

ORDEN DE 8 DE MAYO DE 1987 POR LA QUE SE APRUEBAN LOS METODOS OFICIALES DE ANALISIS MICROBIOLOGICOS PARA LA ELABORACION, CIRCULACION Y COMERCIO DE AGUAS DE BEBIDA ENVASADAS.

EL DECRETO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO NUMERO 2484/1967, DE 21 DE SEPTIEMBRE (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DEL 17 AL 23 DE OCTUBRE), QUE APRUEBA EL CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL, PREVE QUE PUEDAN SER OBJETO DE REGLAMENTACIONES ESPECIALES LAS MATERIAS EN EL REGULADAS.

PUBLICADO EL DECRETO DE LA PRESIDENCIA DEL GOBIERNO NUMERO 2519/1974, DE 9 DE AGOSTO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 13 DE SEPTIEMBRE), QUE REGULA LA ENTRADA EN VIGOR, APLICACION Y DESARROLLO DEL CODIGO ALIMENTARIO ESPAÑOL, ASI COMO EL REAL DECRETO 2119/1981, DE 24 DE JULIO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 21 DE SEPTIEMBRE), POR LA QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACION TECNICO-SANITARIA PARA LA ELABORACION, CIRCULACION Y COMERCIO DE AGUAS DE BEBIDA ENVASADAS, PROCEDE DICTAR, DE ACUERDO CON LA AUTORIZACION CONTENIDA EN EL MISMO, LOS CORRESPONDIENTES METODOS OFICIALES DE ANALISIS MICROBIOLOGICOS.

EN SU VIRTUD, A PROPUESTA DE LOS MINISTERIOS DE ECONOMIA Y HACIENDA, DE INDUSTRIA Y ENERGIA, DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION Y DE SANIDAD Y CONSUMO, PREVIO INFORME PRECEPTIVO DE LA COMISION INTERMINISTERIAL PARA LA ORDENACION ALIMENTARIA, Y OIDOS LOS REPRESENTANTES DE LAS ORGANIZACIONES AFECTADAS, ESTE MINISTERIO DE RELACIONES CON LAS CORTES Y DE LA SECRETARIA DEL GOBIERNO DISPONE:

PRIMERO. SE APRUEBAN COMO OFICIALES LOS METODOS DE ANALISIS MICROBIOLOGICOS PARA LA ELABORACION, CIRCULACION Y COMERCIO DE AGUAS DE BEBIDAS ENVASADAS QUE SE CITAN EN EL ANEXO.

SEGUNDO. CUANDO NO EXISTAN METODOS OFICIALES PARA DETERMINADOS ANALISIS, Y HASTA TANTO LOS MISMOS NO SEAN PROPUESTOS POR EL ORGANO COMPETENTE Y PREVIAMENTE INFORMADOS POR LA COMISION INTERMINISTERIAL PARA LA ORDENACION ALIMENTARIA, PODRAN SER UTILIZADOS LOS APROBADOS POR LOS ORGANISMOS NACIONALES O INTERNACIONALES DE RECONOCIDA SOLVENCIA.

DISPOSICION DEROGATORIA

QUEDAN DEROGADAS LAS DISPOSICIONES DE IGUAL O INFERIOR RANGO QUE SE OPONGAN A LA PRESENTE ORDEN Y, ESPECIALMENTE, EL ANEXO I DEL DECRETO 607/1975, DE 13 DE MARZO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 29 DE MARZO), POR EL QUE SE REGULAN LAS ESPECIFICACIONES MICROBIOLOGICAS A LAS QUE HAN DE AJUSTARSE LAS AGUAS MINERO MEDICINALES ENVASADAS, Y LOS ARTICULOS 2., 3. Y 4. DEL REAL DECRETO 1507/1976, DE 21 DE MAYO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 2 DE JULIO), POR EL QUE SE INTRODUCEN MODIFICACIONES EN LOS DECRETOS 797/1975, DE 21 DE MARZO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 18 DE ABRIL), Y 607/1975, DE 13 DE MARZO (<BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO> DE 29 DE MARZO), DE CONFORMIDAD CON LO DISPUESTO EN EL ARTICULO 15.7 DEL REAL DECRETO 2119/1981, DE 24 DE JULIO, POR EL QUE SE APRUEBA LA REGLAMENTACION TECNICO-SANITARIA PARA LA ELABORACION, CIRCULACION Y COMERCIO DE AGUAS DE BEBIDA ENVASADAS.

DISPOSICION FINAL

LA PRESENTE DISPOSICION ENTRARA EN VIGOR A LOS TREINTA DIAS DE SU PUBLICACION EN EL <BOLETIN OFICIAL DEL ESTADO>.

MADRID, 8 DE MAYO DE 1987.

ZAPATERO GOMEZ

EXCMOS. SRES. MINISTROS DE SANIDAD Y CONSUMO, DE ECONOMIA Y HACIENDA, DE INDUSTRIA Y ENERGIA, Y DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACION.

ANEXO

1.

PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS.

2.

ESCHERICHIA COLI.

3.

SALMONELLA.

4.

ESTREPTOCOCOS FECALES.

5.

CLOSTRIDIOS SULFITO-REDUCTORES.

6.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

1. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA EL ANALISIS UNA VEZ RECIBIDAS LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO, DEBERAN MANTENERSE EN SITIO FRESCO Y OSCURO, PROCEDIENDO A SU ANALISIS LO ANTES POSIBLE.

AGITAR, CON OBJETO DE HOMOGENEIZAR LA MUESTRA, UN MINIMO DE 25 VECES.

ANTES DE PROCEDER A LA ABERTURA DE LOS ENVASES, DESINFECTAR EL CUELLO Y TAPON. SI EL MATERIAL ES DE VIDRIO SE EFECTUARA A LA LLAMA, EN CASO DE SER EL RECIPIENTE DE OTRO MATERIAL, LA DESINFECCION SE REALIZARA CON ALGODON IMPREGNADO EN ALCOHOL DE 70 O UNA SOLUCION DE UNA SAL DE AMONIO CUATERNARIO.

UNA VEZ ABIERTO EL RECIPIENTE, ESTERILIZAR LA BOCA O ABERTURA A LA LLAMA. EN CASO DE QUE EL ENVASE NO TENGA BOCA (TETRABRICK, BOLSA DE MATERIAL POLIMERICO), FLAMEAR PREVIAMENTE LAS TIJERAS U OTRO INSTRUMENTO QUE SE UTILICE PARA ABRIR EL ENVASE.

EL VOLUMEN TOMADO DE LA MUESTRA SERA EL NECESARIO PARA LOS ANALISIS A REALIZAR. EN EL CASO DE QUE PARA EFECTUAR LOS ANALISIS SE NECESITE MAS DE UN ENVASE Y UNA VEZ ABIERTOS COMO SE ESPECIFICA ANTERIORMENTE, SE MEZCLARA EL CONTENIDO DE LOS ENVASES NECESARIOS EN UN RECIPIENTE DE VIDRIO CON TAPON DE ROSCA O ESMERILADO DE CAPACIDAD SUFICIENTE, PREVIAMENTE ESTERILIZADO. AGITAR NUEVAMENTE EL RECIPIENTE PARA SU HOMOGENEIZACION.

2. ESCHERICHIA COLI

2.1 DEFINICIONES

2.1.1 COLIFORMES:

SE ENTIENDE POR COLIFORMES AQUELLAS BACTERIAS DE MORFOLOGIA BACILAR, GRAM NEGATIVAS, AEROBIAS Y ANAEROBIAS FACULTATIVAS, OXIDASA NEGATIVAS, NO ESPOROGENAS, QUE FERMENTAN LA LACTOSA CON PRODUCCION DE ACIDO Y DE GAS A 37 C EN UN TIEMPO MAXIMO DE CUARENTA Y OCHO HORAS.

2.1.2 ESCHERICHIA COLI:

SE ENTIENDE POR ESCHERICHIA COLI AQUELLA BACTERIA COLIFORME, GENERALMENTE INDOL POSITIVA, CITRATO NEGATIVA, ROJO DE METILO POSITIVA, QUE NO PRODUCE ACETILMETILCARBINOL Y CAPAZ DE FERMENTAR LA LACTOSA CON PRODUCCION DE ACIDO Y GAS ENTRE 37 C Y 44 C EN UN TIEMPO MAXIMO DE VEINTICUATRO HORAS.

2.2 FUNDAMENTO EL PROCEDIMIENTO COMPRENDE LAS PRUEBAS PREVIAS Y DE CONFIRMACION DE ESCHERICHIA COLI.

2.3 MATERIAL

2.3.1 MATERIAL DE USO CORRIENTE EN EL LABORATORIO.

2.3.2 ESTUFA REGULABLE A 37 °C.

2.3.3 ESTUFA O BAÑO TERMORREGULABLES A 44 ± 0,5 °C.

2.3.4 MEMBRANAS FILTRANTES DE ESTERES DE CELULOSA, DE 0,45 MICRAS DE POROSIDAD, DE 47 A 50 MM DE DIAMETRO, ESTERILES.

2.3.5 EQUIPO DE FILTRACION POR VACIO.

2.3.6 PLACAS DE PETRI DE DIAMETRO SUPERIOR AL DEL FILTRO DE MEMBRANA.

2.4 MEDIOS DE CULTIVO 2.4.1 CALDO LACTOSADO SIMPLE:

EXTRACTO DE CARNE 3 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G

LACTOSA 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO, AJUSTAR EL PH Y REPARTIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO. LOS TUBOS IRAN PROVISTOS DE CAMPANA DE FERMENTACION (TUBO DURHAM).

PARA LOS TUBOS DE LA SERIE QUE RECIBAN VOLUMENES DE AGUA DE 10 ML DEBERA PREPARARSE EL MEDIO A DOBLE DE CONCENTRACION DUPLICANDO LAS CANTIDADES DE LOS COMPONENTES EN EL MISMO VOLUMEN DE AGUA DESTILADA Y DISTRIBUYENDO A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

PARA LOS TUBOS O FRASCOS DE LA SERIE QUE TENGAN QUE RECIBIR VOLUMENES DE AGUA A 50 ML SE UTILIZARA EL MISMO MEDIO CONCENTRADO, PERO DISTRIBUYENDO A RAZON DE 50 ML POR CADA UNO. ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE 15 MINUTOS.

EL PH FINAL DEL CALDO DEBERA SER 6,8-7.

2.4.2 MEDIO DE CULTIVO SOLIDO AGAR, LACTOSA, EOSINA, AZUL DE METILENO (TEAGUE LEVINE O EMB):

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

LACTOSA 10 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄HK₂) 2 G

AGAR 15 G

EOSINA AMARILLENTO 0,4 G

AZUL DE METILENO 0,065 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO SUAVE Y REPARTIR A RAZON DE 15 A 20 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE QUINCE MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 7,1.

2.4.3 AGAR COMUN:

EXTRACTO DE CARNE 3 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G

AGAR 15 G

AGUA 1.000 ML

DISOLVER POR CALENTAMIENTO. AJUSTAR EL PH A 7. REPARTIR EL MEDIO EN TUBOS DE 16-160 MM A RAZON DE 5 A 6 MM POR TUBO. ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE QUINCE MINUTOS. DEJA ENFRIAR LOS TUBOS EN POSICION INCLINADA, HASTA LA SOLIDIFICACION.

2.4.4 AGUA DE TRIPTONA:

TRIPTONA 10 G

CLORURO SODICO 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES EN EL AGUA DESTILADA, AJUSTAR EL PH Y REPARTIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN EL AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE QUINCE MINUTOS. EL PH FINAL

DEL MEDIO DEBERA SER 7,2.

2.4.5 MEDIO DE TRIPTONA, GLUCOSA, FOSFATO (CLARK Y LUBS):

TRIPTONA 10 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄HK₂) 5 G

GLUCOSA 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO LIGERO Y REPARTIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 7,5.

2.4.6 MEDIO DE CITRATO (SIMMONS):

SULFATO MAGNESICO (SO₄MG₇H₂O) 0,2 G

FOSFATO MONOAMONICO PO₄HK₂(NH₄) 1 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄HK₂) 1 G

CITRATO SODICO 2 G

CLORURO SODICO 5 G

AZUL DE BROMOTIMOL 0 ,08 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO Y DISTRIBUIR EN TUBOS.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS. EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 6,8. DEJAR QUE EL MEDIO SOLIDIFIQUE EN POSICION INCLINADA.

2.4.7 CALDO LACTOSADO, SALES BILIARES, FOSFATOS (MEDIO EC, DE HAJNA Y PERRY):

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

LACTOSA 5 G

MEZCLA DE SALES BILIARES O SALES BILIARES NUMERO 3 1 ,5 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄HK₂) 4 G

FOSFATO MONOPOTASICO (PO₄H₂K) 1 ,5 G

CLORURO SODICO 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO Y REPARTIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

LOS TUBOS IRAN PROVISTOS DE CAMPANA DE FERMENTACION (TUBO DURHAM).

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 6,9.

2.4.8 MEDIO DE CULTIVO SOLIDO AGAR-LACTOSA-TRIFENIL-TERGITOL 7 (CHAPMAN TTC MODIFICADO):

EXTRACTO DE CARNE 5 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

LACTOSA 20 G

EXTRACTO DE LEVADURA 6 G AZUL DE BROMOTIMOL (SOLUCION AL 1 POR 100). 5 ML

AGAR 20 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO, AJUSTAR EL PH A 7,2 Y REPARTIR A RAZON DE 100 ML EN MATRACES O FRASCOS DE 150 ML CON TAPON DE ROSCA.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS.

EN EL MOMENTO DE SU EMPLEO, FUNDIR ALBAÑO MARIA Y AÑADIR A CADA FRASCO:

5 ML DE UNA SOLUCION ACUOSA DE CLORURO O BROMURO DE 2,3, 5 TRIFENIL-TETRAZOLIO (TTC) AL 0,05 POR 100, ESTERILIZADA EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS.

5 ML DE UNA SOLUCION ACUOSA DE HEPTADECIL SULFATO SODICO (TERGITOL 7) AL 0,2 POR 100. NO ES NECESARIO ESTERILIZAR ESTA SOLUCION. MEZCLAR BIEN Y REPARTIR EN PLACAS DE PETRI, DEJANDO SOLIDIFICAR. EL ESPESOR DEL MEDIO EN LAS PLACAS DEBE SER, COMO MINIMO, DE 5 MM. LAS PLACAS ASI PREPARADAS PUEDEN CONSERVARSE A 4 2 C DURANTE OCHO DIAS.

2.4.9 REACTIVOS.

2.4.9.1 REACTIVO DE KOVAC-INDOL:

PARADIMETILAMINOBENZALDEHIDO 5 G

ALCOHOL AMILICO 75 ML

ACIDO CLORHIDRICO CONCENTRADO 25 ML

DISOLVER EL ALDEHIDO EN EL ALCOHOL CALENTANDO A BAÑO MARIA A 60 C.

DESPUES DE FRIO, AÑADIR GOTA A GOTA EL ACIDO.

CONSERVAR A 4 2 C EN FRASCO TOPACIO.

2.4.9.2 ROJO DE METILO:

DISOLVER 0,5 G DE ROJO DE METILO EN 100 ML DE ETANOL DE 60 C.

2.4.9.3 REACTIVO PARA EL ACETIL-METIL-CARBINOL (VOGES-PROSIUER, MODIFICADO):

A) DISOLVER 5 G DE ALFA-NAFTOL EN 100 ML DE ETANOL DE 60 C.

B) DISOLVER 40 G DE HIDROXIDO POTASICO EN 100 ML DE AGUA DESTILADA. CONSERVAR A) Y B) EN FRASCOS SEPARADOS, EL PRIMERO DE ELLOS EN NEVERA A 4 2 C.

2.4.9.4 REACTIVO KOVAC-CITROCROMO-OXIDASA.

SOLUCION ACUOSA AL 1 POR 100 DE CLORHIDRATO DE TETRAMETIL PARAFENILENDIAMINA. ESTE REACTIVO DEBE SER INCOLORO Y DEBE CONSERVARSE EN FRASCO DE COLOR TOPACIO OSCURO, CERRADO CON TAPON DE VIDRIO ESMERILADO Y GUARDADO EN NEVERA.

EL TIEMPO DE DURACION ES DE DOS SEMANAS A 4 2 C.

2.5 PROCEDIMIENTO

SE DESCRIBEN TRES METODOS DE ANALISIS DE LOS CUALES EL METODO 1 SERA EL PROCEDIMIENTO OFICIAL OBLIGATORIO EN CASOS DE LITIGIO.

2.5.1 METODO 1:

2.5.1.1 PRUEBA PREVIA.

ES UN PROCEDIMIENTO DE CRIBA EN EL QUE UNA REACCION NEGATIVA EXCLUYE LA PRESENCIA DEL GRUPO COLIFORME Y UNA REACCION POSITIVA INDICA SU POSIBLE PRESENCIA 2.5.1.1.1 TECNICA.

DISPONER EN GRADILLA UNA SERIE DE TUBOS Y, EN SU CASO, FRASCOS CON CALDO LACTOSADO (2.4.1) SIMPLE Y DOBLE CONCENTRADO, SEGUN LA TABLA NMP QUE SE HAYA ELEGIDO.

MEDIANTER PIPETAS ESTERILES, SEMBRAR LOS TUBOS DE LA SERIE TOMANDO LOS VOLUMENES DEL AGUA, YA HOMOGENEIZADA, QUE SE INDICAN EN LA TABLA.

LOS VOLUMENES DE 10 ML Y DE 50 ML DE AGUA DEBERAN SEMBRARSE EN TUBOS O FRASCOS CONTENIENDO MEDIO A DOBLE CONCENTRACION. HOMOGENEIZAR LOS TUBOS SEMBRADOS.

INCUBAR A 37 1 C DURANTE VEINTICUATRO HORAS Y EN SU CASO, HASTA CUARENTA Y OCHO TRES HORAS.

2.5.1.1.2 LECTURA E INTERPRETACION.

SE CONSIDERAN TUBOS POSITIVOS AQUELLOS EN LOS QUE SE OBSERVA ENTURBIAMIENTO Y APARICION DE GAS EN LA CAMPANA DE FERMENTACION, INDEPENDIENTEMENTE DE SU CANTIDAD.

LA PRODUCCION DE GAS SE PONE TAMBIEN DE MANIFIESTO POR EL DESPRENDIMIENTO DE PEQUEÑAS BURBUJAS QUE ATRAVIESAN EL MEDIO AL AGITAR SUAVEMENTE EL TUBO.

LA AUSENCIA DE GAS AL CABO DE CUARENTA Y OCHO TRES HORAS SE CONSIDERA COMO PRUEBA NEGATIVA.

2.5.1.1.3 PRUEBA DE CONFIRMACION DE COLIFORMES TOTALES.

ES UN PROCEDIMIENTO MEDIANTE EL CUAL UNA REACCION NEGATIVA EXCLUYE LA PRESENCIA DEL GRUPO COLIFORME MIENTRAS QUE UNA REACCION POSITIVA INDICA SU PRESENCIA INEQUIVOCA.

DEBEN SOMETERSE A ESTA PRUEBA TODOS LOS TUBOS QUE HAYAN RESULTADO POSITIVOS EN LA PRUEBA PRESUNTIVA.

EN LOS TUBOS EN LOS QUE LA POSITIVIDAD SE MANIFIESTA A LAS VEINTICUATRO HORAS NO ES NECESARIO CONTINUAR LA INCUBACION, PUDIENDO INICIARSE ENTONCES CON ELLOS LA PRUEBA DE CONFIRMACION.

2.5.1.1.4 DETERMINACION.

TOMAR TANTOS TUBOS DE AGAR-EOSINA-AZUL DE METILENO (2.4.2) COMO TUBOS POSITIVOS PRESUNTIVOS.

FUNDIR TOTALMENTE EL MEDIO COLOCANDO LOS TUBOS EN BAÑO MARIA. VERTER EL MEDIO CONTENIDO EN CADA TUBO EN SENDAS PLACAS DE PETRI DE 10 CM DE DIAMETRO.

DEJAR SOLIDIFICAR.

HOMOGENEIZAR CADA UNO DE LOS TUBOS DE CALDO LACTOSADO PRESUNTIVO POSITIVO.

RESEMBRAR CON ASA EN SUPERFICIE Y POR AGOTAMIENTO SOBRE EL MEDIO SOLIDIFICADO EN LA PLACA DE PETRI.

INCUBAR A 37 °C LAS PLACAS INVERTIDAS DURANTE VEINTICUATRO DOS HORAS.

SOBRE ESTE MEDIO LAS BACTERIAS FERMENTADORAS DE LA LACTOSA DAN COLONIAS CARACTERISTICAS OPACAS Y PIGMENTADAS EN ROSA, AZUL O VIOLETA OSCURO CON O SIN REFLEJO METALICO.

LAS COLONIAS DISTINTAS DE LAS DESCRITAS CORRESPONDEN A BACTERIAS NO FERMENTADORAS DE LA LACTOSA.

DE CADA PLACA SELECCIONAR UNA COLONIA DE CADA UNO DE LOS DIFERENTES ASPECTOS DESCRITOS COMO CARACTERISTICOS Y RESEMBRAR MEDIANTE HILO O ASA DE PLATINO SOBRE AGAR NUTRITIVO INCLINADO (2.4.3). A CONTINUACION, Y SIN RECARGAR, RESEMBRAR UN TUBO DE CALDO LACTOSADO. INCUBAR AMBOS MEDIO A 37 °C DURANTE VEINTICUATRO DOS HORAS.

2.5.1.1.5 PRUEBA DE LA OXIDASA.

SI LA COLONIA AISLADA FERMENTA LA LACTOSA, CON PRODUCCION DE GAS SE TOMA UNA PORCION DEL CULTIVO CRECIDO SOBRE EL AGAR NUTRITIVO PARA INVESTIGAR LA AUSENCIA DE OXIDASA.

PARA ELLO, MEDIANTE ASA O HILO DE PLATINO O PIPETA PASTEUR (NO UTILIZAR MATERIAL QUE CONTENGA HIERRO), DEPOSITAR AQUELLA SOBRE UN TROZO DE PAPEL DE FILTRO POROSO IMPREGNADO CON DOS O TRES GOTAS DE REACTIVO DE KOVAC-OXIDASA (2.4.9.4).

LA PRESENCIA DE OXIDASA SE MANIFIESTA POR LA APARICION INMEDIATA (ENTRE 5-10 SEGUNDOS) DE UNA COLORACION VIOLETA O PARDO VIOLETA. AL PRINCIPIO LA COLORACION ES ROSA-ROJA OSCURA Y LUEGO, A LOS 60 SEGUNDOS APROXIMADAMENTE, SE VUELVE NEGRA.

TODA REACCION TARDIA DEBE TOMARSE COMO NEGATIVA.

LA AUSENCIA DE COLORACION INDICA REACCION NEGATIVA (OXIDASA NEGATIVA).

CONFIRMADA LA AUSENCIA DE OXIDASA, PROCEDER A REALIZAR LAS PRUEBAS IMVIC, QUE CONFIRMAN LA IDENTIDAD DE ESCHERICHIA COLI.

2.5.1.2 IDENTIFICACION DE ESCHERICHIA COLI.

A PARTIR DEL CULTIVO DE 24 HORAS EN AGAR NUTRITIVO INDICADO, SEMBRAR LA BATERIA PARA LAS PRUEBAS IMVIC.

2.5.1.2.1 FORMACION DE INDOL (I).

SEMBRAR EN AGUA DE TRIPTONA (2.4.4), E INCUBAR A 37 °C DURANTE 24-48 HORAS.

SOBRE EL CULTIVO DEPOSITAR 1 ML DEL REACTIVO DE KOVAC-INDOL (2.4.9.1). LA PRESENCIA DE ESTE SE MANIFIESTA POR LA FORMACION RAPIDA DE UN COLOR ROSA A ROJO PURPURA, EN LA CAPA SUPERIOR DEL ALCOHOL AMILICO. SI LA REACCION ES NEGATIVA, REPETIRLA EN LOS CULTIVOS DE 48 HORAS.

2.5.1.2.2.

PRUEBA DEL ROJO DE METILO (M) Y DEL ACETIL-METIL-CARBINOL (V) EN MEDIO DE CLARK Y LUBS.

UN ASA DE UN CULTIVO DE 24 HORAS CON LAS CARACTERISTICAS PRECEDENTES SE SIEMBRA EN EL MEDIO DE CLARK Y LUBS (2.4.5), INCUBANDO A 37 °C DURANTE 24 HORAS.

LECTURA E INTERPRETACION DE LA PRUEBA ROJO DE METILO (M).

TOMAR 2 ML DEL CULTIVO DEPOSITANDOLO EN UN TUBO LIMPIO, AÑADIRLE UNA O DOS GOTAS DEL INDICADOR ROJO DE METILO (2.4.9.2). SI EL MEDIO ADQUIERE UN COLOR ROJO, LA PRUEBA ES POSITIVA. SERA NEGATIVA SI EL MEDIO TOMA UN COLOR AMARILLENTO.

LECTURA E INTERPRETACION DE LA FORMACION DE ACETIL-METIL-CARBINOL (V).

A 1 ML DE CULTIVO AGREGARLE 0,6 ML DE REACTIVO ALFA-NAFTOL Y 0,2 ML DE HIDROXIDO POTASICO AL 40 POR 100 (2.4.9.3). AGITAR ENERGICAMENTE Y DEJAR 10 MINUTOS EN ESTUFA A 37 °C.

EL ACETIL-METIL-CARBINOL SE MANIFIESTA POR EL COLOR ROSA-ROJO QUE ADQUIERE TODO EL MEDIO O LA SUPERFICIE DEL MISMO.

2.5.1.2.3.

UTILIZACION DEL CITRATO (C) EN EL MEDIO DE SIMONS. (2.4.6).

CON EL FIN DE EVITAR REACCIONES POSITIVAS FALSAS POR EL APOORTE DE SUSTANCIAS NUTRITIVAS CON EL INOCULO, SE PROCEDERA COMO SIGUE: CON ASA DE PLATINO TOMAR DE LA SUPERFICIE DEL CULTIVO EN AGAR NUTRITIVO DE 24 HORAS, CON LAS CARACTERISTICAS YA SEÑALADAS, EVITANDO UN EXCESO DE MASA MICROBIANA Y MUY ESPECIALMENTE RESTOS DEL AGAR.

INOCULAR UNA ESTRIA EN EL CENTRO DE LA SUPERFICIE INCLINADA DEL MEDIO, INCUBANDO A 37 °C DURANTE 48 HORAS 2 HORAS, OBSERVANDO LOS CULTIVOS CADA DIA.

SI NO CAMBIA EL COLOR VERDE OSCURO DEL MEDIO, EL CITRATO NO ES UTILIZADO; SI ADQUIERE UN COLOR AZUL ULTRAMAR, EL CITRATO ES ASIMILADO.

PARA CONCLUIR QUE LA REACCION ES NEGATIVA DEBERA ESPERARSE HASTA EL FINAL

DEL PERIODO DE INCUBACION.

LOS CULTIVOS CON LAS CARACTERISTICAS PRESUNTIVAS SEÑALADAS EN

2.5.1.1 Y ADEMAS IMIA , SE CONSIDERAN ESCHERICHIA COLI.

EXISTEN CEPAS INDOL NEGATIVAS, POR LO QUE UN RESULTADO IMVIA TAMBIEN SE CONSIDERA COMO ESCHERICHIA COLI.

2.5.2 METODO 2:

2.5.2.1 PRUEBA PREVIA.

(COMO EN 2.5.1.1).

2.5.2.2 PRUEBA CONFIRMATIVA.

A PARTIR DE LOS TUBOS POSITIVOS DE LA PRUEBA PRESUNTIVA PREVIA AGITACION DE LOS MISMOS, TOMAR DE CADA UNO UN ASA LLENA Y RESEMBRARLA EN UN TUBO DEL MEDIO EC DE HANJNA Y PERRY (2.4.7); OTRA ASA SE RESEMBRARÁ EN UN TUBO DE AGUA DE TRIPTONA PARA INDOL (2.4.4). INCUBAR AMBOS MEDIOS EN BAÑO TERMORREGULADO O ESTUFA A 44 0,5 C DURANTE 24 2 HORAS.

LA PRESENCIA DE GAS EN LA CAMPANA DEL MEDIO EC Y DE INDOL EN EL AGUA DE TRIPTONA (REACTIVO 2.4.9.1) CONFIRMAN LA PRESENCIA DE ESCHERICHIA COLI.

2.5.3 METODO 3:

MEMBRANA FILTRANTE.

LOS ELEMENTOS DEL SISTEMA DE FILTRACION QUE VAYAN A ENTRAR EN CONTACTO CON EL AGUA A ANALIZAR DEBEN ESTAR ESTERILES.

COLOCAR UN FILTRO DE MEMBRANA ESTERIL SOBRE EL SOPORTE DE FILTRACION, UTILIZANDO PINZAS ESTERILES.

ADAPTAR EL EMBUDO. FILTRAR 100 ML DE LA MUESTRA DE AGUA, PREVIAMENTE HOMOGENEIZADA, EFECTUANDO EL VACIO NECESARIO. LAVAR CON UNOS 30 ML DE AGUA DE DILUCION ESTERIL. RETIRAR EL EMBUDO.

MEDIANTE LAS PINZAS ESTERILIZADAS TRANSFERIR LA MEMBRANA FILTRANTE SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO (2.4.8) CONTENIDO EN UNA PLACA DE PETRI, DE MODO QUE LA SUPERFICIE DE FILTRACION QUEDE HACIA ARRIBA.

CERRAR E INVERTIR LA PLACA E INCUBAR A 44 0,5 C DURANTE 24 2 HORAS. LAS COLONIAS AMARILLAS O AMARILLAS CON CENTRO ANARANJADO Y HALO AMARILLO SE CONSIDERAN COMO ESCHERICHIA COLI.

3. SALMONELLA

3.1 DEFINICION

SE ENTIENDE POR SALMONELLA AQUELLAS BACTERIAS DE MORFOLOGIA BACILAR, GRAM NEGATIVAS, AEROBIAS Y ANAEROBIAS FACULTATIVAS, OXIDASA NEGATIVAS, FERMENTADORAS DE LA GLUCOSA Y NO DE LA LACTOSA, INDOL, UREASA Y TRIPTOFANODESAMINASA NEGATIVAS Y LISINADSCARBOXILASA POSITIVAS. DIFERENTES CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS Y SEROLOGICAS PERMITEN LA DIFERENCIACION DE DIVERSAS ESPECIES

3.2 FUNDAMENTO

DETERMINACION DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE ESTAS BACTERIAS EN 100 ML DE AGUA, EN MEDIOS DE CULTIVO ESPECIFICOS POR DIFERENTES METODOS.

3.3 MATERIAL

3.3.1 MATERIAL DE USO CORRIENTE EN EL LABORATORIO.

3.3.2 ESTUFA REGULABLE A 37 1 C.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

3.4.1 CALDO NUTRITIVO:

EXTRACTO DE CARNE 5 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

CLORURO SODICO 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES CON UN LIGERO CALENTAMIENTO. AJUSTAR EL PH A 7,2 7,5. REPARTIR EL MEDIO EN LOS RECIPIENTES ADECUADOS. ESTERILIZAR A 121 C DURANTE 15 MINUTOS.

LA FORMULA INDICADA CORRESPONDE A LA CONCENTRACION NORMAL; SE PUEDE PREPARAR EL MEDIO A DOBLE CONCENTRACION.

3.4.2 CALDO SELENITO:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G

LACTOSA 4 G

FOSFATO DISODICO ($\text{PO}_4\text{HNA}_2\text{12H}_2\text{O}$) 10 G

SELENITO MONOSODICO (SEO_3HNA) 4 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS TRES PRIMEROS INGREDIENTES EN AGUA LLEVANDOLA HASTA EL PUNTO DE EBULLICION. DEJAR ENFRIAR Y AÑADIR EL SELENITO. AJUSTAR EL PH A 7,0.

REPARTIR EN TUBOS DE 20 200 MM A RAZON DE 20 ML POR TUBO O 100 ML EN MATRACES DE 500 ML DE CAPACIDAD. ESTERILIZAR AL BAÑO MARIA A UNA TEMPERATURA DE 80 5 C DURANTE UNA HORA Y MEDIA.

3.4.3 CALDO TETRATIONATO (MULLER-IUFFMAN).

MEDIO BASE:

EXTRACTO DE CARNE 5 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

CLORURO SODICO 3 G

CARBONATO CALCICO (CO_3CA) 45 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

AJUSTAR EL PH DE FORMA QUE DESPUES DE LA ESTERILIZACION SEA 7,0.

ESTERILIZAR QUINCE MINUTOS A 121 C.

SOLUCION DE TIOSULFATO SODICO:

TIOSULFATO SODICO ($\text{S}_2\text{O}_3\text{NA}_2$) 50 G

AGUA DESTILADA 100 ML

DISOLVER EL TIOSULFATO SODICO EN UN POCO DE AGUA. COMPLETAR EL VOLUMEN FINAL. ESTERILIZAR LA SOLUCION QUINCE MINUTOS A 121 C.

SOLUCION DE IODO:

IODO 20 G

IODURO POTASICO (IK) 25 G

AGUA DESTILADA 100 ML

DISOLVER EL IODURO POTASICO EN UN POCO DE AGUA Y AÑADIR EL IODO.

COMPLETAR EL VOLUMEN FINAL. CONSERVAR LA SOLUCION EN UN

RECIPIENTE OPACO Y BIEN CERRADO.

SOLUCION DE VERDE BRILLANTE:

VERDE BRILLANTE 0,5 G

AGUA DESTILADA 100 ML

AÑADIR EL VERDE BRILLANTE AL AGUA. MANTENER LA SOLUCION UN DIA EN OSCURIDAD PARA QUE SE PRODUZCA LA AUTOESTERILIZACION.

SOLUCION DE BILIS DE BUEY:

BILIS DE BUEY DESECADA 10 G

AGUA DESTILADA 100 G

DISOLVER LA BILIS EN AGUA POR EBULLICION. ESTERILIZAR QUINCE MINUTOS A 121 C.

MEDIO COMPLETO:

MEDIO BASE 900 ML

SOLUCION DE TIOSULFATO SODICO ($\text{S}_2\text{O}_3\text{NA}_2$) 100 ML

SOLUCION DE IODO 20 ML

SOLUCION DE VERDE BRILLANTE 2 ML

SOLUCION DE BILIS DE BUEY 50 ML

AÑADIR AL MEDIO BASE, ASEPTICAMENTE, LOS DEMAS INGREDIENTES EN EL ORDEN EXPUESTO. EL MEDIO COMPLETO SE DISTRIBUYE A RAZON DE 20 ML EN TUBOS ESTERILES DE 20 200 MM O 100 ML EN MATRACES ESTERILES DE 500 ML DE CAPACIDAD.

CONSERVADO A 4 2 C EN OSCURIDAD, PUEDE UTILIZARSE DURANTE LOS SIETE DIAS SIGUIENTES A SU PREPARACION.

3.4.4 AGAR VERDE BRILLANTE ROJO FENOL:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

EXTRACTO DE LEVADURA 3 G
LACTOSA 10 G
SACAROSA 10 G
CLORURO SODICO (C1NA) 5 G
ROJO FENOL 0 ,08 G
VERDE BRILLANTE 0 ,0125 G
AGAR 12 A 20 G
AGUA DESTILADA 1.000 ML
DISOLVER POR CALENTAMIENTO. AJUSTAR EL PH A 7. NO NECESITA AUTOCLAVE. DEJAR ENFRIAR HASTA 50 C Y REPARTIR EN PLACAS HASTA SOLIDIFICACION.

3.4.5 AGAR SALMONELLA-SHIGELLA:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G
EXTRACTO DE CARNE 5 G
LACTOSA 10 G
SALES BILIARES 6 G
CITRATO SODICO 8 ,5 G
CITRATO DE HIERRO AMONIAICAL 1 G
TIOSULFATO SODICO (S2O3NA2) 8 ,5 G
ROJO NEUTRO 0 ,025 G
VERDE BRILLANTE 0 ,00033 G
AGAR 12 G
AGUA DESTILADA 1.000 ML
DISOLVER POR CALOR LA PEPTONA Y EL EXTRACTO DE CARNE. AÑADIR LOS OTROS INGREDIENTES. LLEVAR A EBULLICION AGITANDO HASTA SU COMPLETA DISOLUCION. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. REPARTIR EN PLACAS.

3.4.6 AGAR BISMUTO-SULFITO:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G
EXTRACTO DE CARNE 5 G
GLUCOSA 5 G
FOSFATO DISODICO (PO4HNA2) 4 G
SULFATO FERROSO (SO4FE) 0 ,3 G
SULFITO DE BISMUTO (SO3)3BI2 8 G
VERDE BRILLANTE 0 ,016 G
AGAR 12 ,7 G
AGUA DESTILADA 1.000 ML
DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO Y LLEVAR A EBULLICION HASTA DISOLUCION COMPLETA.
DEJAR ENFRIAR A UNOS 50 C Y REPARTIR EN PLACAS.

3.4.7 MEDIO DE KLIGER:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G
EXTRACTO DE CARNE 3 G
EXTRACTO DE LEVADURA 3 G
CLORURO SODICO 5 G
LACTOSA 10 G
GLUCOSA 1 G
SULFATO FERROSO AMONIAICAL (SO4)2FE(NH4)26H2O 0 ,5 G
TIOFULFATO SODICO (S2O3NA2) 0 ,5 G
ROJO FENOL 0 ,025 G
AGAR 14 G
AGUA DESTILADA 1.000 ML
DISOLVER LOS COMPONENTES EN AGUA POR EBULLICION. AJUSTAR EL PH A 7,4.
REPARTIR EL MEDIO EN TUBOS DE 16 160 MM A RAZON DE 5 A 6 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS. DEJAR ENFRIAR LOS TUBOS EN POSICION INCLINADA HASTA LA SOLIDIFICACION.

3.4.8 AGAR COMUN:

EXTRACTO DE CARNE 3 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO. AJUSTAR EL PH A 7.

REPARTIR EL MEDIO EN TUBOS DE 16 160 MM A RAZON DE 5 A 6 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS. DEJAR

ENFRIAR LOS TUBOS EN POSICION INCLINADA, HASTA LA SOLIDIFICACION.

3.4.9 MEDIO DE FERGUSON-STUAR:

L-TRIPTOFANO 0 ,4 G

FOSFATO MONOPOTASICO (PO₄H₂K) 0 ,1 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄HK₂) 0 ,1 G

CLORURO SODICO 0 ,5 G

UREA 2 G

ETANOL DE 95 2 ML

ROJO FENOL AL 1 POR 100 0 ,25 ML

AGUA DESTILADA 100 ML

DESPUES DE DISOLUCION SE ESTERILIZA POR FILTRACION. SE CONSERVA EN TUBOS INDEFINIDAMENTE CUANDO SE MANTIENE CONGELADO. EN EL MOMENTO DE UTILIZAR, DESCONGELAR, AGITAR Y DISTRIBUIR EN TUBOS ESTERILES DE HEMOLISIS A RAZON DE 1 ML POR TUBO.

3.4.10 MEDIO PARA LA DESCARBOXILACION DE LA LISINA (TAYLOR):

EXTRACTO DE LEVADURA 3 G

GLUCOSA 1 G

SOLUCION DE BROMOCRESOL PURPURA:

1,6 G POR 100 ML DE ETANOL DE 96 1 ML

AGUA DESTILADA 1.000 ML

L-LISINA (MONOCLORHIDRATO) 5 G

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO. AJUSTAR EL PH A 6,8

DISTRIBUIR A RAZON DE 2 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR A VAPOR FLUENTE EN AUTOCLAVE DURANTE VEINTE MINUTOS.

3.4.11 MEDIO DE LOWE:

SOLUCION TAMPON:

FOSFATO DISODICO (PO₄HNA₂12H₂O) 2 ,012 G

FOSFATO MONOPOTASICO (PO₄H₂K) 0 ,143 G

AGUA DESTILADA 100 ML

SOLUCION DE ONPG:

O-NITROFENIL BETA D-GALACTOPIRANOSIDO 0 ,6 G

SOLUCION TAMPON 100 ML

ESTERILIZAR POR FILTRACION:

PREPARAR AGUA DE PEPTONA AL 1 POR 100 300 ML

MEDIO COMPLETO:

UNA PARTE DE SOLUCION DE ONPG.

TRES PARTES DE AGUA DE PEPTONA AL 1 POR 100.

REPARTIR EN TUBOS DE 16 160 MM Y CONGELAR. EN EL MOMENTO DE UTILIZAR, DESCONGELAR, AGITAR Y DISTRIBUIR EN TUBOS ESTERILES DE HEMOLISIS A RAZON DE 1 ML POR TUBO.

3.4.12 OTROS:

3.4.12.1 REACTIVO DE KOVAC-INDOL (COMO EN 2.4.9.1) (PARA EL ENSAYO DE INDOL).

3.4.12.2 REACTIVO DE TRIPTOFANO-DESAMINASA.

SOLUCION ACUOSA DE PERCLORURO DE HIERRO AL 10 POR 100.

3.4.12.3 REACTIVO DE KOVAC-OXIDASA.

(COMO EN 2.4.9.4).

3.4.12.4 ANTISUEROS ESPECIFICOS:

SUEROS ANTI O, MONOVALENTES Y POLIVALENTES.

SUEROS ANTI VI.3.5 PROCEDIMIENTO

3.5.1 PREENRIQUECIMIENTO.

SEMBRAR 100 ML DE LA MUESTRA DE AGUA EN 1.000 ML DE CALDO NUTRITIVO (3.4.

1) O EN 100 ML DE CALDO A DOBLE CONCENTRACION.

INCUBAR A 37 °C DURANTE DIECISEIS A VEINTE HORAS COMO MAXIMO.

3.5.2 ENRIQUECIMIENTO.

UTILIZAR SIMULTANEAMENTE CALDO SELENITO (3.4.2) Y CALDO TETRATIONATO (3.4.3).

SEMBRAR 2 ML A PARTIR DEL CALDO DE PREENRIQUECIMIENTO EN DOS TUBOS CON 20 ML DE LOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO, O BIEN, 10 ML DEL CALDO DE PREENRIQUECIMIENTO EN MATRACES CONTENIENDO 100 ML DE MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO.

INCUBAR A 37 °C, DURANTE CUARENTA Y OCHO HORAS.

3.5.3 AISLAMIENTO.

A LAS VEINTICUATRO Y CUARENTA Y OCHO HORAS DE INCUBACION DE LOS MEDIOS DE ENRIQUECIMIENTO, EFECTUAR SIEMBRAS CON ASA DE PLATINO SOBRE LA SUPERFICIE DE PLACAS DE <AGAR VERDE BRILLANTE ROJO FENOL> (3.4.4), <AGAR SALMONELLA SHIGELLA> (3.4.5) Y AGAR BISMUTO-SULFITO (3.4.6).

INCUBAR A 37 °C DURANTE VEINTICUATRO-CUARENTA Y OCHO HORAS.

EFECTUAR LA LECTURA DE PLACAS A LAS VEINTICUATRO Y CUARENTA Y OCHO HORAS.

SE CONSIDERAN COMO COLONIAS SOSPECHOSAS:

AGAR VERDE BRILLANTE ROJO FENOL: COLONIAS ROJAS CON HALO ROJO.

AGAR SALMONELLA SHIGELLA: COLONIAS INCOLORAS Y TRANSPARENTES CON CENTRO NEGRO.

AGAR BISMUTO-SULFITO: COLONIAS NEGRAS CON REFLEJO METALICO, NEGRAS, MARRON O VERDES.

DE CALDO SELENITO NO SE DEBERA SEMBRAR EN EL MEDIO DE AGAR BISMUTO-SULFITO.

3.5.4 IDENTIFICACION.

ELEGIR 5 O 6 COLONIAS SOSPECHOSAS DE CADA UNO DE LOS MEDIOS DE AISLAMIENTO Y SEMBRAR SOBRE SENDOS TUBOS CON MEDIO DE KLIGLER (3.4.7) EN PICADURA Y POR SUPERFICIE.

INCUBAR 24 HORAS A 37 °C Y EFECTUAR LA LECTURA.

A PARTIR DE LOS MEDIOS DE KLIGLER QUE DEN LACTOSA NEGATIVA (BISEL ROJO) Y GLUCOSA POSITIVA (FONDO AMARILLO), CON O SIN PRODUCCION DE GAS, CON O SIN PRODUCCION DE SULFIDRICO (COLOR NEGRO), SEMBRAR CON ASA DE PLATINO PARA REALIZAR LAS SIGUIENTES PRUEBAS:

3.5.4.1 SIEMBRA EN AGAR COMUN (3.4.8).

PARA LA INVESTIGACION DE LA CITOCROMO-OXIDASA Y REACCIONES SEROLOGICAS.

3.5.4.2 INVESTIGACION DE LA GALACTOSIDASA:

POR MEDIO DE DISCOS IMPREGNADOS DE ORTONITROFENIL BETA-D-GALACTO PIRANOSIDO (O.N.P.G.) O POR SIEMBRA EN EL MEDIO DE LOWE (3.4.11).

LA REACCION POSITIVA SE TRADUCE POR UNA COLORACION AMARILLA Y LA NEGATIVA POR AUSENCIA DE COLOR.

3.5.4.3 INVESTIGACION DE LA UREASA, TRIPTOFANO DESAMINASA E INDOL. SIEMBRA EN EL MEDIO DE FERGUSON-STUAR (3.4.9).

LA PRESENCIA DE UREASA SE MANIFIESTA POR LA APARICION DE UN COLOR PURPURA.

A CONTINUACION EL CULTIVO SE DISTRIBUYE EN DOS TUBOS. EN UNO DE ELLOS, LA PRODUCCION DE INDOL SE MANIFIESTA AÑADIENDO UNAS GOTAS DE REACTIVO DE KOVAC-INDOL (2.4.9.1); EN CASO POSITIVO APARECE UN ANILLO ROJO CEREZA.

EN EL OTRO, LA TRIPTOFANO DESAMINASA SE MANIFIESTA AÑADIENDO UNAS GOTAS DE REACTIVO DE T.D.A. (3.4.12.2). LA APARICION DE UN COLOR MARRON ROJIZO INDICA LA POSITIVIDAD DE ESTA PRUEBA.

3.5.4.4 INVESTIGACION DE LA DESCARBOXILACION DE LA LISINA.

SIEMBRA EN MEDIO DE TAYLOR (3.4.10).

AÑADIR, UNA VEZ EFECTUADA LA SIEMBRA, 1 ML DE ACEITE DE PARAFINA ESTERIL PARA OBTENER UNA ANAEROBIOSIS RELATIVA.

LA REACCION ES POSITIVA CUANDO EL MEDIO VIRA AL AMARILLO POR ACIDIFICACION Y SE PRODUCE UNA POSTERIOR ALCALINIZACION CON CAMBIO O REVIRAJE DEL INDICADOR A COLOR VIOLETA PURPURA.

LA LECTURA DE ESTAS PRUEBAS BIOQUIMICAS SE REALIZA DESPUES DE UN PERIODO DE INCUBACION DE 24 A 37 A 1 C.

3.6 INTERPRETACION DE RESULTADOS

REACCIONES BIOQUIMICAS DE SALMONELLA:

FERMENTACION DE LA GLUCOSA: POSITIVA, CON GAS, SALVO ALGUNAS EXCEPCIONES.

UTILIZACION DE LA LACTOSA: NEGATIVA.

PRODUCCION DE SULFURO DE HIDROGENO: POSITIVA, SALVO ALGUNA EXCEPCION.

REACCION DE UREASA: NEGATIVA.

REACCION DE INDOL: NEGATIVA.

REACCION DE TRIPTOFANO DESAMINASA: NEGATIVA.

REACCION DE BETA GALACTOSIDASA: NEGATIVA.

DESCARBOXILACION DE LA LISINA: POSITIVA.

REACCION DE LA CITOCROMO-OXIDASA: NEGATIVA.

3.7 IDENTIFICACION SEROLOGICA

DESECHAR AQUELLAS CEPAS AUTOGLUTINABLES POR NO SER POSIBLE SU SEROTIPADO.

REALIZAR A PARTIR DEL CULTIVO EN AGAR COMUN Y SOBRE PORTAS DESENGRASADOS, EMULSIONES HASTA OBTENER SUSPENSIONES TURBIAS Y HOMOGENEAS.

DETERMINAR LA AGLUTINACION FRENTE AL ANTISUERO O Y VI Y EN CASO DE POSITIVIDAD ENVIAR LA CEPA AISLADA A UN CENTRO DE REFERENCIA PARA SU CONFIRMACION.

4. ESTREPTOCOCOS FECALES

4.1 DEFINICION

SON AQUELLAS BACTERIAS COCACEAS GRAM POSITIVAS, AEROBIAS O ANAEROBIAS FACULTATIVAS, CATALASA NEGATIVAS, QUE FERMENTAN LA GLUCOSA CON PRODUCCION DE ACIDO A 37 C EN UN TIEMPO MAXIMO DE 48 HORAS.

EL CONJUNTO COMPRENDE LAS ESPECIES STREPTOCOCUS FAECALIS, S. FAECIUM, S.

DURANS, S. BOBIS Y S. EQUINUS, TODAS ELLAS COMPRENDIDAS EN EL GRUPO SEROLOGICO D DE LANCEFIELD.

4.2 METODO DE LOS TUBOS MULTIPLES (N.M.P. NUMERO MAS PROBABLE) ESTE METODO PODRA UTILIZARSE PARA CUALQUIER TIPO DE AGUA Y SERA EL PROCEDIMIENTO OFICIAL OBLIGATORIO EN CASOS DE LITIGIO.

4.2.1 FUNDAMENTO.

DETERMINACION DEL NUMERO DE ESTREPTOCOCOS MEDIANTE SIEMBRA DE DISTINTOS VOLUMENES DEL AGUA A ANALIZAR EN SERIES DE TUBOS CONTENIENDO MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO GLUCOSADO CON AGENTES INHIBIDORES SELECTIVOS E INCUBACION A TEMPERATURA ADECUADA. EL PROCEDIMIENTO COMPRENDE LAS PRUEBAS: PRESUNTIVA Y DE CONFIRMACION DE ESTREPTOCOCOS FECALES.

4.2.2 MATERIAL.

PIPETAS GRADUADAS EN ML Y DIVIDIDAS EN 10, ESTERILES.

ESTUFA REGULADA A 37 A 1 C.

4.2.3 MEDIOS DE CULTIVO.

4.2.3.1 PREPARACION DEL MEDIO GLUCOSA-FOSFATOS-AZIDA (ROTHER), SIMPLE:

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

GLUCOSA 5 G

CLORURO SODICO 5 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO 4 HK 2) 2,7 G

FOSFATO MONOPOTASICO (PO 4 H 2 K) 2,7 G

AZIDA SODICA 0,2 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO, AJUSTAR EL PH Y

REPARTIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

PARA LOS TUBOS DE LA SERIE QUE RECIBAN VOLUMENES DE AGUA DE 10 ML DEBERA PREPARARSE EL MEDIO A DOBLE CONCENTRACION DUPLICANDO LAS CANTIDADES DE LOS COMPONENTES EN EL MISMO VOLUMEN DE AGUA DESTILADA Y DISTRIBUYENDO A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

PARA LOS TUBOS O FRASCOS DE LA SERIE QUE TENGAN QUE RECIBIR VOLUMENES DE AGUA DE 50 ML SE UTILIZARA EL MISMO MEDIO CONCENTRADO, PERO DISTRIBUYENDO A RAZON DE 50 ML POR CADA UNO. ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE 15 MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 6,8-7.

4.2.3.2 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO GLUCOSA-FOSFATOS-AZIDA-ETILVIOLETA (LITSKY):

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

GLUCOSA 5 G

CLORURO SODICO 5 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO 4 HK 2) 2,7 G

FOSFATO MONOPOTASICO (PO 4 H 2 K) 2,7 G

AZIDA SODICA 0,2 G

SOLUCION ACUOSA DE ETIL-VIOLETA AL 0,01 POR 100 (P/V) 5 ML

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES, MENOS EL ETIL-VIOLETA, POR CALOR SUAVE, AJUSTAR EL PH, AÑADIR EL ETIL-VIOLETA Y DISTRIBUIR A RAZON DE 10 ML POR TUBO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE 15 MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBERA SER 6,8-7.

PARA AMBOS MEDIOS SE RECOMIENDA UTILIZAR TUBOS CON TAPON DE ROSCA PARA SU CIERRE HERMETICO. NO SE UTILIZARA ALGODON YA QUE DEBE EVITARSE LA EVAPORACION DEL MEDIO DURANTE EL ALMACENAMIENTO.

4.2.4 PROCEDIMIENTO.

4.2.4.1 PRUEBA PREVIA.

DISPONER EN UNA GRADILLA, UNA SERIE DE TUBOS CON MEDIO DE ROTHE, SEGUN LA TABLA DE N.M.P. QUE SE HAYA ELEGIDO.

MEDIANTE PIPETAS ESTERILES, SEMBRAR LOS TUBOS DE LA SERIE TOMANDO LOS VOLUMENES DEL AGUA, YA HOMOGENEIZADA, QUE SE INDICAN EN LA TABLA.

HOMOGENEIZAR LOS TUBOS SEMBRADOS.

INCUBAR A 37 °C DURANTE 48 HORAS.

SE CONSIDERAN TUBOS POSITIVOS AQUELLOS QUE PRESENTAN ENTURBIAMIENTO Y/O SEDIMENTO.

4.2.4.2 PRUEBA DE CONFIRMACION.

TODOS LOS TUBOS POSITIVOS DE LA PRUEBA PRESUNTIVA SE SOMETERAN A LA PRUEBA DE CONFIRMACION.

DE CADA TUBO POSITIVO PRESUNTIVO HOMOGENEIZAR SU CONTENIDO Y TRANSFERIR TRES ASAS AL TUBO CON MEDIO DE LITSKY. SI EL SEDIMENTO ES ESCASO O INSUFICIENTE, ES IMPRESCINDIBLE ELIMINAR PREVIAMENTE A LA HOMOGENEIZACION EL LIQUIDO SOBRENADANTE.

TAMBIEN PUEDE TOMARSE DIRECTAMENTE EL SEDIMENTO POR CAPILARIDAD, MEDIANTE PIPETA PASTEUR.

INCUBAR LOS TUBOS RESEMBRADOS A 37 °C.

SI A LAS 24 HORAS NO SE OBSERVA NI ENTURBIAMIENTO NI SEDIMENTO VIOLETA, PROLONGAR LA INCUBACION HASTA 48 HORAS.

4.2.4.3 LECTURA Y EXPRESION DE RESULTADOS.

SE CONSIDERARAN TUBOS POSITIVOS AQUELLOS QUE PRESENTEN ENTURBIAMIENTO Y/O SEDIMENTO DE COLOR VIOLETA.

SE CALCULARA POR TABULACION EL NUMERO MAS PROBABLE (N.M.P.) DE ESTREPTOCOCOS FECALIS REFERIDOS A 100 ML DE AGUA.

4.3 METODO DEL FILTRO DE MEMBRANA (METODO ALTERNATIVO) 4.3.1 FUNDAMENTO.

DETERMINACION DEL NUMERO DE ESTREPTOCOCOS FECALIS MEDIANTE FILTRACION DE VOLUMENES DETERMINADOS DEL AGUA A ANALIZAR POR FILTROS DE MEMBRANA E INCUBACION SOBRE MEDIO DE CULTIVO SELECTIVO A TEMPERATURA ADECUADA.

4.3.2 MATERIAL.

MEMBRANAS FILTRANTES DE ESTERES DE CELULOSA, DE 0,45 MICRAS DE POROSIDAD, DE 47 A 50 MM DE DIAMETRO, ESTERILES.

PINZAS FLAMEABLES DE ESTREMOS PLANOS.

EQUIPOS DE FILTRACION POR VACIO.

PLACAS DE PETRI DE DIAMETRO SUPERIOR AL DEL FILTRO DE MEMBRANA.

ESTUFA REGULADA A 37 °C.

4.3.3 MEDIO DE CULTIVO.

PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO AGAR-GLUCOSA-FOSFATO-AZIDA-TRIFENILTETRAZOLIO (SLANETZ):

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

EXTRACTO DE LEVADURA 5 G

GLUCOSA 2 G

FOSFATO DIPOTASICO (PO₄ HK 2) 4 G

AZIDA SODICA (N₃ NA) 0,4 G

2, 3, 5, TRIFENILTETRAZOLIO CLORURO (TTC) 0,1 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO HASTA PUNTO DE EBULLICION, DEJAR ENFRIAR A 50 °C APROXIMADAMENTE Y AJUSTAR EL PH A 7,2.

HOMOGENEIZAR Y REPARTIR EN PLACAS DE PETRI DEJANDO SOLIDIFICAR.

EL ESPESOR DEL MEDIO EN LAS PLACAS DEBE SER COMO MINIMO DE 5 MM.

LAS PLACAS ASI PREPARADAS PUEDEN CONSERVARSE A 4 °C DURANTE 3 A 4 SEMANAS.

4.3.4 PROCEDIMIENTO.

SEGUIR LA MISMA TECNICA DESCRITA EN (3.3.4.1.1) PARA COLIFORMES TOTALES E INCUBAR A 37 °C DURANTE 48 HORAS.

4.3.5 LECTURA E INTERPRETACION.

CONTAR LAS COLONIAS DESARROLLADAS QUE TENGAN COLOR ROJO LADRILLO, VIOLETA O ROSA.

LAS COLONIAS QUE NO PRESENTEN ESTA COLORACION NO SE TIENEN EN CUENTA POR NO CORRESPONDER A ESTREPTOCOCOS FECALES.

PUEDE ESTIMARSE QUE EL NUMERO DE ESTREPTOCOCOS FECALES PRESENTES EN 100 ML CORRESPONDE AL NUMERO DE COLONIAS DESARROLLADAS CON LAS CARACTERISTICAS DESCRITAS.

5. CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES

5.1 DEFINICION

SON AQUELLAS BACTERIAS DE MORFOLOGIA BACILAR, GRAM POSITIVAS, ANAEROBIAS ERICTAS, CAPACES DE FORMAR ESPORAS Y CON ACTIVIDAD SULFITO REDUCTORA.

5.2 FUNDAMENTO

SE BASE EN CONTAR EL NUMERO DE COLONIAS DE BACTERIAS ESPORULADAS Y CON CAPACIDAD SULFITO REDUCTORA, DESARROLLADAS EN MEDIO DE CULTIVO SOLIDO GLUCOSADO CONTENIENDO SULFITO SODICO Y UNA SAL DE HIERRO.

5.3 MATERIAL

5.3.1 MATERIAL DE USO CORRIENTE EN EL LABORATORIO.

5.3.2 ESTUFA REGULADA A 37 °C.

5.3.3 BAÑO TERMOREGULABLE A 80 °C.

5.3.4 MEDIO DE CULTIVO.

A) PREPARACION DEL MEDIO AGAR-GLUCOSA-SULFITO-HIERRO (WILSON BLAIR):

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

EXTRACTO DE CARNE 3 G

CLORURO SODICO 5 G

GLUCOSA 20 G

AGAR 30 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO HASTA EL PUNTO DE EBULLICION Y DISOLUCION TOTAL DEL AGAR, EVITANDO LA FORMACION DE ESPUMA.

AJUSTAR EL PH A 7,6.

REPARTIR A RAZON DE 20 ML POR TUBO DE CAPACIDAD MINIMA DE 50 ML.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE 15 MINUTOS.

B) SOLUCION ACUOSA DE SULFITO DE SODIO ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) AL 10 POR 100.

ESTERILIZAR AL BAÑO MARIA DURANTE 10 MINUTOS.

ESTA SOLUCION DEBE UTILIZARSE RECIENTEMENTE PREPARADA.

C) SOLUCION ACUOSA DE CITRATO DE HIERRO AMONICAL AL 5 POR 100. PREPARAR ASEPTICAMENTE, SIN ESTERILIZAR POR EL CALOR.

5.4 PROCEDIMIENTO

COLOCAR CINCO TUBOS DEL MEDIO DE CULTIVO BASE, EN BAÑO MARIA HASTA FUSION TOTAL DEL AGAR.

ATEMPERAR HASTA UNOS 70 °C Y AÑADIR:

SOLUCION DE CITRATO DE HIERRO AMONICAL 0,5 ML

SOLUCION DE SULFITO SODICO 1 ML

DESPUES DE LA ADICION DE LOS REACTIVOS, MEZCLAR SUAVEMENTE PARA EVITAR LA INCORPORACION DE AIRE EN EL MEDIO.

CON EL OBJETO DE DESTRUIR LAS FORMAS VEGETATIVAS, CALENTAR LA MUESTRA DE AGUA EN BAÑO TERMORREGULADO A 80 C, DURANTE 5 MINUTOS DEJANDO ENFRIAR A CONTINUACION HASTA 60 C APROXIMADAMENTE.

SEMBRAR CADA TUBO DE MEDIO PREPARADO COMO SE HA INDICADO CON 20 ML DE AGUA A 60 C.

MEZCLAR Y ENFRIAR RAPIDAMENTE.

INCUBAR A 37 °C DURANTE 48-72 HORAS.

5.5 LECTURA Y EXPRESION DE RESULTADOS

LAS COLONIAS DE CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTORES APARECERAN DE COLOR NEGRO DEBIDO A LA FORMACION DE SULFURO FERROSO POR REDUCCION DE SULFITO.

TRANSCURRIDAS CUARENTA Y OCHO HORAS, CONTAR EL NUMERO DE COLONIAS NEGRAS DESARROLLADAS EN LA TOTALIDAD DE LA COLUMNA DE AGAR, SIN TENER EN CUENTAS LAS PUNTIFORMES.

EL RESULTADO SE EXPRESARA COMO NUMERO DE ESPOROS DE CLOSTRIDIOS SULFITO REDUCTORES EN 100 ML.

CON OBJETO DE EVITAR LA DIFICULTAD DE RECUENTO QUE PUEDE PRODUCIRSE AL CONFLUIR LAS COLONIAS DESARROLLADAS, SE EFECTUARA UNA PRIMERA LECTURA A LAS VEINTICUATRO HORAS Y SI POR ESTE MOTIVO NO ES POSIBLE EL RECUENTO A LAS CUARENTA Y OCHO HORAS, SE DARA LA LECTURA DE LAS VEINTICUATRO HORAS COMO RESULTADO APROXIMADO.

6. PSEUDONOMAS AERUGINOSA

6.1 DEFINICION

SON AQUELLAS BACTERIAS DE MORFOLOGIA BACILAR, GRAM NEGATIVAS, AEROBIAS ERICTAS, OXIDASA POSITIVAS, MOVILES POR UN FLAGELO POLAR. PRODUCEN UN PIGMENTO FLUORESCENTE, SOLUBLE EN AGUA, LA PIOVERDINA, Y LA PIOCIANINA SOLUBLE EN AGUA Y CLOROFORMO. NO FORMAN ESPOROS NI CAPSULAS. SON CAPACES DE CRECER A 42 °C PERO NO A 4 °C.

6.2 METODO DE ENRIQUECIMIENTO EN CALDO LACTOSADO

6.2.1 FUNDAMENTO.

DETERMINACION DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE PSEUDONOMAS AERUGINOSA EN 100 ML DE AGUA PROBLEMA, UTILIZANDO UN MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO PREVIO A LOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACION.

6.2.2 MATERIAL.

ESTUFAS DE CULTIVO REGULADAS A 37 Y 42 °C.

MATERIAL DE USO CORRIENTE EN EL LABORATORIO.

LAMPARA DE LUZ ULTRAVIOLETA DE LONGITUD DE ONDA CORTA (APROXIMADAMENTE 254 NM).

6.2.3 MEDIOS DE CULTIVO.

6.2.3.1 MEDIO CALDO LACTOSADO CON MAGNESIO.

EXTRACTO DE CARNE 6 G

PEPTONA BACTERIOLOGICA 10 G

LACTOSA 10 G

SULFATO MAGNESICO (SO₄ Mg₇H₂O) 1 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO.

AJUSTAR EL PH A 6,8-7 Y REPARTIR EN FRASCOS A RAZON DE 100 ML CADA UNO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE QUINCE MINUTOS.

6.2.3.2 MEDIO AGAR CENTRIMIDA.

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

CLORURO MAGNESICO (CL 2 Mg) 1,4 G

SULFATO POTASICO (SO₄ K₂) 10 G

BROMURO N-ACETIL N.N.N. TRIMETILAMONIO 0,5 G

AGAR 14 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO.

AÑADIR 10 ML DE GLICEROL, LLEVAR A EBULLICION.

AJUSTAR EL PH A 7 Y REPARTIR EN TUBOS DE ENSAYO A RAZON DE 15-20 ML.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE QUINCE MINUTOS.

6.2.3.3 MEDIO AGAR NUTRITIVO.

PEPTONA BACTERIOLOGICA 5 G

EXTRACTO DE CARNE 3 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO HASTA PUNTO DE EBULLICION Y DISOLUCION TOTAL DEL AGAR, EVITANDO LA FORMACION DE ESPUMA.

AJUSTAR EL PH Y REPARTIR A RAZON DE 15 A 20 ML EN TUBOS DE ENSAYO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 C DURANTE 15 MINUTOS.

EL PH FINAL DEL MEDIO DEBE SER 6,9-7,1.

6.2.3.4 MEDIO SOLIDO KING A.

PEPTONA BACTERIOLOGICA 20 G

GLICEROL 10 G

SULFATO POTASICO ANHIDRO (SO 4 K 2) 10 G

CLORURO MAGNESICO ANHIDRO (CL 2 MG) 0,1,4 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS COMPONENTES POR CALENTAMIENTO.

AJUSTAR EL PH A 7,2 Y REPARTIR A RAZON DE 10 ML EN TUBOS DE ENSAYO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE DURANTE 15 MINUTOS A 121 C.

INCLINAR LOS TUBOS.

6.2.3.5 AGUA DE TRIPTONA.

TRIPTONA 10 G

CLORURO SODICO 5 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER.

AJUSTAR EL PH A 7,5.

DISTRIBUIR A RAZON DE 6 ML EN TUBOS DE ENSAYO.

ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE DURANTE 15 MINUTOS A 121 C.

6.2.4 REACTIVO.

6.2.4.1 REACTIVO DE CITOCROMO-OXIDASA (KOVAC).

SOLUCION ACUOSA AL 1% DE CLORHIDRATO DE

TETRAMETILPARAFENILENDIAMINA.

EL REACTIVO KOVAC-OXIDASA ES INCOLORO Y DEBE CONSERVARSE EN

FRASCO DE COLOR TOPACIO OSCURO, CERRADO CON TAPON DE VIDRIO

ESMERILADO Y GUARDADO EN NEVERA.

A PESAR DE TOMAR ESTAS PRECAUCIONES EL TIEMPO MAXIMO DE DURACION ES DE DOS SEMANAS.

6.2.5 PROCEDIMIENTO.

SEMBRAR 100 ML DEL AGUA PROBLEMA EN UN FRASCO QUE CONTENGA 100 ML DEL CALDO LACTOSA CON MAGNESIO. INCUBAR A 37 °C DURANTE 48-72 HORAS.

A CONTINUACION SEMBRAR SIMULTANEAMENTE LOS DOS MEDIOS SOLIDOS SIGUIENTES.

6.2.5.1 SIEMBRA EN AGAR CETRIMIDA.

DEPOSITAR 0,1 ML DEL CULTIVO EN CALDO LACTOSADO EN PLACA DE PETRI

CONTENIENDO AGAR CETRIMIDA Y SEMBRAR EN SUPERFICIE UTILIZANDO ASA DE DRIGALSKI PREVIAMENTE ESTERILIZADA. SI EL CULTIVO EN CALDO LACTOSADO PRESENTA UN GRAN CRECIMIENTO BACTERIANO, PREPARAR UNA SERIE DE DILUCIONES PROCEDIENDO A LA SIEMBRA COMO SE HA INDICADO.

INCUBAR A 42 °C DURANTE 24-72 HORAS.

CON LAS COLONIAS APARECIDAS EN ESTE MEDIO PROCEDER A UNA IDENTIFICACION FINAL LLEVANDO A CABO LAS SIGUIENTES PRUEBAS:

6.2.5.1.1 REACCION DE LA OXIDASA.

MEDIANTE ASA O HILO DE PLATINO O PIPETA PASTEUR (NO UTILIZAR MATERIAL QUE CONTenga HIERRO), DEPOSITAR UNA PARTE DE UNA COLONIA SOBRE UN TROZO DE PAPEL DE FILTRO POROSO IMPREGNADO CON 2 O 3 GOTAS DE REACTIVO DE KOVAC-OXIDASA (6.2.4.1).

LA PRESENCIA DE OXIDASA SE MANIFIESTA POR LA APARICION INMEDIATA (ENTRE 5-10 SEGUNDOS) DE UNA COLORACION VIOLETA O PARDO VIOLETA. AL PRINCIPIO LA COLORACION ES ROSA-ROJO OSCURA Y LUEGO, A LOS 60 SEGUNDOS, APROXIMADAMENTE, SE VUELVE NEGRA.

TODA REACCION TARDIA DEBE TOMARSE COMO NEGATIVA.

LA AUSENCIA DE COLORACION INDICA REACCION NEGATIVA (OXIDASA NEGATIVA).

6.2.5.1.2 COMPROBACION DEL PIGMENTO PIOCIANINA.

SEMBRAR EN ESTRIAS SOBRE EL MEDIO KING A. INCUBAR A 42 °C DURANTE 48-72 HORAS.

EN DICHO MEDIO SE EXALTA LA PRODUCCION DE PIOCIANINA.

6.2.5.2 SIEMBRA EN AGAR NUTRITIVO.

DEPOSITAR 0,1 ML DEL CULTIVO EN CALDO LACTOSADO EN PLACA DE PETRI CONTENIENDO AGAR NUTRITIVO Y SEMBRAR EN SUPERFICIE UTILIZANDO ASA DE DRIGALSKI PREVIAMENTE ESTERILIZADA.

SI EL CULTIVO EN CALDO LACTOSADO PRESENTA UN GRAN CRECIMIENTO BACTERIANO, PREPARAR UNA SERIE DE DILUCIONES PROCEDIENDO A LA SIEMBRA COMO SE HA INDICADO.

INCUBAR A 42 °C DURANTE 24-72 HORAS.

PROCEDER A LA IDENTIFICACION DE LAS COLONIAS LLEVANDO A CABO LAS SIGUIENTES PRUEBAS:

6.2.5.2.1 MORFOLOGIA Y TINCION.

A PARTIR DE UNA COLONIA HACER UN FROTIS SOBRE PORTAOBJETOS, TEÑIR POR EL METODO DE GRAM Y OBSERVAR AL MICROSCOPIO CON OBJETIVO DE INMERSION.

6.2.5.2.2 REACCION DE LA OXIDASA.

COMO EN 6.2.5.1.1.

6.2.5.2.3 COMPROBACION DEL PIGMENTO PIOCIANINA.

COMO EN 6.2.5.1.2.

6.2.5.2.4 COMPROBACION DEL PIGMENTO PIOVERDINA.

COLOCAR LAS PLACAS CON LAS COLONIAS APARECIDAS SOBRE AGAR NUTRITIVO BAJO LA LUZ ULTRAVIOLETA PARA OBSERVAR LA FLUORESCENCIA DE LA PIOVERDINA.

6.2.6 LECTURA E IDENTIFICACION.

6.2.6.1 SIEMBRA EN AGAR CETRIMIDA.

6.2.6.1.1 REACCION DE LA OXIDASA.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ES CITOCROMO-OXIDASA POSITIVA.

6.2.6.1.2 COMPROBACION DEL PIGMENTO PIOCIANINA.

LA PIOCIANINA ES SOLUBLE EN AGUA Y CLOROFORMO. PARA COMPROBAR ESTA CARACTERISTICA SE SIEMBRA LA CEPA EN UN TUBO CONTENIENDO AGUA DE TRIPTONA Y SE INCUBA A 42 °C DURANTE 24-48 HORAS, HASTA LA

APARICION DE UNA COLORACION AZUL-VERDOSA. AÑADIR 2 ML DE CLOROFORMO Y AGITAR PARA EXTRAER LA PIOCININA. LA CAPA CLOROFORMICA SUBYACENTE A LA CAPA ACUOSA, SE TIÑE DE AZUL.

LA PRODUCCION DE PIOCININA CONFIRMA LA PRESENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA.

6.2.6.2 SIEMBRA EN AGAR NUTRITIVO.

6.2.6.2.1 MORFOLOGIA Y TINCION.

SE DEBEN OBSERVAR UNOS BACILOS FINOS GRAM NEGATIVOS DE UNOS 0,3X3 MICROMETROS, SIN CAPSULAS NI ESPOROS.

6.2.6.2.2 REACCION DE LA OXIDASA.

COMO EN 6.2.6.1.1.

6.2.6.2.3 COMPROBACION DEL PIGMENTO PIOCININA.

COMO EN 6.2.6.1.2.6.3 METODO DEL FILTRO DE MEMBRANA (METODO ALTERNATIVO) 6.3.1 FUNDAMENTO.

INVESTIGACION DE LA PRESENCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA MEDIANTE FILTRACION DE VOLUMENES DETERMINADOS DE AGUA A ANALIZAR POR FILTROS DE MEMBRANA E INCUBACION SOBRE MEDIOS DE CULTIVO SELECTIVOS A TEMPERATURAS SELECTIVAS.

6.3.2 MATERIAL.

MEMBRANAS FILTRANTES DE ESTERES DE CELULOSA DE 0,45 MICROMETROS DE POROSIDAD, DE 47 A 50 MM DE DIAMETRO, ESTERILES.

PINZAS FLAMEABLES DE EXTREMOS PLANOS.

EQUIPO DE FILTRACION POR VACIO.

PLACAS DE PETRI DE DIAMETRO SUPERIOR AL DEL FILTRO DE MEMBRANA.

ESTUFA DE CULTIVO REGULADA A 42 °C.

MATERIAL DE USO CORRIENTE EN EL LABORATORIO.

6.3.3 MEDIOS DE CULTIVO.

6.3.3.1 MEDIO AGAR CETRIMIDA.

COMO EN 6.2.3.2.

6.3.3.2 MEDIO DE CULTIVO: M P A-C DE BRODSKY Y CIEBIN.

L-LISINA 5 G

CLORURO SODICO 5 G

EXTRACTO DE LEVADURA 2 G

TIOSULFATO SODICO (S₂O₃Na₂·5H₂O) 5 G

XILOSA 1,2 G

SACAROSA 1,2 G

LACTOSA 1,2 G

ROJO DE FENOL 0,08 G

SULFATO MAGNESICO (SO₄Mg·7H₂O) 1,5 G

CITRATO FERRICO AMONICO 0,8 G

AGAR 15 G

AGUA DESTILADA 1.000 ML

DISOLVER LOS PRODUCTOS POR CALENTAMIENTO HASTA EBULLICION, AJUSTAR EL PH A 7,4 Y ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE A 121 °C DURANTE 10 MINUTOS O POR EBULLICION.

ENFRIAR EL MEDIO A 55 °C E INCORPORARLE INAMICINA, 8 MG; ACIDO NALIDIXICO, 37 MG. DISTRIBUIR EN PLACAS DE PETRI.

LOS ANTIBIOTICOS EN SOLUCION PUEDEN CONSERVARSE CONGELADOS HASTA SU EMPLEO. EL MEDIO ESTERIL, DISTRIBUIDO EN LAS PLACAS, SE PUEDE CONSERVAR EN FRIGORIFICO A 6-8 °C DE CUATRO A OCHO SEMANAS, SI SE EVITA SU DESECACION.

6.3.3.3 MEDIO SOLIDO KING A.

COMO EN 6.2.3.4.

6.3.3.4 AGUA DE TRIPTONA.

COMO EN 6.2.3.5.

6.3.4 REACTIVO.

6.3.4.1 REACTIVO DE CITOCROMO-OXIDASA (KOVAC).

COMO EN 6.2.4.1.

6.3.5 PROCEDIMIENTO.

LOS ELEMENTOS DEL SISTEMA DE FILTRACION QUE VAYAN A ENTRAR EN CONTACTO CON EL AGUA A ANALIZAR DEBEN ESTAR ESTERILES.

COLOCAR UN FILTRO DE MEMBRANA ESTERIL SOBRE EL SOPORTE DE FILTRACION, UTILIZANDO PINZAS ESTERILES.

ADAPTAR EL EMBUDO.

FILTRAR 100 ML DE LA MUESTRA DE AGUA PREVIAMENTE HOMOGENEIZADA, EFECTUANDO EL VACIO NECESARIO.

LAVAR CON UNOS 30 ML DE AGUA DE DILUCION ESTERIL.

RETIRAR EL EMBUDO.

MEDIANTE LAS PINZAS ESTERILIZADAS TRANSFERIR LA MEMBRANA FILTRANTE SOBRE EL MEDIO DE CULTIVO AGAR CETRIMIDA O MPA-C CONTENIDO EN UNA PLACA DE PETRI DE MODO QUE LA SUPERFICIE DE FILTRACION QUEDE HACIA ARRIBA.

CERRAR E INVERTIR LA PLACA E INCUBAR A 42 °C DURANTE 24-28 HORAS.

6.3.6 LECTURA.

LA LECTURA DE LOS RESULTADOS REQUIERE EL EXAMEN DE LAS COLONIAS APARECIDAS

SOBRE LA MEMBRANA.

EN EL MEDIO AGAR-CETRIMIDA LAS COLONIAS SON DE 1-2 MM, REDONDAS, SUPERFICIE LISA, BRILLANTE, COLOR BLANCO CREMOSO Y ASPECTO MUCOSO. POR INCUBACION PROLONGADA LAS COLONIAS TOMAN UNA COLORACION OSCURA CON BORDES CLAROS. DEBIDO A LA DIFUSION DE PIGMENTO, EL MEDIO O LA MEMBRANA, ADQUIEREN UN TONO VERDOSO. LAS COLONIAS APARECIDAS SOBRE LA MEMBRANA UTILIZANDO COMO SOPORTE EL MEDIO MPA-C SON DE 0,8-2,2 MM DE DIAMETRO, PLANAS CON BORDES TRANSPARENTES Y LOS CENTROS PARDUZCO A VERDE OSCURO. ES CARACTERISTICO EL VIRAJE A PURPURA DEL MEDIO EN CONTACTO CON LA COLONIA.

6.3.6.1 MORFOLOGIA Y TINCION.

COMO EN 6.2.5.2.1.

6.3.6.2 REACCION DE LA OXIDASA.

COMO EN 6.2.5.1.1.

6.3.6.3 MOVILIDAD.

SEMBRAR PARTE DE LA COLONIA A ESTUDIAR, EN UN TUBO QUE CONTENGA AGUA DE TRIPTONA E INCUBAR A 37 °C DURANTE 24-28 HORAS.

COMPROBAR LA MOVILIDAD MEDIANTE OBSERVACION AL MICROSCOPIO UTILIZANDO LA TECNICA DE LA GOTA PENDIENTE.

6.3.6.4 COMPROBACION DE PIGMENTOS.

SEMBRAR EN ESTRIAS SOBRE EL MEDIO KING A.

INCUBAR A 42 °C DURANTE 48-72 HORAS.

EN ESTE MEDIO SE EXALTA LA SINTESIS DE LA PROCIANINA.

6.3.7 INTERPRETACION.

6.3.7.1 MORFOLOGIA Y TINCION.

SE DEBEN OBSERVAR UNOS BACILOS GRAM NEGATIVOS FINOS DE UNOS 0,3X3 MICROMETROS, SIN CAPSULAS NI ESPOROS.

6.3.7.2 REACCION DE LA OXIDASA.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ES CITOCROMO-OXIDASA POSITIVA.

6.3.7.3 MOVILIDAD.

PSEUDOMONAS AERUGINOSA ES UN BACILO MOVIL.

6.3.7.4 COMPROBACION DE PIGMENTOS. COMO EN 6.2.6.1.2.