

DETERMINACION DE BACTERIAS COLIFORMES: COLIMETRIA

En esta práctica, vamos a centrarnos en determinar las bacterias coliformes presentes en un agua mediante el Método de los tubos múltiples ó colimetria y en la práctica siguiente se realizara un recuento del número de bacterias aerobias totales en un agua problema.

El análisis microbiológico de un agua, tiene como finalidad, el control de calidad microbiológica de la misma, según establece el Ministerio de Sanidad y Consumo por Orden Ministerial publicada en el BOE.

En dicha Orden se establecen las normas oficiales de análisis para la investigación de:

- Bacterias aerobias totales
- Bacterias coliformes
- Estreptococos fecales y
- Clostridios sulfito reductores.

El objeto de la investigación de estos microorganismos concretos es debido a que todos ellos, son componentes habituales de la microbiota comensal del intestino del hombre y de animales y es por ello, que sirven de indicadores de una posible contaminación fecal del agua en estudio.

Además, debido a que presentan distintos grados de resistencia a los factores medioambientales, su cuantificación nos permite establecer la evolución de la contaminación en el tiempo.

En la Orden Ministerial, se definen como coliformes totales aquellas bacterias de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias ó anaerobias facultativas, oxidasa negativas, no esporogénicas, que fermentan la lactosa con producción de ácido y de gas a 37°C en un tiempo máximo de 48 h. Este grupo comprende los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*.

La denominación específica de coliformes fecales hace referencia a aquellas bacterias incluidas en el grupo de coliformes totales y que además son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a 44,5°C en un tiempo máximo de 24 h.

El BOE, recomienda el Método de los tubos múltiples ó del Número más Probable (NMP) y como alternativa el Método de filtro de membrana para la determinación de la presencia de este grupo en un agua.

FUNDAMENTO

Se basa en la determinación del número de coniformes presentes en una muestra mediante la siembra de distintos volúmenes del agua problema en series de tubos conteniendo un medio de cultivo líquido lactosado y una posterior resiembra en un medio de cultivo selectivo con incubación a temperaturas adecuadas.

PROCEDIMIENTO

El procedimiento comprende tanto pruebas presuntivas como confirmativas de coniformes totales y de confirmación de coliformes fecales.

PRUEBA PRESUNTIVA

Consiste en un procedimiento de criba en el que una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme y una reacción positiva indica su posible presencia.

Dispondremos de un matraz con 50 ml y dos series de tubos conteniendo 10 y 1 ml respectivamente de caldo MacConkey, y provistos de una campana de recogida de gases (campana Durham).

Mediante pipetas estériles, se siembran el matraz y las dos series de tubos con un volumen igual de agua ya homogeneizada debido a ello el medio deberá prepararse a doble concentración. Después de la siembra, será necesario una buena homogenización de los tubos que se llevarán a incubar durante 24 h a 37°C.

Lectura e interpretación de los resultados.

Se consideran tubos positivos aquellos en los que se observe viraje del indicador debido a la acidificación del medio, y aparición de gas en la campana Durham.

PRUEBA DE CONFIRMACION DE COLIFORMES TOTALES

Es un procedimiento mediante el cual, una reacción negativa excluye la presencia del grupo coliforme, mientras que una reacción positiva indica su presencia inequívoca.

Deben someterse a esta prueba todos los tubos que hayan resultado positivos en la prueba presuntiva. A partir de ellos y tras homogenizar su contenido, se procederá a sembrarlos mediante asa en estría, sobre la superficie de placas Petri conteniendo medio de agar-lactosa-eosina-azul de metileno (medio de Teague Levine ó EMB). A continuación se incubaran las placas a 37°C durante 24h.

Las bacterias fermentadoras de lactosa crecen sobre este medio dando colonias opacas y pigmentadas en rosa, azul violeta oscuro con ó sin brillo metálico, mientras que las colonias que aparezcan distintas a las descritas pertenecerán a bacterias no fermentadoras de lactosa. Posteriormente, de cada placa, seleccionaremos una colonia de cada uno de los diferentes aspectos descritos como característicos y se resiembra mediante hilo ó asa sobre agar nutritivo inclinado y a continuación y sin recargar se resiembra un tubo de caldo MacConkey, con campana Durham, incubándose a 37°C durante 24 h.

Al término de la incubación, se comprueba la producción de gas en el tubo lactosado y en el caso de que sea positiva, se toma mediante asa ó pipeta Pasteur una porción del cultivo desarrollado sobre el agar inclinado y se le practica la prueba de la oxidasa. O bien se siembra la bacteria en agua de peptona y se le realiza la prueba del indol. Esta prueba sirve para medir la producción de indol a partir de triptofano debido a la acción de la enzima Triptofanasa. Esta enzima degrada el triptofano hasta indol y pirúvico, el cual es utilizado como fuente de energía. El indol por el contrario se acumula en el medio y puede ser puesto de manifiesto con el reactivo de Kovacs el cual va a extraer el indol que va a reaccionar con el para-dimetilaminobenzaldehido dando lugar en medio ácido a un complejo de color rojo denominado Rosindol el cual queda concentrado en forma de un anillo en la parte superior del tubo, ya que el alcohol amílico no se mezcla con el agua y al ser menos denso que esta, se queda por encima.

Lectura e interpretación de los resultados.

Si en la placa de medio EMB no se desarrollan colonias ó bien las aparecidas no son fermentadoras de lactosa con producción de gas la prueba de confirmación es negativa.

En el caso de que la colonia aislada sea fermentadora de la lactosa con producción de gas y oxidasa negativa ó indol positiva, la presencia de coliformes totales se considera confirmada.

Si la reacción de la oxidasa es positiva, ó la del indol es negativa, la presencia de coliformes totales se considerara negativa aunque la colonia aislada haya fermentado la lactosa con producción de gas.

Para el cálculo del NMP de coliformes totales se contabilizaran como positivos aquellos tubos de la serie que hayan dado una prueba de confirmación positiva.

PRUEBA DE CONFIRMACION DE COLIFORMES FECALES

Es un procedimiento por el cual una reacción negativa excluye la presencia de coliformes fecales, mientras que una reacción positiva indica su presencia inequívocamente.

Deben someterse a esta prueba, todos los tubos que hayan resultado positivos en la prueba presuntiva. A partir de los tubos positivos obtenidos se resiembran mediante asa ó bien con dos gotas de cultivo tomadas con pipeta Pasteur tantos tubos de caldo MacConkey como tubos positivos presuntivos haya, incubándose inmediatamente a 44°C durante 24 horas.

Lectura e interpretación de los resultados.

Cuando se observe crecimiento bacteriano con producción de gas a las 24 h ó antes, la presencia de bacterias coliformes fecales quedara confirmada y para el cálculo del NMP de coliformes fecales, se contabilizaran como positivos aquellos tubos de la serie que hayan dado prueba de confirmación positiva.

Las aguas aptas para consumo humano deben tener ausencia de coliformes tanto totales como fecales en un mínimo de 100 ml de agua analizada.

COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS EMPLEADO

AGUA DE PEPTONA

Peptona	1%
NaCL	0.5%
pH	7.2

CALDO DE MacConkey

Bilis de buey	5g/l
Peptona	20g/l
Lactosa	10g/l
Púrpura de bromocresol	0.01g/l
Agua destilada	1000ml
pH	7.3

AGAR CON EOSINA Y AZUL DE METILENO (Teague-Levine) EMB

Peptona	10g/l
Lactosa	5g/l
Sacarosa	5g/l
Fosfato di potásico	2g/l
Agar	14g/l
Eosina amarilla	0.4g/l
Azul de metileno	0.065g/l
Agua destilada	1000ml
pH	7.2

REACTIVO DE KOVACS

Alcohol amílico	150ml
p-dimetil aminobenzaldehido	10g
HCL concentrado	50ml

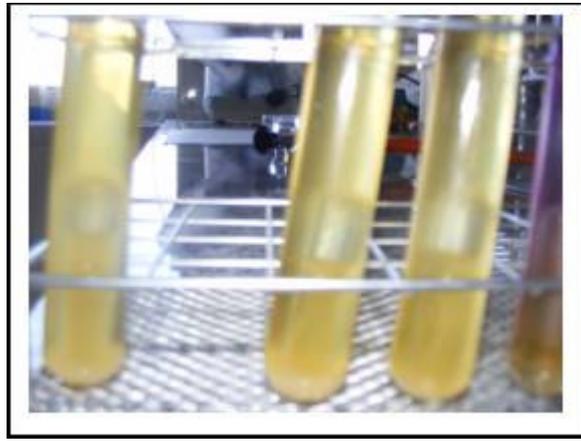
6.1 TABLAS DEL NMP

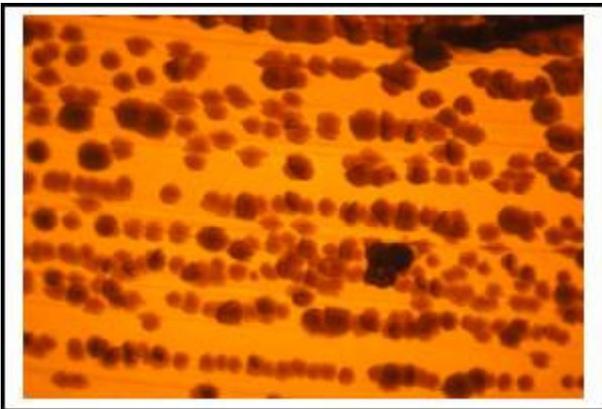
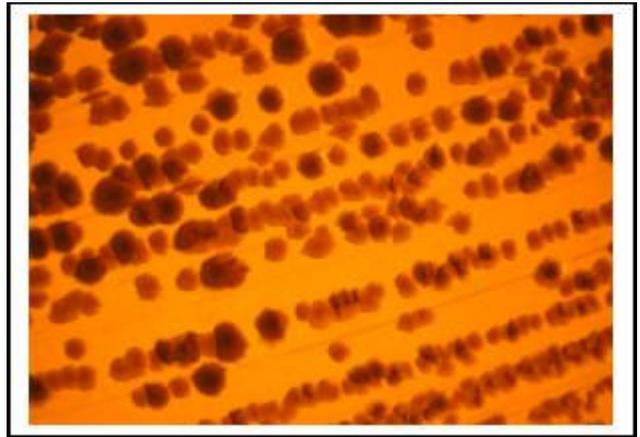
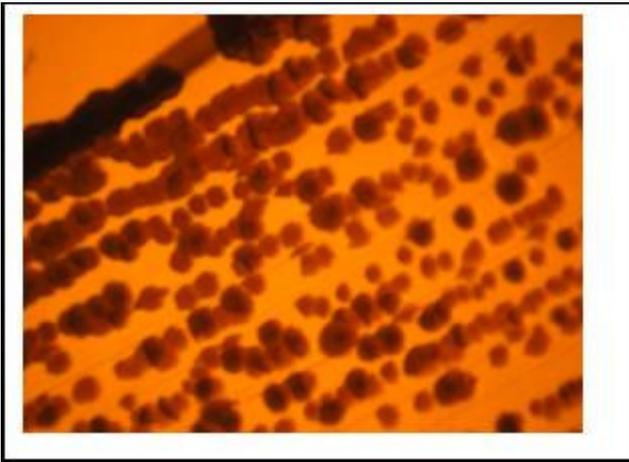
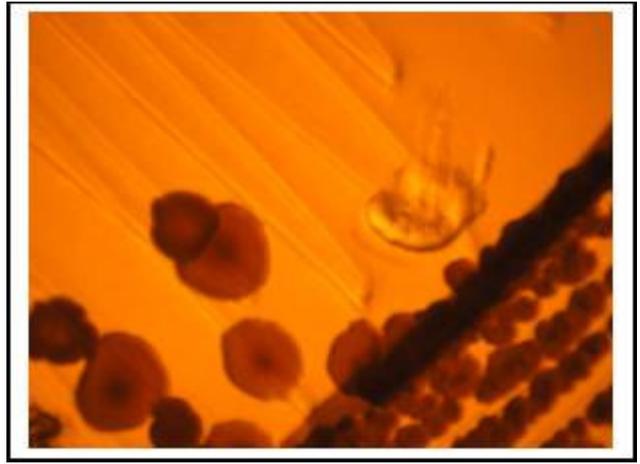
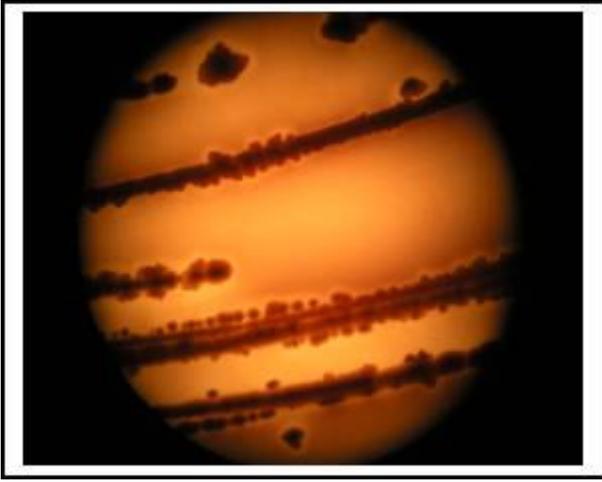
Tabla 6.1.1

Número más probable/100 ml de muestra, utilizando un tubo inoculado con 50 ml, cinco tubos con 10 ml y cinco tubos con un ml, respectivamente

COLIMETRÍA					
Número de tubos que dan reacción positiva entre			Índice NMP	Límites de confianza del 95 por 100	
1 tubo de 50 ml	5 tubos de 10 ml	5 tubos de 1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	1	0,5	4
0	0	2	2	0,5	6
0	1	0	1	0,5	4
0	1	1	2	0,5	6
0	1	2	3	0,5	8
0	2	0	2	0,5	6
0	2	1	3	0,5	8
0	3	2	4	0,5	11
0	3	0	3	0,5	8
0	3	1	5	0,5	13
0	4	0	5	0,5	13
1	0	0	1	0,5	4
1	0	1	3	0,5	8
1	0	2	4	0,5	11
1	0	3	6	0,5	15
1	1	0	3	0,5	8
1	1	1	5	0,5	13
1	1	2	7	1	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	23
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	33	12	101
1	4	5	43	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	10	100
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	74	350

Colimetría





Colonias
en placa
EMB. Las
oscuras son
las Lac (+)