

<b>IPET 132 PARAVACHASCA</b>
<b>TRABAJO PRÁCTICO N° 5</b>
<b>CURSO: 6º B</b>
<b>ASIGNATURA: PROCESOS MICROBIOLÓGICOS</b>
<b>TEMA: RECUENTO DE COLIFORMES EN AGUA</b>
<b>CRITERIOS DE EVALUACIÓN:</b>
<p>1- Tu correcta participación .</p> <p>2- Comunicarte con tU docentes para aclarar dudas.</p> <p>3- Prolijidad en la entrega de las actividades, pasar las actividades a la carpeta, colocar nombre en cada hoja y numerarlas. Todo con lapicera y letra clara.</p> <p>4- Entregar el TP en la fecha solicitada.</p>
<b>CONSULTAS: 3547467099 Profe: Giacomini Fabiana</b>

### OBJETIVOS :

- **COMPRENDER LA IMPORTANCIA DE ALGUNOS PARÁMETROS QUE INDICAN LA CALIDAD DEL AGUA.**
- **INTERPRETAR LOS RESULTADOS EN BASE AL CAMBIO DE COLOR Y LA PRESENCIA DE GAS EN EL MEDIO.**
- **INTERPRETAR LOS RESULTADOS SEGÚN VALORES DE REFERENCIA DANDO UNA OPINION CRÍTICA AL RESPECTO.**
- **APLICAR CRITERIO DE RECOLECCION DE MUESTRA Y SIEMBRA .**



## DETERMINACION DE COLIFORMES TOTALES

### ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO: BACTERIAS COLIFORMES

- **1.FUNDAMENTO:** Los coliformes reagrupan ciertas especies bacterianas pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, de morfología bacilar, Gram negativas, aerobias o anaerobias facultativas, oxidasa negativa, no esporuladas y que fermentan la lactosa con producción de ácido a 37°C en 24-48 horas
- Del grupo coliformes forman parte varios géneros:
- Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter.
- -Escherichia coli produce dolor abdominal, diarrea, náuseas, vómitos y fiebre.
- -Klebsiella produce enfermedades respiratorias.
- -Citrobacter produce alteraciones a nivel del colon y a nivel intestinal



### COLIFORMES :

**Es un grupo de bacterias en forma de bastoncitos y que tienen la CAPACIDAD DE FERMENTAR LA LACTOSA CON PRODUCCION DE ACIDO LACTICO Y CO<sub>2</sub> (DIOXIDO DE CARBONO ) que es un gas.**

Los métodos para determinar bacterias coliformes en agua, se basan en la probabilidad de estos microorganismos de fermentar la lactosa con producción de ácido láctico y gas (CO<sub>2</sub>).

En la técnica de NMP determinamos la concentración de bacterias coliformes en agua, en base al número de tubos que sembrados en un medio de cultivo líquido, llamado Caldo Mac Conkey, producen resultados positivos (presencia de gas en campana de Durham que se halla invertida dentro de los tubos con medio de cultivo y cambio de color dentro del medio por la presencia de ácido láctico) dentro de las 48 horas de incubación a 37 °C.

Usamos un Caldo llamado Mac Conkey . que es un caldo porque no tiene agar- (esa especie de gelatina que estudiamos en la clase anterior )

### Medio de cultivo Caldo Mac Conkey: composición

- \_ Peptona-----
- \_ Lactosa----- (un azúcar)
- \_ Rojo neutro----- (un indicador de Ph)
- \_ Purpura de Bromocresol--- (indicador de pH)

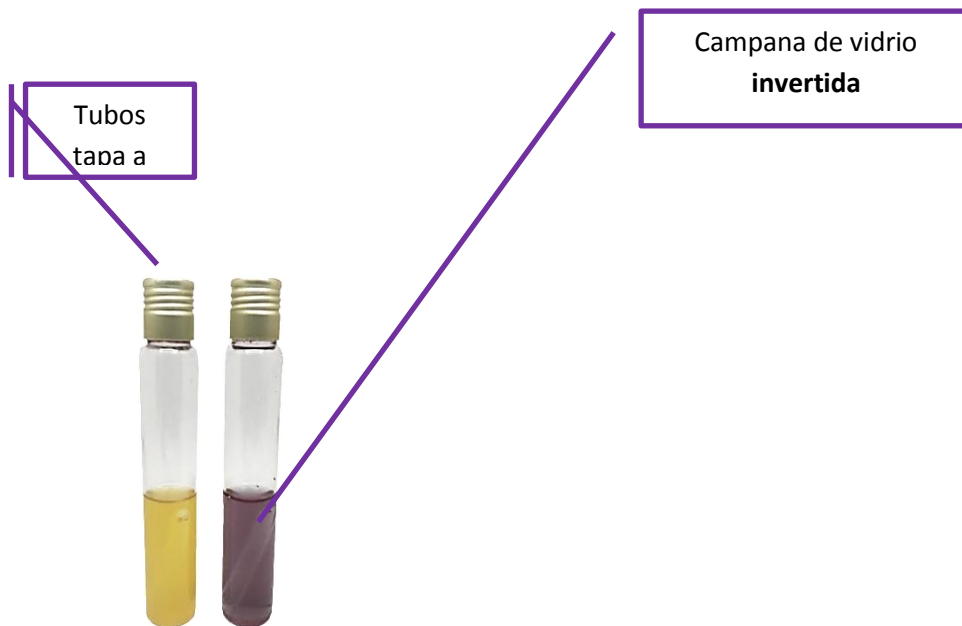


### **PARTE 1**

### **PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO Y FUNDAMENTO DE LA TECNICA**

Se pesa cierta cantidad de gramos (previamente calculadas por regla de tres ) en una balanza analítica sobre vidrio de reloj y se pasa a un Erlenmeyer con cierta cantidad de agua calculada y medida en probeta.

Se forma un líquido rojo vino , se lleva a ebullición sobre mechero de Bunsen y luego se pasan tubos tapa rosca con una campanita de vidrio invertida.(campana de Durham). Luego se esterilizan en autoclave a 121 °C por 15 minutos.



Este caldo de cultivo una vez preparado es color Rojo vino porque tiene Rojo neutro y Púrpura de Bromocresol . como indicadores de pH.

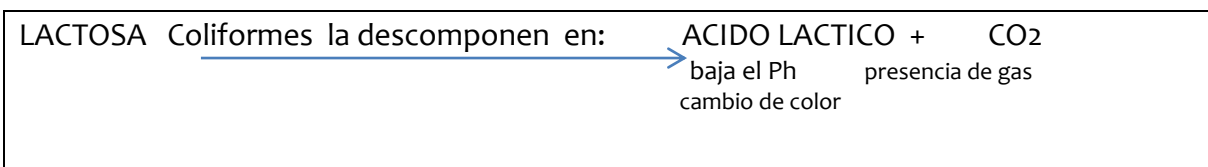
Luego se coloca en los tubos el agua problema. ( con pipeta estéril)

Se incuban en Estufa de Cultivo por 24- 48 ° C.

#### FUNDAMENTO DE LA TECNICA

Las bacterias coliformes fermentan la LACTOSA (el azúcar que está presente en el Caldo Mac Conkey) y la transforman en Ácido Láctico más CO<sub>2</sub> (gas).

En resumen:



ACIDO LACTICO + CO<sub>2</sub> (GAS)

## BACTERIAS COLIFORMES EN CALDO MAC CONKEY

- Si se forma ácido láctico por acción de las bacterias Coliformes, El Ph disminuye porque hay más ácido y el indicador de Ph cambiará de color (de color rojo vino a amarillo).
- EL Dióxido de Carbono CO<sub>2</sub> producto de la fermentación al ser un GAS ocupará la campanita invertida que se verá a través del tubo.



Mac Conkey (-)

Mac Conkey (+)

En la figura anterior el tubo de la izquierda es Negativo porque no hay cambio de color ni gas en la campanita.

El tubo de la derecha es (+): porque hay cambio de color (de rojo a amarillo=), esto se debe a que el ácido láctico que se formó disminuyó el pH del medio de cultivo y porque hay una burbuja de gas en la campanita de vidrio invertida por la producción de CO<sub>2</sub>

## ACTIVIDADES DE RECONOCIMIENTO

- 1 ¿Qué síntomas o malestares producen las bacterias del grupo COLIFORMES si están presentes en alta concentración en agua?
- 2 Por qué el medio de cultivo artificial que se usa para detectar COLIFORMES se le llama CALDO?.
- 3 ¿Qué es la LACTOSA que contiene el Caldo MAC CONKEY?
- 4 Indica los nombres de los Indicadores de Ph que contiene el Caldo Mac Conkey.
- 5 ¿qué sucede si se forma ácido láctico por acción de las bacterias coliformes con el Ph y qué cambio se produce en el Indicador de Ph?
- 6 ¿Dónde proviene el ácido láctico?
- 7 Dónde se origina el dióxido de Carbono CO<sub>2</sub>?
- 8 ¿cómo se evidencia la presencia del gas dióxido de carbono CO<sub>2</sub>?
- 9 Se coloca una muestra de agua problema en un tubo con CALDO MAC CONKEY (color Rojo vino) se lleva en estufa de cultivo a 37°C y las 24 horas el CALDO cambió a color amarillo y se ve gas en la campanita de vidrio.

RESPONDE CORRECTO O INCORRECTO SEGÚN LA SITUACIÓN ANTERIOR:

- A** El resultado es POSITIVO para COLIFORMES porque hay presencia de gas, pero no se fermentó la LACTOSA
- B** EL resultado es NEGATIVO porque hay cambio de color.
- C** El resultado es POSITIVO porque hay presencia de gas (CO<sub>2</sub>) y se fermentó la LACTOSA con producción de ACIDO LACTICO el cual hizo SUBIR el PH del MEDIO y el indicador cambió de color.
- D** El resultado es POSITIVO porque hay presencia de gas (CO<sub>2</sub>) y se fermentó la LACTOSA con producción de ACIDO LACTICO el cual hizo DISMINUIR el PH del MEDIO y el indicador cambió de color.

## PARTE 2

### SIEMBRA DEL AGUA PROBLEMA

#### 10 ACTIVIDAD A REALIZAR EN FORMA PRESENCIAL EN LABORATORIO CON DOCENTE Y MEP

Calcula Y preparar r los g de caldo Mac conkey DOBLE CONCENTRACION que se deben pesar para preparar 500ml de caldo si en el rótulo dice:

“Diluir 35 g de caldo por litro de agua ....”:

Al ser caldo doble concentración debo multiplicar la cantidad que indica el rótulo por 2

(35 x2) 70 g \_\_\_\_\_ en 1000ml de agua destilada estéril

X= ----- 500ml

X= 500ml.70 g : 1000ml =-----

11 Calcula Y preparar l os g de caldo Mac conkey SIMPLE CONCENTRACION que se deben pesar para preparar 500ml de caldo si en el rótulo dice:

“Diluir 35 g de caldo por litro de agua ....”:

.....  
 .....  
**12** Cuenta con tus palabras como preparaste el Caldo Mac conkey (desde el cálculo, pesada, pasaje al recipiente, agregado del agua, colocación en tubos tapa Rosca con campana de Durham y tiempo de esterilización en Tº de autoclave)

**13** Cuenta cómo se toma una muestra de agua de red.

#### DISTRIBUCION DEL CALDO EN LOS TUBOS TAPA ROSCA

Una vez preparado el Mac Conkey se colocan con pipeta estéril 10 ml de MAC CONKEY DOBLE CONCENTRACION en 5 tubos.

Además en 2 tubos se agregan 5 ml de **Mac conkey simple concentración**

#### **SIEMBRA DE LA MUESTRA DE AGUA PROBLEMA**

**Elijan una canilla de dónde obtener la muestra de agua, (baño, cocina, taller..) y una muestra de agua de río o agua sucia.**

**Rotulen los frascos estériles y tomen las muestras con las precauciones que aprendimos en el TP anterior**

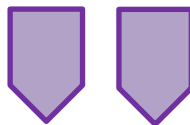
Sembrar con pipeta estéril alrededor de llama del mechero 10 ml de muestra de agua

10ml Mac Conkey D.C  
 + 10ml de H<sub>2</sub>O



Además en 2 tubos se agregan 5 ml de **Mac conkey simple concentración** y se siembran **1 ml y 0.1 ml** de la muestra problema.

5 ml Mac Conkey S.C  
 + 1 ml H<sub>2</sub>O  
 Y 0.1 ml H<sub>2</sub>O



*Incubar en estufa de Cultivo a 36°C por 24- 48 horas.*

**14** ¿Cuántos ml de Caldo Mac Conkey D.C se colocan en los 5 tubos y cuántos ml de agua se siembran en ellos?

**15** Cuántos ml de Caldo Mac Conkey Simple C se colocan en los 2 tubos y cuántos ml de agua se siembran en ellos?

**16** Cuánto tiempo se incuban los tubos y a qué temperatura? ¿En cuál instrumento del laboratorio?

**17** Describe y fundamenta un resultado positivo

**18** describe y fundamenta un resultado negativo.

### **PARTE 3 ANALISIS DE LOS RESULTADOS**

VALORES ACEPTADOS SEGÚN AL CODIGO ALIMENTARIO ARGENTINO PARA AGUA POTABLE

MICROORGANISMOS	VALOR MAXIMO ADMITIDO
Recuento aerobio mesófilo en Placa P.C.A	Menor de 100UFC / ml de agua
Coliformes totales (Caldo Mac Conkey)	Menor de 2

