

The image shows three petri dishes containing microbial cultures. One dish on the left has a bright orange-red agar surface. The dish in the center has a light-colored agar with a grid pattern and several dark, circular spots of bacterial growth. The dish on the right is partially visible and appears to have a similar light-colored agar with some growth.

## *Tema 6. Análisis microbiológico*

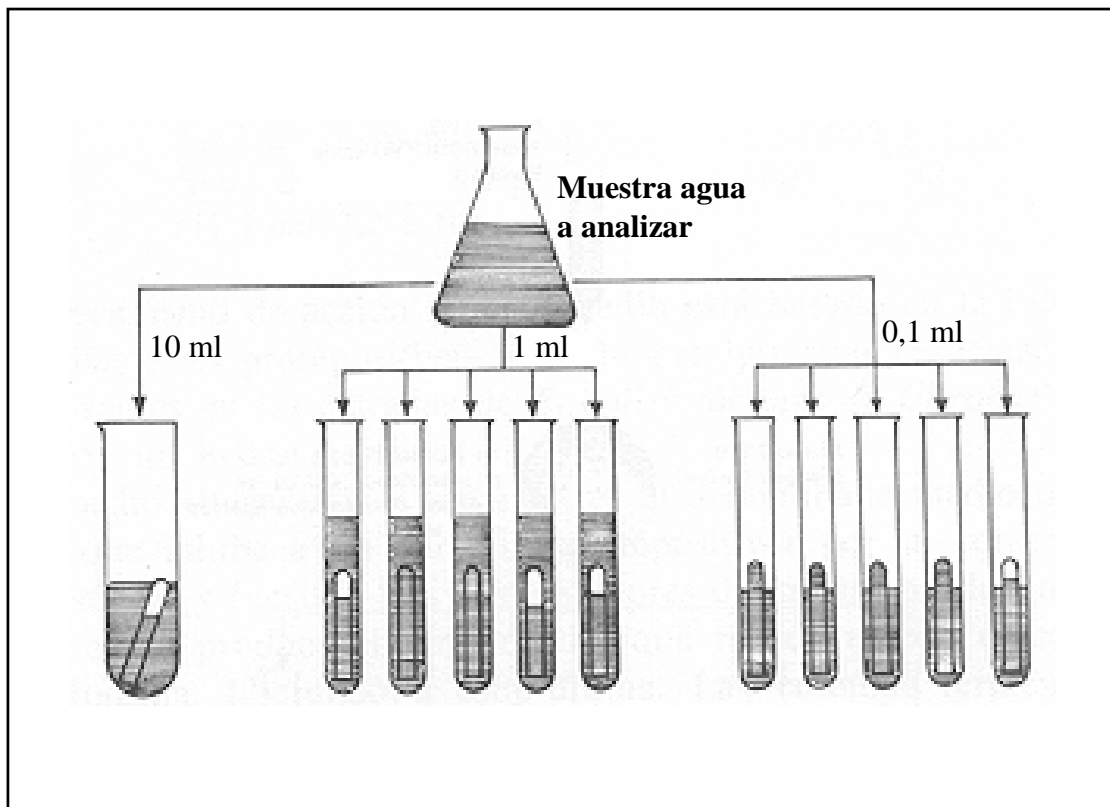
### *Introducción*

La legislación sobre calidad de aguas ha establecido dos técnicas analíticas para la determinación de los microorganismos indicadores:

- **Método de las diluciones sucesivas** y la valoración según el **Número Más Probable (NMP)**, y
- **Método de la filtración por membrana.**

## ***Método analítico de diluciones sucesivas y valoración según el NMP***

- **Objetivo:** Desarrollar, identificar y cuantificar los microorganismos que crecen en un determinado medio de cultivo.
- Es un método de enumeración indirecto, que se basa en la interpretación estadística del crecimiento, o no crecimiento, observado en varias series de tubos, inoculados con volúmenes decrecientes de agua a analizar.
- Se debe lograr una serie de tubos en los que no haya crecimiento de las bacterias.



## *Número de diluciones*

- Depende del grado de contaminación.
- Se debe preparar el número suficiente de diluciones de forma que en **la última dilución no se obtenga crecimiento de microorganismos**, después de la inoculación y la incubación correspondiente.

Tipo de agua	Coliformes totales	Coliformes fecales	Estreptococos fecales
Agua residual	$10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ $10^{-5}$ $10^{-6}$	$10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ $10^{-5}$ $10^{-6}$	$10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ $10^{-5}$
Efluente secundario	$10^{-1}$ $10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ $10^{-5}$	$10^{-1}$ $10^{-2}$ $10^{-3}$ $10^{-4}$ $10^{-5}$	1 $10^{-1}$ $10^{-2}$ $10^{-3}$
Agua de mar contaminada	10 1 $10^{-1}$ $10^{-2}$ $10^{-3}$	10 1 $10^{-1}$ $10^{-2}$ $10^{-3}$	10 1 $10^{-1}$
Agua de mar limpia	10 1 $10^{-1}$	10 1 $10^{-1}$	100 10 1

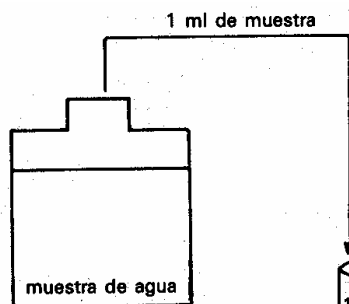
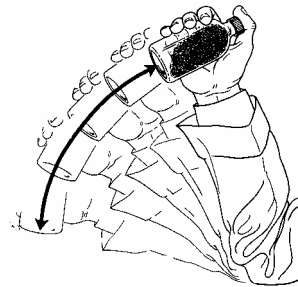
*Técnica de dilución e inoculación:  
Inoculación de la muestra original y diluciones*

## *Preparación tubos con medio cultivo y diluyentes*

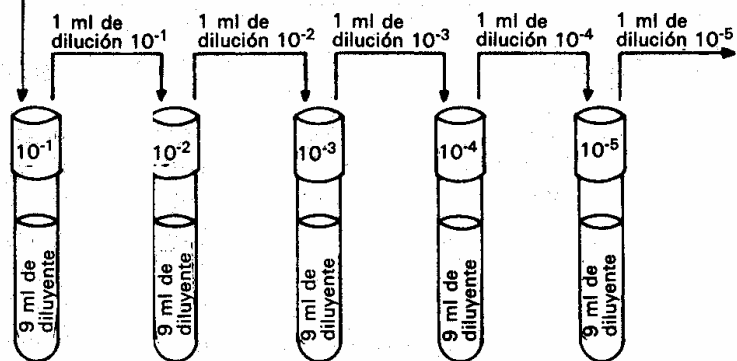
- Preparar una serie de tubos con el siguiente contenido
  - a. 3 (5) tubos con 10 ml de medio de cultivo estéril a concentración doble, o 1 tubo con 50 ml de medio
  - b. Tantas series de 3 (5) tubos como sean necesarias, conteniendo cada tubo 10 ml de medio de cultivo estéril a concentración simple.
  - c. Si se desea determinar la producción de gas se tiene que añadir a todos los tubos una campana de Durham invertida (pequeños tubos de vidrio)
- También será necesario preparar tantos tubos con diluyente como número de diluciones sean necesarias. Cada uno contendrá 9 ml de diluyente estéril (agua destilada, NaCl al 9%, solución tamponada).

## *Preparación de las diluciones*

1) La muestra de agua debe ser **siempre** agitada antes de usarse, de forma enérgica para homogeneizarla

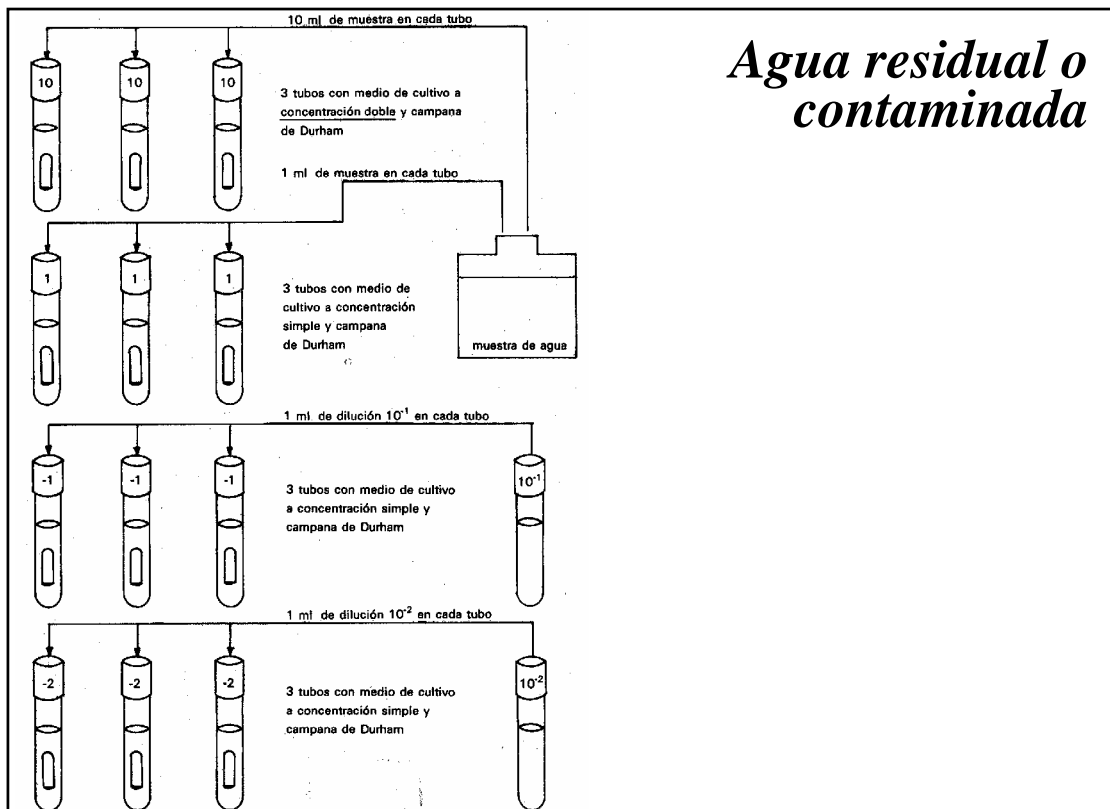
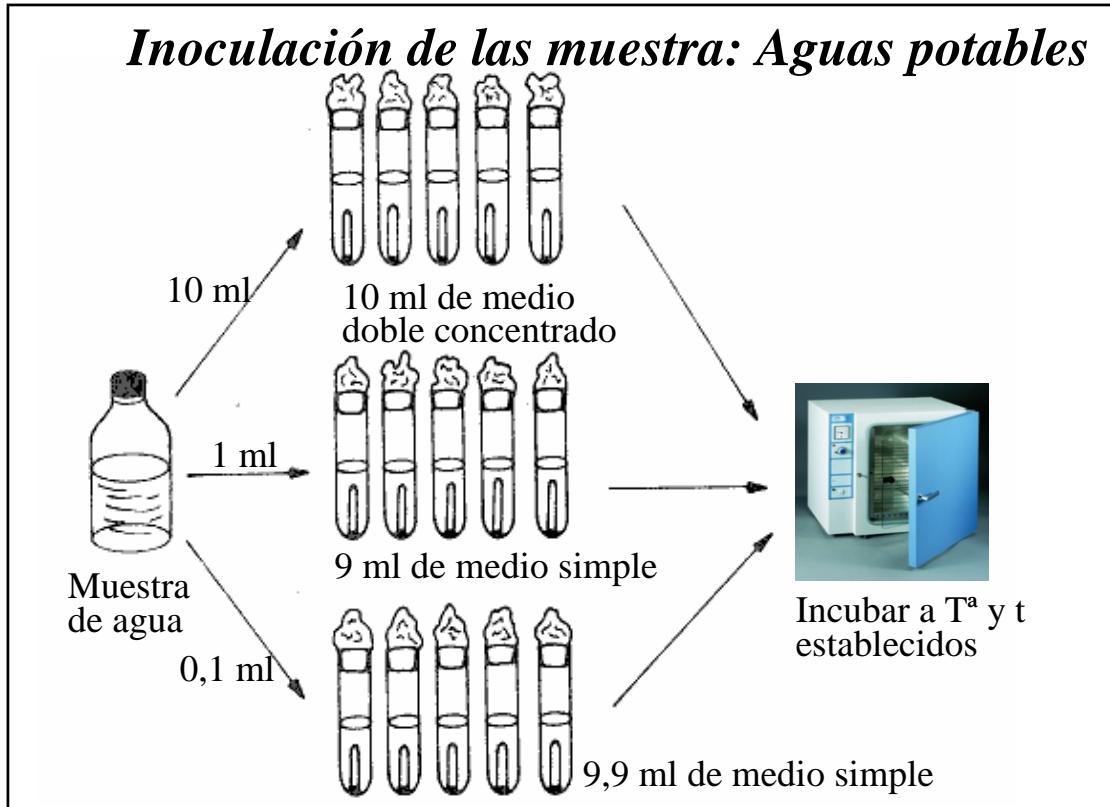


2) Trabajar con pipetas estériles.



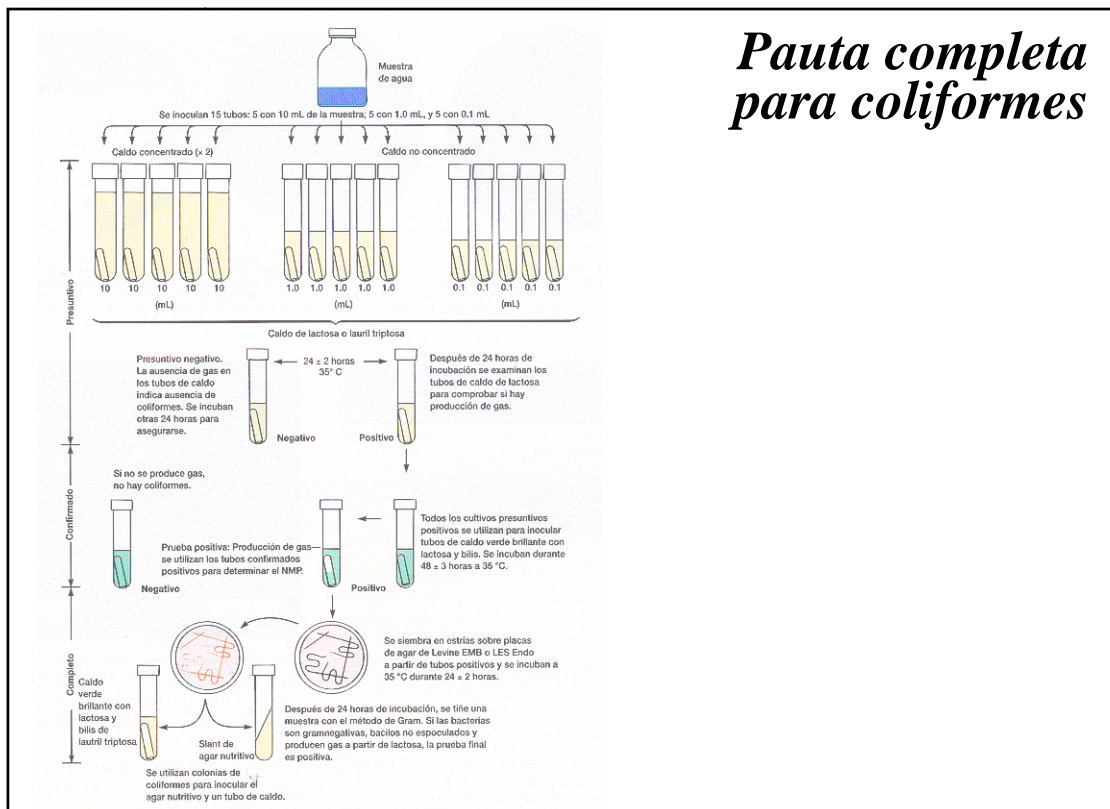
3) Después de la adición de 1 ml, agitar cada tubo para homogeneizar la mezcla.

## Inoculación de las muestra: Aguas potables

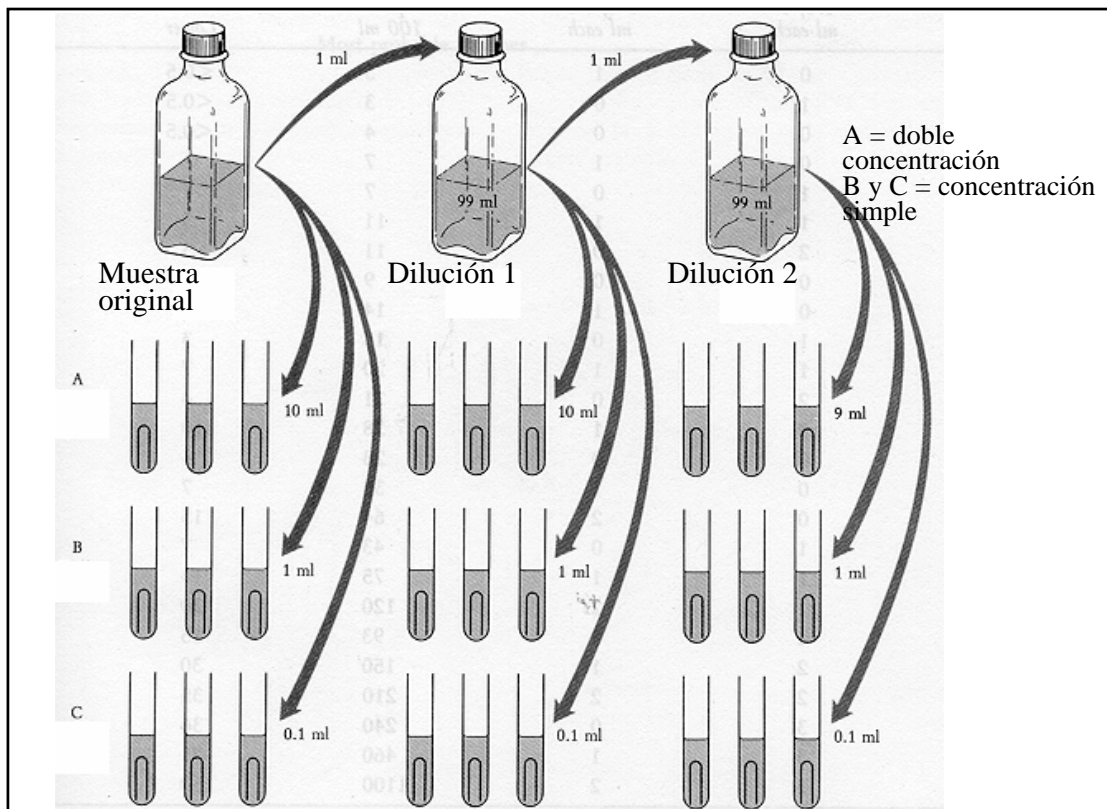
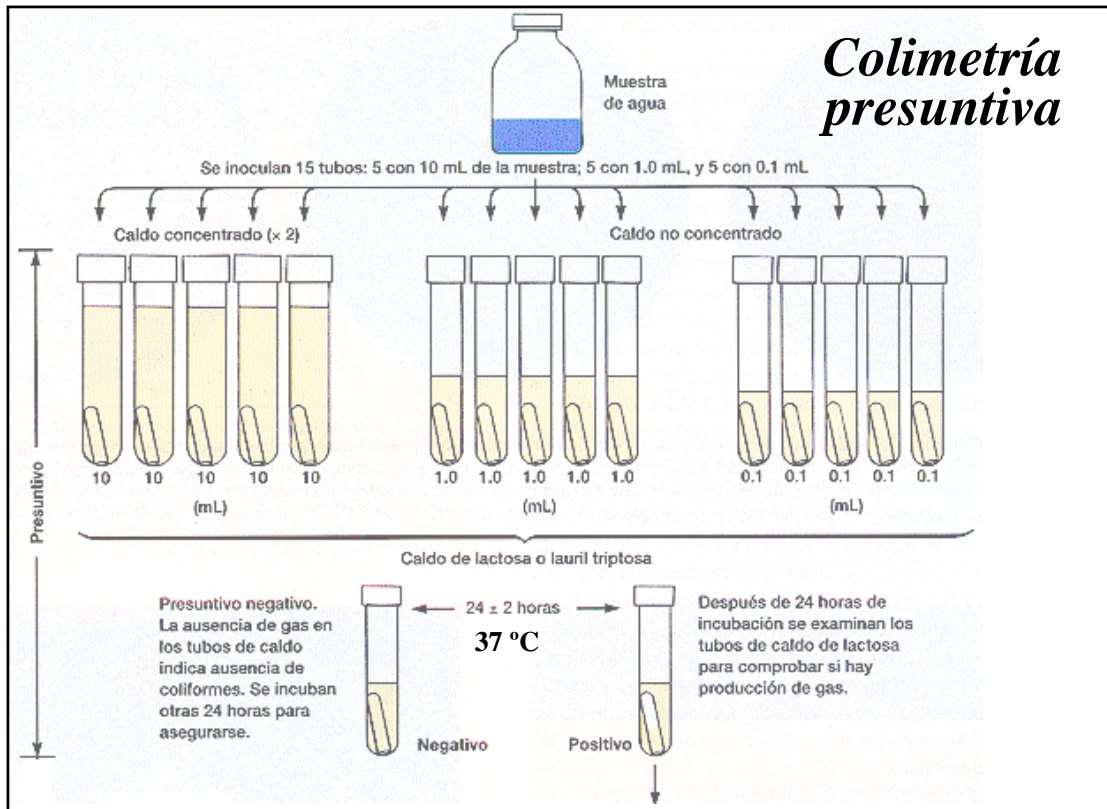


## *Coliformes totales*

- Consta de 3 pruebas: Prueba presuntiva, confirmativa y final.
- El proceso total, incluyendo las pruebas de confirmación y finales, requiere al menos 4 días de incubaciones y transferencias.
- La fase presuntiva se realiza inoculando varios tubos con tres diluciones diferentes para obtener una estimación del número más probable de coliformes en el agua.

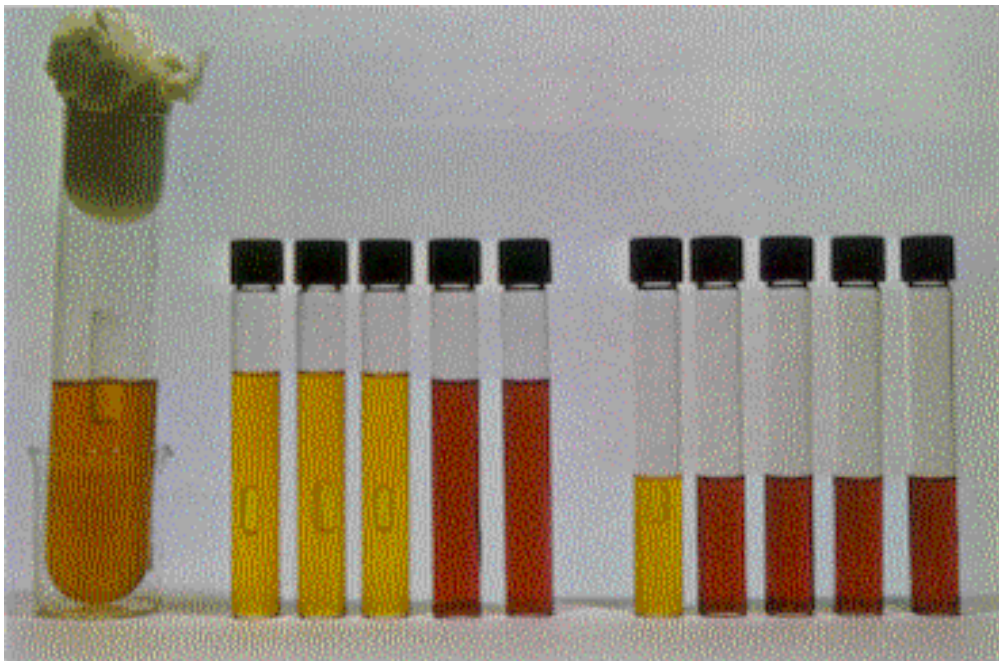


# Colimetría presuntiva



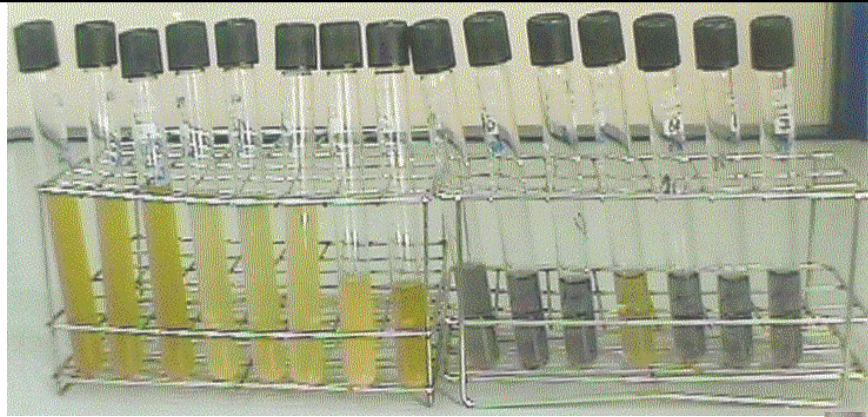
## *Colimetría presuntiva*

- Medios de cultivo:
  - Recomendado: **Caldo lactosado**
  - Alternativos: **Caldo McConkey** y **Caldo lactosado laurilsulfato sódico**
- Incubación:  $37 \pm 0,5$  °C durante  $24 \pm 2$  horas.
- **Resultado positivo:** Fermentación de lactosa con formación de gas (detectado en campana Durham) y producción simultánea de ácido (con cambio de color del medio, indicador de pH).
- En el caso de medios que no contengan en su composición un indicador de pH, se puede usar 0,9 g de púrpura de bromocresol por litro de caldo
- Los tubos considerados negativos a las 24 horas se seguirán incubando hasta las  $48 \pm 3$  horas



Tubos con crecimiento 1-3-1





En este punto, se anotan, para cada serie de tubos, el número de los considerados positivos. En el ejemplo: 3-2-1-0 que corresponden a 10, 1, 0.1 (1 ml de dilución  $10^{-1}$ ) y 0.01 (1 ml de la dilución  $10^{-2}$ ) mililitros de la muestra original.



Número más probable por 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	35	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	39	150

Tabla de Número Más Probable

Número de tubos que dan reacción positiva entre:			NMP	Límites de confianza del 95%	
Cinco tubos de 10 ml.	Cinco tubos de 1 ml.	Cinco tubos de 0,1 ml.		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	2	0,5	7
0	1	0	2	0,5	7
0	2	0	4	0,5	11
1	0	0	2	0,5	7
1	1	1	4	0,5	11
1	1	0	4	0,5	11
1	2	0	6	0,5	15
2	0	0	5	0,5	13
2	1	1	7	1	17
2	1	0	9	2	21
2	2	0	9	2	21
3	0	0	12	3	28
3	1	1	8	1	19
3	1	0	11	2	25
3	2	0	11	2	25
4	0	0	14	4	34
4	1	0	14	4	34
4	2	1	17	5	46
4	3	0	17	5	46
4	4	0	13	3	31
4	4	1	17	5	46
4	4	2	17	5	46
4	4	3	21	7	63
4	4	4	26	9	78
4	4	0	22	7	67
4	4	1	26	9	78
4	4	2	33	11	93
4	4	3	34	12	96
4	4	4	23	7	70
0	0	1	31	11	89
0	1	0	43	15	114
0	1	1	33	11	93
0	1	2	46	18	120
0	2	0	63	21	154
0	2	1	49	17	126
0	2	2	70	23	168
0	2	3	94	28	219
0	3	0	79	25	187
0	3	1	109	31	253
0	3	2	141	37	343
0	3	3	175	44	503
0	4	0	130	35	392
0	4	1	172	43	496
0	4	2	231	57	698
0	4	3	278	90	849
0	4	4	345	117	999
0	5	0	240	58	754
0	5	1	348	118	1.005
0	5	2	542	180	1.405
0	5	3	918	303	3.222
0	5	4	1.609	635	5.805

**Tabla de Número Más Probable, para series de 5 tubos.**

Tabla 11.1. Número más probable NMP de microorganismos por 100 mililitros, utilizando tres series de cinco tubos cada una y sembrando en cada serie 10, 1 y 0,1 mililitros.

Número de tubos que dan reacción positiva entre:			N M P organismos/ /100 ml	Intervalo de confianza			
3 tubos 10 ml	3 tubos 1 ml	3 tubos 0,1 ml		a 95 %	a 99 %		
0	0	0	< 3	< 1	17	< 1	23
0	0	1	3	< 10	17	< 1	23
0	1	0	3	2	23	< 1	29
0	2	0	6,2	1	21	< 1	28
1	0	0	3,6	2	27	1	35
1	0	1	7,2	2	28	1	36
1	1	0	7,3	4	34	2	43
1	1	1	11	4	35	2	44
1	2	0	11	6	41	4	51
1	2	1	15	6	42	4	52
1	3	0	16	2	38	1	50
2	0	0	9,1	5	48	3	62
2	0	1	14	5	50	3	65
2	1	0	15	8	61	5	77
2	1	1	20	8	63	5	80
2	2	0	21	11	75	7	93
2	2	1	28	12	78	8	97
2	3	0	29	7	129	4	177
3	0	0	23	10	180	10	230
3	0	1	39	20	230	10	290
3	0	2	64	20	210	10	290
3	1	0	43	20	280	20	370
3	1	1	75	40	350	20	450
3	1	2	120	30	390	20	620
3	2	0	93	50	510	30	650
3	2	1	150	80	540	50	820
3	2	2	210	120	800	80	990
3	2	3	290	100	1400	< 100	1900
3	3	0	240	200	2400	100	3200
3	3	1	460	300	4800	200	6400
3	3	2	1100				
3	3	3	> 2400				

**Tabla de Número Más Probable, para series de 3 tubos.**

### ***Cálculo de la concentración***

- Las concentraciones de los organismos indicadores, generalmente, se expresan en número de microorganismos presentes por 100 ml de agua original.
- Para obtener el NMP se siguen dos métodos que dan resultados equivalentes.
- Primer método:
  1. De los datos tomados anteriormente se toma una terna (tres cifras consecutivas), de manera que la última cifra sea cero.
  2. Se determina el NMP para la terna seleccionada en la tabla correspondiente.
  3. Se multiplica este valor por el inverso de la dilución central de la terna considerada.  
Así obtenemos la concentración de coliformes totales por 100 ml de agua

### ***Cálculo de la concentración***

- Segundo método:
  1. De los datos, tomar una terna de forma que la cifra siguiente a la terna considerada sea cero.
  2. Obtener el valor del NMP para la terna deseada.
  3. Multiplicar el valor obtenido por el inverso de la dilución que corresponde a la cifra central de la terna.  
El valor resultante será la concentración de CT/100 ml

Volumen inoculado ml	Dilución	Identificación	Número de tubos positivos		
			Coliformes totales	Resembrada	Coliformes fecales
10	1	10	3	-	-
1	1	1	3	-	-
1	10 <sup>-1</sup>	-1	3	-	-
1	10 <sup>-2</sup>	-2	3	3	2
1	10 <sup>-3</sup>	-3	1	1	0
1	10 <sup>-4</sup>	-4	0	0	0
1	10 <sup>-5</sup>	-5	0	-	-

Se busca la terna 3-1-0 (o la 3-3-1) en la tabla NMP correspondiente (diapositiva 19) y se anota el número asociado a la terna. 43 (o 460).

**Las concentraciones de CT son 43.000 y 46.000 CT/100 ml, respectivamente.**

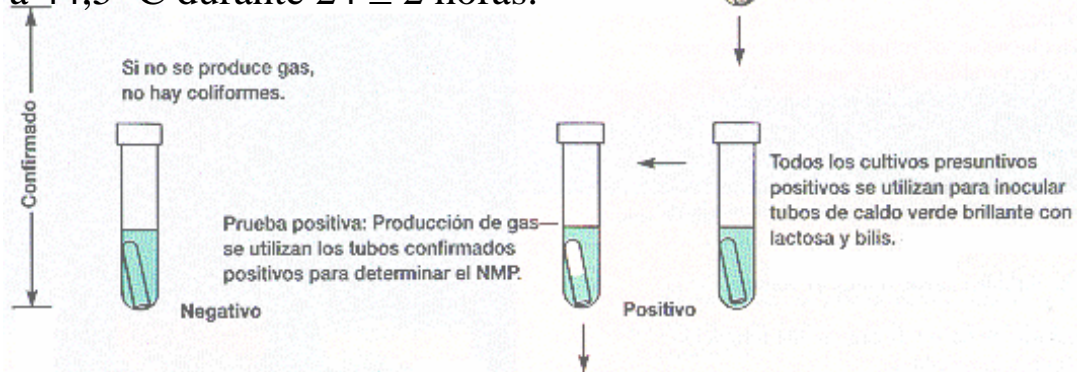
### *Coliformes fecales*

- Denominada **colimetría confirmativa**.
- Los coliformes fecales se determinan a partir de los tubos positivos de la colimetría presuntiva.
- Para la incubación e identificación de los CF, ¿es necesario determinar antes la presencia de CT?
- Según sea el medio de cultivo empleado, existen dos métodos para la identificación de los CF.

Con asa de siembra o pipeta Pasteur se toma una muestra y se inoculan dos nuevos tubos:

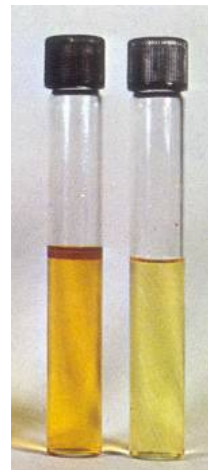
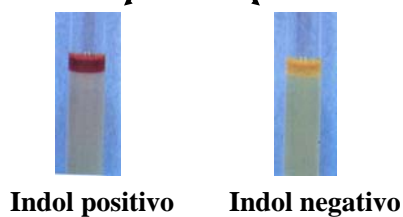
## Colimetría confirmativa

1) El tubo debe contener 10 ml de caldo Verde Brillante al 2% de bilis. El tubo debe tener una campana de Durham. Se considerará positivo si aparece turbidez y formación de gas, después de incubar a  $44,5 \text{ }^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas.

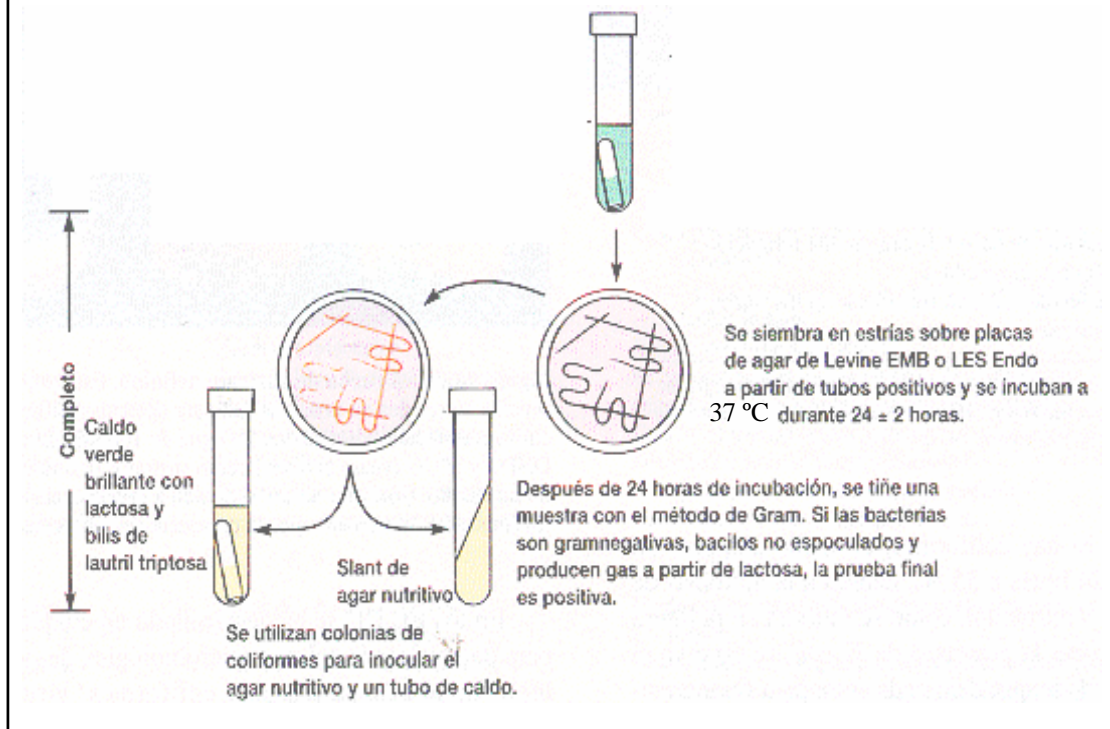


## Colimetría confirmativa

2° tubo) Prueba del indol: Un tubo de hemólisis que contiene 1-2 ml de agua peptonada y triptófano (triptona). La prueba será positiva si al añadir el reactivo de Kovacs, después de incubar a  $44,5 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$  durante  $24 \pm 2$  horas, se forma un anillo de color rojo cereza.



## *Análisis completo*

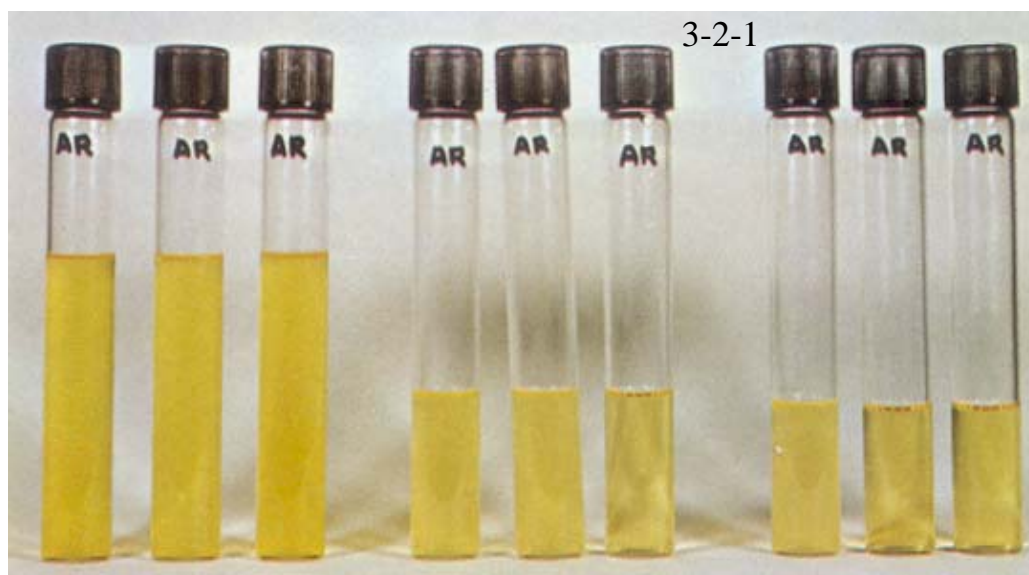


## *Análisis de estreptococos fecales*

- La legislación para aguas de baño recomienda un método de prospección para estreptococos basado en el contaje presuntivo con la técnica del NMP. El análisis consta de 2 pruebas:
  - **Presuntiva**, y
  - **Confirmativa**.
- Medios recomendados: **caldo glucosa azida** (medio de Rothe), para la prueba presuntiva, y el **caldo violeta de etil-glucosa azida** (medio de Litski, EVA), para la prueba con-firmativa

### *Estreptometría presuntiva*

Se inoculan los tubos que contienen el caldo de glucosa azida sódica o medio de Rothe, y se incuban a  $37 \pm 0,5$  °C durante  $24 \pm 2$  horas. Los tubos considerados negativos se incubarán hasta las  $48 \pm 2$  horas. **Positivos = turbidez o sedimento**



### *Estreptometría confirmativa*

De cada tubo positivo de la prueba anterior se toma una muestra con asa de siembra o con una pipeta Pasteur estéril y se inocula en un tubo con 10 ml de caldo violeta de etil-glucosa azida sódica, o **medio de Litski**. Se incuban durante  $24 \pm 2$  horas a  $37 \pm 0,5$  °C. Los tubos que muestren crecimiento, manifestado por la aparición de turbiedad y un precipitado blanco-violeta, serán considerados positivos.



Volumen inoculado ml	Dilución	Número de tubos positivos		
		Prueba presuntiva	Resembrada	Prueba confirmativa
10	1	3	3	1
1	1	2	2	1
1	10 <sup>-1</sup>	1	1	0
1	10 <sup>-2</sup>	0	-	-

