 2 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

Estudia la capacidad de desdoblar el triptófano que es un aminoácido que puede ser degradado por ciertas bacterias para formar varios metabolitos que son el Indol más el ácido pirúvico o bien el Indol más la alanina.

Los diversos enzimas intracelulares que intervienen en el proceso y que deben poseer estas bacterias para escindir el triptófano se llama triptofanasa.

El Indol es detectado por un reactivo que produce una coloración al reaccionar con él. Dentro de las bacterias que son capaces de romper el triptófano tenemos a *E. coli* pero existen otras como *Enterobacter aerógenes* que no.

La presencia de Indol se detecta con el reactivo de Kovac, que está formado por el paradimetilaminobenzaldehído más n-butanol y en medio HCl.

Cuando se añade el reactivo de Kovac se forman dos fases, una acuosa y otra orgánica, el Indol es más soluble en la fase orgánica y forman con el reactivo de Kovac un color rojo si hay Indol. Si se colocan tres tubos:

Pruebas para el estudio del tipo de fermentación:

- Fermentación ácido-mixta. Parte de la glucosa ! ácido pirúvico. Se descompone en ácido láctico o ácido fórmico o Acetil-CoA que da ácido acético (M).
- Fermentación butanoldioica o butilenglicólica. Parte de la glucosa ! ácido pirúvico que se descompone en acetoína o acetil-metilcarbinol (reducción: 2,3-butanodiol; oxidación: diacetilo).

Las enterobacterias clínicamente importantes son anaerobias facultativas y como tales mediante la fermentación de los hidratos de carbono le va a proporcionar la energía necesaria para sus procesos vitales y dentro de las enterobacterias tenemos dos tipos de fermentación: ácido-mixta y es la que nosotros vamos a detectar en el medio (es la más frecuente) por existir en él una gran cantidad de ácido acético e implica que el pH del medio me va a disminuir y la detectamos con el rojo de metilo (M) y es característica de *E. coli*, *Salmonella*, *sigela* y *vibrio* y la fermentación butanoldioica que parte de la glucosa que produce ácido pirúvico que da acetoína o acetil-metilcarbinol, que puede haber reducción 2,3-butanodiol o puede haber oxidación diacetilo se le llama también fermentación acetoínica y es típica de *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*. (V).

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 3 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

• PRUEBA DEL ROJO DE METILO:

Investiga la capacidad de un microorganismo de producir ácidos como metabolitos finales del proceso de fermentación de azúcares, en el producto final de esta fermentación nos vamos a encontrar una gran cantidad de ácidos sobre todo ácido acético que va a dar lugar a que el pH del medio disminuya, finalizada la incubación vamos a añadir rojo de metilo.

Se basa en el empleo de este indicador (M) y los microorganismos que son R.M + van a producir un color rojo en el medio y el pH va a ser menor de 5 y el medio va a quedar amarillo si el pH es superior a 5.

• PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER:

Consiste en determinar la capacidad de un microorganismo de producir un metabolito neutro llamado acetoína que era el acetyl-metilcarbinol como producto intermedio derivado del metabolismo de la glucosa. En presencia de O<sub>2</sub> atmosférico y álcali (KOH), la acetoína es oxidada a diacetilo que es el sustrato que generará un compuesto coloreado al añadir el reactivo revelador de Voges-Proskauer y está formado por -Naftol (5%) y KOH (40%).

Será por tanto Voges-Proskauer + la prueba cuando aparezca una coloración rojo-naranja en la superficie del tubo y será Voges-Proskauer - la prueba cuando queda color amarillo.

Si se carece de KOH se puede utilizar NaOH a la misma concentración (40%).

El orden de la adición de los reactivos es muy importante:

- -Naftol.
- KOH.

La inversión de este orden puede dar resultados débilmente + o falsamente -.

• PRUEBA DEL CITRATO SIMMONS:

Que se hace en agar inclinado (Slam). Determina si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono. El medio utilizado contiene además de citrato sales de amonio inorgánicas como fuente de hidrógeno. Los microorganismos citrato + crecen en este medio alcalinizándolo debido a formación de NH<sub>3</sub>, debido al desdoblamiento de las sales de amonio y también producen carbonatos y bicarbonatos debido a la degradación del citrato.

El medio utilizado es el citrato simmons. Un C+ se puede detectar tanto por el crecimiento del microorganismo como por el viraje del indicador de pH debido a la alcalinización del medio, el indicador es el azul de bromotimol, con la superficie del tubo azul intenso y C- si no se observa ningún color ni crecimiento.

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 4 de 9	Ed. 0	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC			
C.M.				
Laboratorio				

REACCIONES QUÍMICAS (típicas) PARA TODO EL PROCESO:

	I	M	V	C
<i>Enterobacter aerógenes</i>	-	-	+	+
<i>E. coli</i>	+	+	-	-

## 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Asa de siembra	1	Reactivo de kovacs Caldo glucosado (RMVP) Agua de peptona (TW)
Tubos de ensayo	5	-Naftol
Serotaps	5	KOH
Estufa de incubación	1	Rojo de metilo (RM) Citrato Simmons

## 6.- PROCEDIMIENTO:

### 6.1.- Método operatorio:

- (I) PRUEBA DEL INDOL:

- Inocular con un asa de siembra estéril el germen que queremos estudiar en agua de peptona (TW) que tiene un alto contenido en triptófano.
- Incubar a 37°C, 48 horas.
- Añadir 1ml de reactivo de kovacs en el tubo y agitar.
- Dejar en reposo e interpretar los resultados.

- (M) PRUEBA DEL ROJO DE METILO:

- Inocular con el asa de siembra estéril el germen a estudiar en un tubo de ensayo con caldo glucosado estéril.
- Incubar a 37°C, 48 horas. (fermentación)
- Añadir una gota del indicador R.M. y agitar.
- Interpretar los resultados obtenidos.

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 5 de 9	Ed. 0
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.			Fecha: 24-04-2001
Laboratorio			

- (V) PRUEBA DE VOGES-PROSKAUER.

- Inocular con un asa de siembra estéril el germen a estudiar en un tubo de ensayo con caldo glucosado estéril.
- Incubar a 37°C, 48 horas.
- Llevar 1ml de cultivo a 1 tubo limpio.
- Añadir 0'6ml de –naftol y 0'2 de KOH y agitar.
- Dejar reposar 20min.
- Interpretar los resultados.

• (C) PRUEBA DEL CITRATO SIMMONS:

- Inocular con un asa de siembra estéril el germen a estudiar en un tubo de ensayo de citrato Simmons (con agar en Slam).
- Incubar a 37°C, 48 horas.
- Comprobar si hay crecimiento en el medio y si hay cambio de color.

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 6 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

**6.2.– Diagrama de flujo.**

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 7 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 8 de 9	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

**7.– INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

• PRUEBA DEL INDOL:

Color rojo en la fase orgánica

E. coli Enterobacter

• PRUEBA DEL ROJO DE METILO:

Se desarrolla o se produce color rojo

E. coli Enterobacter

• PRUEBA DE VOGES–PROSKAUER:

Se desarrolla color rojo

Enterobacter E. coli

IES	PG / MICRO / 007	Hoja 9 de 9	Ed. 0	Fecha: 24-04-2001
Manuel Antonio	PRUEBA DEL IMVIC			
C.M.				
Laboratorio				

• PRUEBA DEL CITRATO SIMMONS:

Existe crecimiento si se produce viraje de verde a azul

Enterobacter E. coli

RESULTADOS OBTENIDOS:

	I	M	V	C
<i>Enterobacter aerógenes</i>	-	-	+	
<i>E. coli</i>				

IES	AG / MICRO / 007	Hoja 1 de 4	Ed. 0	Fecha: 15-05-2001
Manuel Antonio	ESTREPTOMETRÍA			
C.M.				
Laboratorio				

**1.- OBJETO:**

El objeto del presente documento es la identificación, recuento y confirmación de estreptococos fecales usando el método de filtración por membrana.

**2.- ALCANCE:**

Este método se podrá aplicar en la determinación de estreptococos fecales en aguas naturales y de consumo, no tratadas por procedimientos de potabilización.

**3.- REFERENCIAS:**

- JESUS GUINEA, JOSÉ SANCHO Y AMÓN PARES. Análisis microbiológico de aguas. Aspectos aplicados. Ed. Omega.
- R. PASCUAL. Microbiología alimentaria. Ed. Ecir.

- BOE (13-08-1983).
- BOE (13-05-1987).

#### 4.- GENERAL:

Los estreptococos son bacterias cocáceas (de forma esférica), Gram +, aeróbias o anaerobias facultativas, catalasa -, capaces de fermentar la glucosa con producción de ácido, a su TOC a 37°C en un tiempo máximo de 48 horas. Se agrupan en forma de rosarios o en dos.

Vamos a clasificarlos según sus características fisiológicas y de cultivo. Se van a clasificar en cuatro grupos:

- Grupo piogeno.
- Grupo viridans.
- Grupo láctico.
- Grupo enterococos.

Los enterococos viven en el intestino grueso del ser humano y de animales de sangre caliente. Este grupo comprende unas cuantas especies a su vez que son:

- *Streptococcus faecalis* (es el microorganismo indicador).
- *Streptococcus durans*.
- *Streptococcus faecium*.
- *Streptococcus bovis*.
- *Streptococcus equinus*.

En donde los tres primeros están en el intestino del ser humano y los dos últimos se encuentran en el intestino de los animales.

IES	AG / MICRO / 007	Hoja 2 de 4	Fecha: 15-05-2001
Manuel Antonio	ESTREPTOMETRÍA		
C.M.		Ed. 0	
Laboratorio			

La presencia de los enterococos en un agua indica siempre contaminación fecal, si encontramos estos microorganismos en otros alimentos indican falta de higiene o condiciones de conservación no adecuados. Cuando encontremos Streptococos en el agua sólo nos indica contaminación fecal, no sabemos si es reciente o remota.

Son muy resistentes a la congelación, a la desecación y tratamientos térmicos, también son resistentes a la cloración.

Para la identificación de estos microorganismos vamos a utilizar el medio de Slanetz, este medio tiene dos componentes: azida de sodio y cloruro de tetrazolio. La azida se utiliza para inhibir el crecimiento de Gram - y el cloruro es un colorante que las bacterias comen y se tiñen de color rojo - rojizo - violeta - rosa a las bacterias.

#### Prueba de la catalasa:

La catalasa es un enzima que actúa sobre el agua oxigenada según esta reacción:



La mayor parte de los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos poseen esta enzima que les sirve para destruir el peróxido de hidrógeno que se forma como producto terminal de la degradación aeróbica de los hidratos de carbono. Si se acumula agua oxigenada es tóxico para los microorganismos y provoca su muerte por lo tanto la enzima catalasa es necesaria para su desarrollo.

Este enzima también sirve para diferenciar a unos microorganismos de otros por ejemplo: ¿cómo eran los estreptococos con respecto a la catalasa? Negativos, ¿y los *Micrococcus* y *Staphilococcus*? Son catalasa positivo. Si son negativos son estreptococos seguro.

### 5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:

MATERIAL	Nº	PRODUCTOS
Equipo de filtración estéril	1	Medio de Slanetz  Reactivos para la tinción de Gram  Agua oxigenada 110vol. = 30%
Membrana estéril	1	
Placa petri	1	
Estufa de incubación a 37°C	1	
Microscopio	1	
Porta	1	
Asa de siembra	1	
Mechero	1	

IES	AG / MICRO / 007	Hoja 3 de 4	Ed. 0	Fecha: 15-05-2001
Manuel Antonio	ESTREPTOMETRÍA			
C.M.				
Laboratorio				

### 6.- PROCEDIMIENTO:

#### 6.1.- Método operatorio:

- Se prepara una placa petri con medio de cultivo Slanetz según PG / MICRO / 003.
- Hacer toma de muestra de agua según el procedimiento AG / MICRO / 001.
- Preparar la muestra según AG / MICRO / 002.
- Los elementos del sistema de filtración que vayan a estar en contacto con el agua han de estar estériles.
- Se prepara el equipo de filtración. Se coloca una membrana sobre el soporte usando unas pinzas estériles, se adapta el embudo.
- Se filtran 100ml de agua problema previamente homogeneizada realizando el vacío necesario.
- Se lava con agua de triptona estéril.
- Se retira el embudo y con las pinzas estériles se coloca la membrana sobre el medio de Slanetz.

- Se cierra la placa, se invierte y se introduce en la estufa, se incuba a 37°, 48 horas ± 3horas.
- Se hace recuento de colonias.
- Se realiza una tinción de Gram con una colonia.
- Se realiza la prueba de la catalasa con una colonia.

## 7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:

Se cuentan las colonias desarrolladas que tengan color rojo ladrillo, violeta o rosa. Las colonias que no tengan estos colores no se consideran Streptococos fecales.

## 8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:

El nº de colonias desarrolladas en el filtro con las características anteriores, corresponde al nº de Streptococos fecales en 100ml.

La concentración máxima admisible en un agua potable es 0 Streptococos fecales en 100ml, sólo con uno se puede considerar contaminada.

## 9.- ANEXOS:

Se confirmarán los streptococos fecales con una tinción de Gram según PG / MICRO / 006 y con la prueba de la catalasa.

IES Manuel Antonio	AG / MICRO / 007 ESTREPTOMETRÍA	Hoja 4 de 4	
C.M. Laboratorio		Ed. 0	Fecha: 15-05-2001

### Prueba de la catalasa:

- Con el asa estéril tomamos un poco de muestra del centro de la colonia y se extiende en un porta.
- Se añaden unas gotas de agua oxigenada de 110vol.
- Si se desprenden burbujas es catalasa + si no se desprenden burbujas es catalasa - e indica que serían streptococos fecales.

IES Manuel Antonio	AG / MICRO / 005 COLIMETRÍA PRESUNTIVA	Hoja 1 de 4	
C.M. Laboratorio		Ed. 0	Fecha: 03-04-2001

### 1.- OBJETO:

### 2.- ALCANCE:

### 3.- REFERENCIAS:

### 4.- GENERAL:

**5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:**

MATERIAL	N°	PRODUCTOS
----------	----	-----------

**6.- PROCEDIMIENTO:**

**6.1.- Método operatorio:**

**6.2.- Diagrama de flujo.**

**7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:**

**8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

**9.- ANEXOS:**

IES	AG / MICRO / 005	Hoja 1 de 4	Ed. 0	Fecha: 03-04-2001
Manuel Antonio	COLIMETRÍA PRESUNTIVA			
C.M.				
Laboratorio				

**1.- OBJETO:**

**2.- ALCANCE:**

**3.- REFERENCIAS:**

**4.- GENERAL:**

**5.- MATERIAL Y PRODUCTOS:**

MATERIAL	N°	PRODUCTOS
----------	----	-----------

**6.- PROCEDIMIENTO:**

**6.1.- Método operatorio:**

**6.2.- Diagrama de flujo.**

**7.- CÁLCULOS E INCERTIDUMBRES:**

**8.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS:**

**9.- ANEXOS:**

EXTENSIÓN

LAVAR EL PORTA CON ALCOHOL 10-15s HASTA QUE NO ARRASTRE MÁS CRISTAL VIOLETA

VOLVER A LAVAR CON AGUA

LAVAR CON H<sub>2</sub>O Y CUBRIR EL PORTA 30s CON EL COLORANTE DE CONTRASTE –FUCSINA

LAVAR CON H<sub>2</sub>O DEJANDO ESCURRIR TODO EL EXCESO (PORTA VERTICAL)

GOTA DE ACEITE DE CEDRO

OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

DEJAR SECAR AL AIRE

FIJAR

CUBRIR CON LUGOL 1 MIN

GOTA DE H<sub>2</sub>O DESTILADA

LAVAR CON AGUA

1 MIN V<sub>c</sub>

OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO

COLOCAR CUBRE

4 MIN

LAVAR CON H<sub>2</sub>O

AÑADIR AZUL METILENO

LAVAR CON ALCOHOL–ACETONA 1:1

FIJAR AL MECHERO

EXTENSIÓN

SE TOMA UNA PEQUEÑA MUESTRA DE YOGUR

AGUA

FILTRAMOS 100ML DE AGUA PROBLEMA

CONECTAR EL MONTAGE CON LA BOMBA DE VACÍO

MONTAR EL EQUIPO DE FILTRACIÓN

ESTERILIZAR EL SOPORTE DEL FILTRO EN ESTUFA DE ESTERILIZACIÓN 30–20MIN

HOMOGENEIZAR LA MUESTRA

RECUENTO DE COLONIAS

INCUBAR A 37°C 48 HORAS

HOMOGENEIZAR

HOMOGENEIZAR

SIEMBRA POR VERTIDO

0'1ml DE AGUA PROBLEMA

1ml DE AGUA PROBLEMA

AGAR DE RECUENTO ESTERIL PCA O TSA

MEMBRANA

RETIRAR EL FILTRO CON UNAS PINZAS ESTERILES

COLOCAR EL FILTRO BOCA ARRIBA SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO E INCUBAR 37°C 48H

RECUENTO DE COLONIAS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

¿APARECE GAS A LAS 24H EN LAS CAMPANAS DURHAM?

SI

RESULTADO PRESUNTIVO POSITIVO

EN LA TABLA DEL N° MÁS PROBABLE MÁXIMO 3 GÉRMENES EN 100ML

¿APARECE GAS A LAS 48HORAS?

SI

TEST PRESUNTIVO DUDOSO

TEST PRESUNTIVO NEGATIVO

¿APARECE GAS A LAS 24H A 44°C?

SEMBRAR EN ESTRÍA EN EL EMB

INCUBAR ENTRE 35–37°C, 24 HORAS

PREPARAR EL MEDIO (EMB)

DE UN TUBO POSITIVO DE LA PRUEBA PRESUNTIVA CON UN ASA ESTERIL TOMAR UN INÓCULO.

TEST PRESUNTIVO NEGATIVO

EN LA TABLA UN GÉR MEN EN 100ML

RESULTADO PRESUNTIVO POSITIVO

SI

IDENTIFICAR COLONIAS CON BRILLO METÁLICO

REALIZAR EL IMVIC A LAS COLONIAS CONFIRMATIVAS DE *E. COLI*

ENFRIAR

ESTERILIZAR

5ML DE CALDO + 5ML DE AGUA DESTILADA

10ML

CALDO LACTOSADO + PÚRPURA DE BROMOCRESOL

10ML DE AGUA PROBLEMA

1ML DE AGUA PROBLEMA

0'1ML DE AGUA PROBLEMA

HOMOGENEIZAR

INCUBAR A 37°C DE 24 A 48H

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**I**

AGUA DE PEPTONA

INOCULAR GERMEN

INCUBAR 37°C 48H

1ML DE KOVACS

DEJAR REPOSAR HASTA QUE SE FORMEN DOS FASES

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**M**

INCUBAR 37°C 48H

SI

**V**

CALDO GLUCOSADO

INOCULAR GERMEN

**C**

CITRATO SIMMONS

INOCULAR GERMEN EN ZIG-ZAG

CALDO GLUCOSADO

INOCULAR GERMEN

INCUBAR 37°C 48H

1 GOTTA DE RM

REPOSAR E INTERPRETAR LOS RESULTADOS

INCUBAR 37°C 48H

1ML DE CULTIVO, 0'6ML DE -NAFTOL + 0'2ML KOH

COMPROBAR SI CRECIMIENTO Y CAMBIO DE COLOR

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

DEJAR REPOSAR 20MIN

NO

I +

I -

NO

M +

M -

SI

SI

V -

V +

NO

SI

C -

C +

NO