

# MANUAL DE TÈCNIQUES D'ANÀLISIS MICROBIOLÒGIQUES DE LES AIGÜES

Curs pràctic d'Anàlisis Químiques i Microbiològiques  
de les Aigües

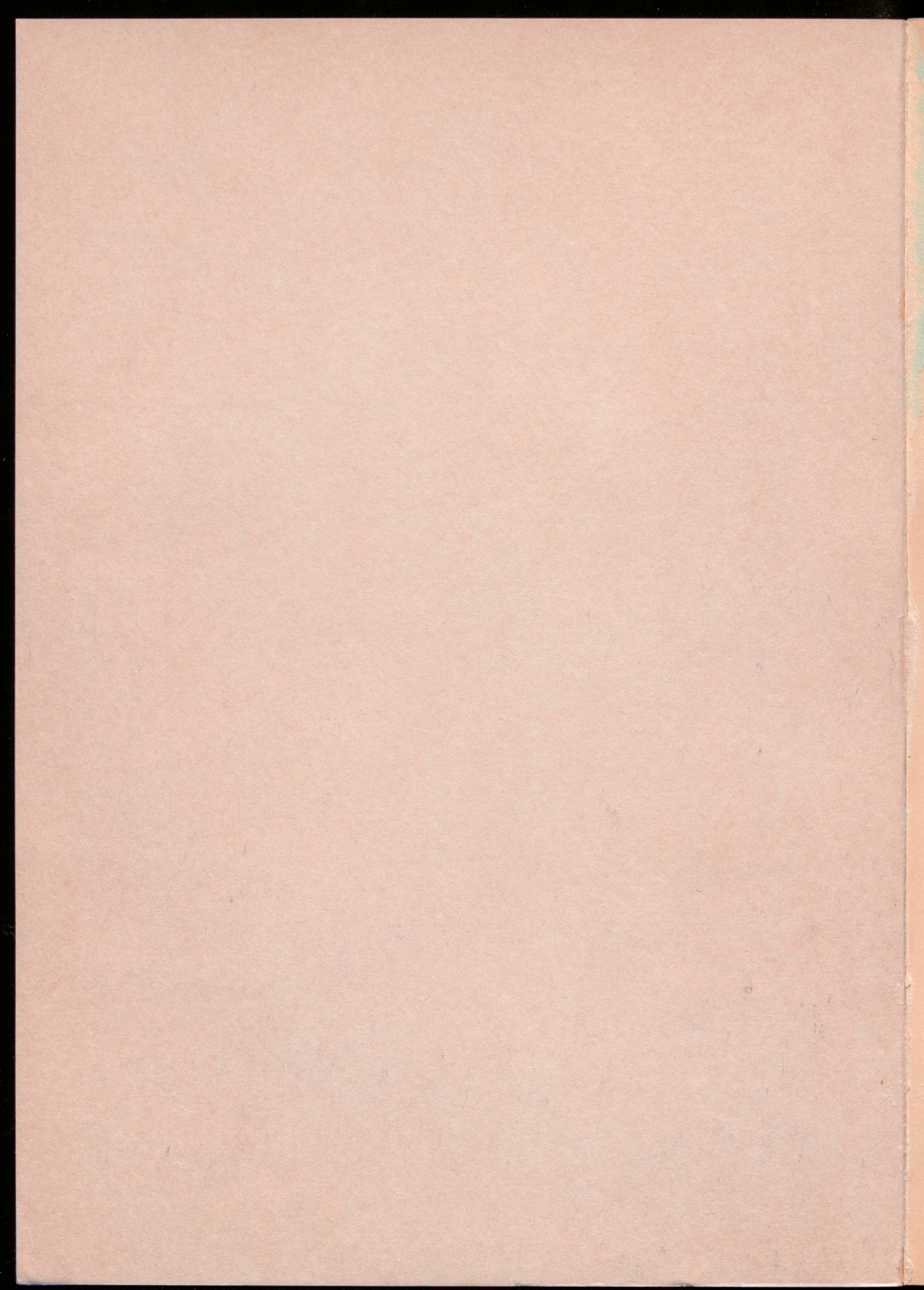


SECCIÓ D'ESTUDIANTS  
DE LA SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA

Barcelona, 13 al 21 d'octubre de 1988

862





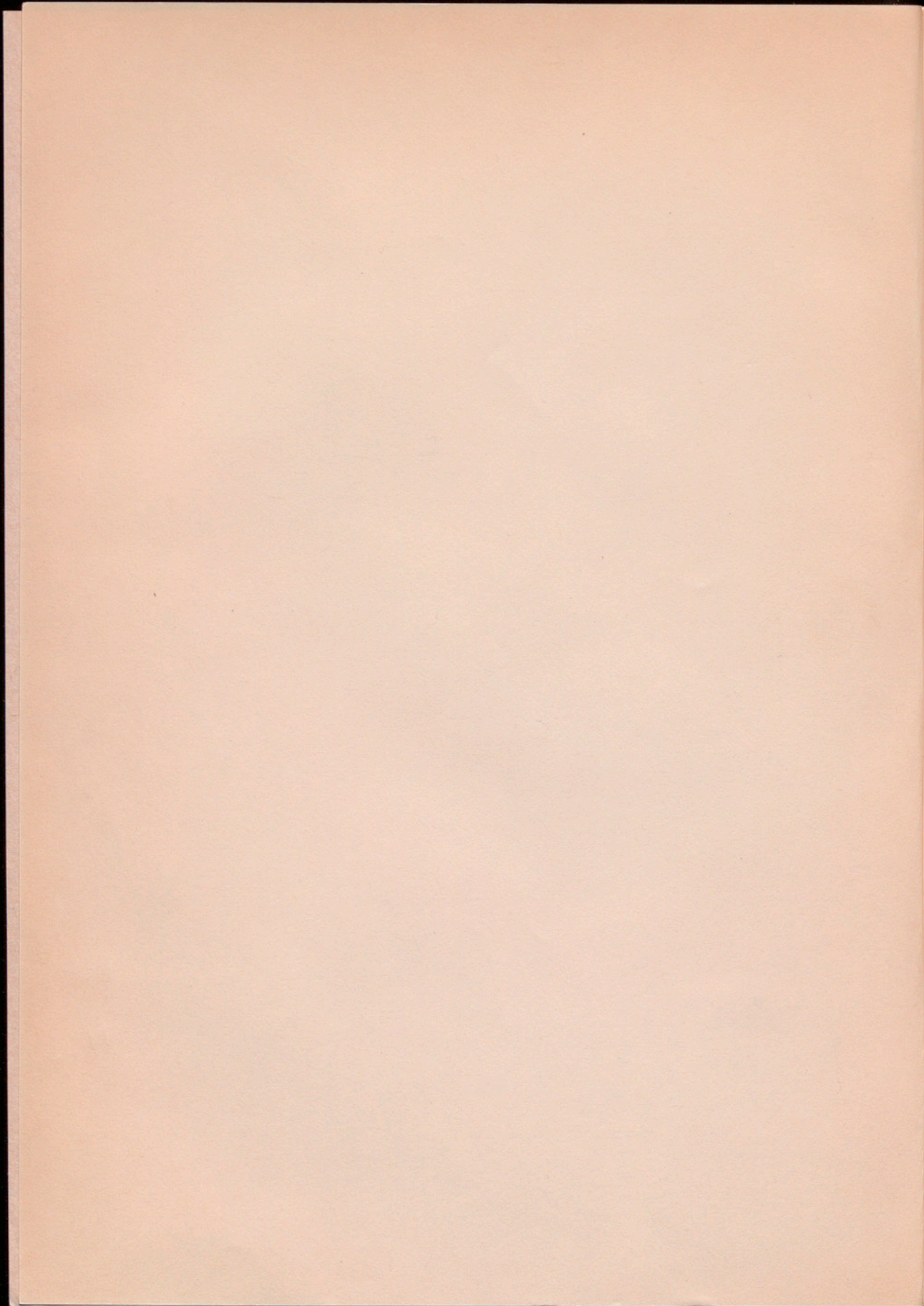


MANUAL DE TÉCNICAS D'ANÁLISE MICROSCÓPICAS

DE LUIS VARELA

Text: JOAN F. GUSCH







"MANUAL DE TÉCNICAS D'ANÀLISIS MICROBIOLÒGQUES

DE LES AIGÜES"

Text: JOAN F. GUASCH



MANUAL DE TÉCNICAS D'ANÁLISE MICROSCÓPICAS

DE LEE WILSON

1974 - 1975 - 1976



## "Curs Pràctic d'Anàlisis Químiques i Microbiològiques de les Aigües"

El present manual serveix per recollir les tècniques  
Barcelona del 13 al 21 d'octubre de 1988

Relació de tècniques realitzades durant l'esmentat curs

"Anàlisis químiques i microbiològiques de les aigües", amb  
pretendre Coordinador: Joan F. Guasch

Realitzat als laboratoris dels dept. d'Ecologia  
i de Microbiologia de la Fac. de Biologia (U.B.)

Per a facilitar l'ús d'aquest manual hem pogut observar  
Organitza: Secció d'estudiants de la S.C.B.

aquest manual una introducció, on es resumeix l'utilitat de  
la tècnica així com els seus objectius, una descripció dels  
diferents materials i eina a utilitzar, un protocol de la  
prova, una discussió on s'explica com interpretar els  
resultats obtinguts, fent també referència a les ventatges i  
desavantatges de la tècnica expressada.

Voldríem agrair a tots aquells que han col·laborat de  
forma directa o indirecta en l'elaboració d'aquest curs.

Col·lecció: " Manuals de Tècniques de Laboratori" Vol. 2

de la Facultat de Biologia, i el departament de Microbiologia  
i Parasitologia Sanitària, Facultat de Farmàcia, Universitat



"Cours Pratique d'analyse chimique : microchimie des sels"

1908

Barcelone del 17 al 21 d'octubre de 1908

Relació de les classes pràctiques durant l'any escolar 1908

Coordenador: Joan F. Gual

Realitzat als laboratoris dels departaments d'Història i Geografia i de Microquímica de la Fac. de Ciències de Barcelona

Gràfiques: Hecchi d'estudiants de la U.C.B.

Col·lecció "Manuals de tècniques de laboratori" Vol. I



## PRESENTACIÓ

El present manual pretén ser un recull de les tècniques més empleades en l'anàlisi de les aigües. L'elaboració d'aquest recull de tècniques s'ha encaminat essencialment a la seva utilització com a guió en les pràctiques del curs "Anàlisis químiques i microbiològiques de les aigües", sense pretendre ser un compendi de totes les metodologies empleades en els esmentats anàlisis, sinó un resum de les tècniques més usuals.

Per a facilitar l'ús d'aquest manual hom pot observar que les diferents tècniques descrites s'han estructurat de la següent forma: una introducció, on es resumeix l'aplicació de la tècnica així com els seus objectius, una descripció dels diferents materials i medis a utilitzar, un protocol de la prova, una discussió on s'explica com interpretar els resultats obtinguts, fent també referència a les ventatges i desventatges de la tècnica empleada.

Voldriem agrair a tots aquells que han col·laborat, de forma directa o indirecte, en l'elaboració d'aquest curs, especialment als departaments de Microbiologia i d'Ecologia de la Facultat de Biologia, i al departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitària, Facultat de Farmàcia, Universitat



## PRESENTATION

Le présent ouvrage a été écrit en vue de servir de guide aux étudiants et aux chercheurs en biologie, en particulier en zoologie. Il est divisé en deux parties principales : la première traite des aspects généraux de la biologie, et la seconde des aspects particuliers de la zoologie. Les chapitres sont écrits par des experts du domaine, et les illustrations sont de haute qualité. L'ouvrage est destiné à être utilisé comme manuel de référence pour les étudiants et les chercheurs.

Par la présente, nous souhaitons exprimer nos vives remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de cet ouvrage. Nous sommes particulièrement reconnaissants à nos collègues et amis pour leur soutien et leur collaboration. Nous espérons que cet ouvrage sera utile et agréable à lire.

Volontiers acceptons à titre de remerciement les contributions de nos collègues et amis. Nous sommes particulièrement reconnaissants à nos collègues et amis pour leur soutien et leur collaboration. Nous espérons que cet ouvrage sera utile et agréable à lire.



de Barcelona, els quals han posat a la nostre disposició tot allò que ens era necessari per a la preparació i realització del curs.

Agraïm també al Dr. F. Lucena (Dept. de Microbiologia, Fac. Biologia), Josep Anton Morqui (Dept. d'Ecologia, Fac. Biologia) i Glòria Palobart (Dept. de Microbiologia i Parasitologia Sanitària, Fac. Farmàcia), pel seu ajud en la preparació del curs. Així com pel aport del material necessari per a l'elaboració d'aquest manual.

Finalment cal esmentar que aquest curs no hauria estat possible sense el suport institucional i econòmic de la Societat Catalana de Biologia (filial de l'E.C.).

|                                          |                            |
|------------------------------------------|----------------------------|
| • Els bacteris (Extracel·lulars)         | 25                         |
| • Mètode del NMP                         | 26                         |
| • Mètode de filtració per                | Joan F. Guasch Sanromà     |
| • Clostridius perfringens                | 30                         |
| • Salmonella i Shigella                  | Barcelona, octubre de 1988 |
| • Bacillus cereus                        | 38                         |
| • Aeromonas                              | 41                         |
| • Vibrio                                 | 44                         |
| • Mètode del recónte en placa            | 47                         |
| • Mètode del NMP                         | 48                         |
| • Referències d'alguns mètodes de cultiu |                            |
| • Deshidratació comercialitzada          | 50                         |
| • Bifidobàctia                           | 52                         |



de Barcelona, els quals han posat a la nostra disposició tot  
allò que ens era necessari per a la preparació i realització  
del curs.

Després d'una breu introducció de l' Sr. J. Lucas (Dept. de Història),  
Fac. Biologia, Josep Anton (Dept. d'Ecologia, Fac.  
Biologia), i Gloria Palomar (Dept. de Microbiologia i  
Parasitologia Universitària, Fac. Farmàcia), pel seu treball en la  
organització del curs, així com del suport del material  
necessari per a l'elaboració d'aquest manual.

Finalment cal remarcar que aquest curs no hauria estat  
possible sense el suport institucional i econòmic de la  
Societat Catalana de Biologia (SCB) i de l'E.C.T.

Joan F. Gual i Sanjaume

Barcelona, octubre de 1986



## INDEX

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| - Introducció                          | 4  |
| - Obtenció de mostres                  | 7  |
| - Tècniques de sembra                  | 9  |
| - Anàlisis d'enumeracions totals       | 11 |
| - Fons i Llevats                       | 14 |
| - Coliforms (Colimetria)               | 17 |
| - Mètode del NMP                       | 17 |
| - Mètode de filtració per membrana     | 21 |
| - Estreptococs (Estreptometria)        | 25 |
| - Mètode del NMP                       | 26 |
| - Mètode de filtració per membrana     | 27 |
| - Clostridium perfringens              | 30 |
| - Salmonella i Shigella                | 33 |
| - Staphylococcus                       | 38 |
| - Aeromonas                            | 41 |
| - Vibrio                               | 44 |
| - Mètode del recompte en placa         | 47 |
| - Mètode del NMP                       | 48 |
| - Referències d'alguns medis de cultiu |    |
| deshidratats comercialitzats           | 50 |
| - Bibliografia                         | 52 |



# INDEX

|    |                                             |
|----|---------------------------------------------|
| 4  | - Introducción                              |
| 7  | - Obtención de muestras                     |
| 9  | - Técnicas de análisis                      |
| 11 | - Análisis de enumeraciones totales         |
| 14 | - Puntos de referencia                      |
| 17 | - Cálculos (Cálculos)                       |
| 17 | - Método del NRP                            |
| 21 | - Método de filtrado por membrana           |
| 22 | - Espectroscopia (Espectroscopia)           |
| 24 | - Método del NRP                            |
| 27 | - Método de filtrado por membrana           |
| 29 | - Cloración por oxidación                   |
| 32 | - Salicilato y Sulfato                      |
| 34 | - Espectroscopia                            |
| 41 | - Referencias                               |
| 44 | - Vocabulario                               |
| 47 | - Método del recuento en placa              |
| 48 | - Método del NRP                            |
|    | - Referencias de algunos métodos de cultivo |
| 50 | - Descripción de métodos comerciales        |
| 52 | - Bibliografía                              |



## INTRODUCCIO

L'aigua és una substància fonamental pels éssers vius, incrementant la seva importància a mida que augmenta la població i millora el nivell de vida. Tant mateix, l'aigua també és un vehicle a considerar en la transmissió d'infermetats. Ja al segle passat es va associar per primer cop les epidèmies de salmonelosis i de colera amb la contaminació fecal de l'aigua, posteriorment s'ha comprovat que l'aigua contaminada pot ésser el medi de propagació de nombroses malalties.

A finals del segle XIX s'identifiquen els agents patògens causants d'infeccions associades a l'aigua comprovant que eren microorganismes excretats amb les femtes d'individus infectats. A partir d'aquí s'inicia la recerca d'indicadors fecals per tal d'evaluar el risc sanitari de l'ús de l'aigua. Dins d'aquests indicadors trobem els grups dels coliforms totals, coliforms fecals, estreptococs fecals, *Clostridium perfringens*, *Bifidobacterium* sp i fags de *Bacteroides*, aproximant-se tots ells a les següents característiques:

- Estan presents només a les femtes d'animals homeotèrmics, i en concentracions superiors als patògens en animals infectats.







- Existència de correlació entre l'indicador i el patògen.
- En el medi aquàtic existeix una evolució paral·lela entre indicador i patògen.
- Són no patògens i de fàcil quantificació.
- La seva detecció es pot realitzar amb l'ajud de tests específics per cada indicador concret.

De totes formes, l'ús exclusiu d'indicadors fecals ens pot induir a errors de subestimació del risc sanitari de les aigües, donada la presència de certs microorganismes patògens oportunistes amb capacitat de multiplicació en ambients aquàtics i d'origen no exclusivament fecal, en canvi poden resultar freqüents en aigües residuals domèstiques, de forma que s'ha revelat com a sumament útil per l'evaluació, directe o indirecte, dels risc sanitari de l'aigua, l'ús dels "patògens indicadors", definits com a patògens oportunistes, relacionats amb ambients aquàtics enriquits per matèria vegetal o per vessaments rics en nutrients i associats normalment a vessaments d'aigües residuals (Hoadley i Dutka, 1977).

Actualment s'accepta l'anàlisi dels coliforms fecals com al millor indicador de la qualitat de l'aigua respecte al risc d'infecció, ja sigui per ingestió o contacte. No obstant, és sumament eficaç complementar el seu anàlisi amb l'estudi d'altres microorganismes també d'origen fecal, com poden ser els estreptococs fecals, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* i enterovirus.







A part de les osmentades infeccions bacterianes, cal esmentar la importància de l'aigua com a vector de transmissió de nombroses malalties de transmissió hídrica ocasionades per paràsits (protozois) i virus (Hepatitis, Rotavirus, ...).







## OBTENCIÓ DE LES MOSTRES

Per assegurar el valor significatiu de les mostres ens caldrà prendre una sèrie de precaucions a l'hora de la seva recollida i transport.

Les mostres d'aigua es recolliran en un recipient de vidre prèviament esterilitzat, recomanant especialment els de boca ample. Si l'aigua està clorada cal eliminar el clor reduint-lo amb tiosulfat 0.01N, abans de la seva esterilització, de tal forma que al agafar la mostra el tiosulfat reduirà el clor impedit que actui.

Per obtenir mostres d'aigua d'una aixeta en cal flamejar-la i deixar-la oberta durant uns 5 minuts abans de recollir la mostra. En el cas de recollir aigua procedent de llacs, rius, embassaments, etc., cal evitar les zones de excessivament superficials o profundes, evitant també zones massa properes a les ribes i les d'aigües excessivament calmades.

En aquests casos és recomanable submergir el flascó i destapar-lo a una profunditat d'uns 10cm., omplint-lo a contracorrent.

El trasllat de les mostres cal realitzar-lo de la forma més ràpida possible, i si entre el mostreig i l'anàlisi

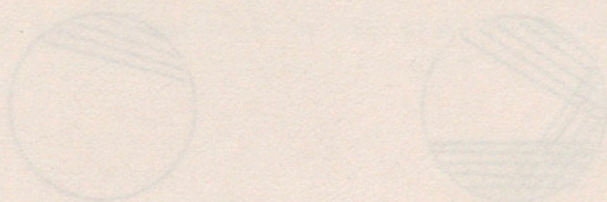






transcorren més de 2 hores cal mantindre l'aigua problema  
refrigerada a 40 C i en absència de illum. evitant així la  
multiplicació de la flora bacteriana existent. Malgrat seguir  
les recomanacions anteriors, no podran ser significatius els  
resultats dels anàlisis realitzats pasades les 48 hores de la  
recollida de la mostra.

part de la mostra de la qual s'extreuen les sèries i  
se fa una nova sèrie d'extreure en direcció perpendicular a  
l'anterior, sempre en la mateixa zona. Aquest procés es  
repetirà fins que es pugui veure el dibuix.



Les primeres sèries proporcionen un creixement abundant  
de tots els organismes presents a la mostra, les últimes en  
canvi, permeten l'obtenció de colonies aïllades.

2.- Sona de dilució i s'obra per inspecció en cada solida.

La suspensió bacteriana es dilueix successivament  
transferint 1 ml de la solució de 10<sup>-1</sup> a 9 ml de líquid (Ringer 1/41,  
obtenint dilucions de 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>,  
de cada dilució es prenen 1 ml de líquid i es continuen a continuació  
s'obtenen 20 ml de cada una de les dilucions i es continuen a 10 ml  
s'obtenen 10 ml de cada una de les dilucions i es continuen a 10 ml



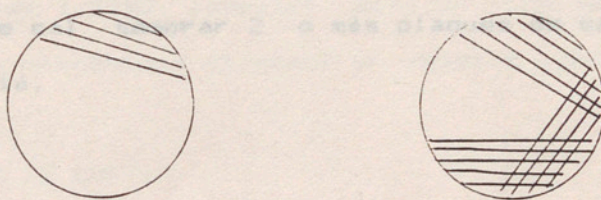
transcrites des 24 heures les premières : dans les  
réponses à 24 C : on observe de plus, surtout dans la  
multiplication de la force bactérienne existante. Mais pour  
les réactions des autres, on observe une diminution de  
résultats dans les réactions observées les 24 heures de la  
recueil de la matière.



## TÈCNiques DE SEMBRA

### 1.- Sembra per esgotament o estria sobre medi sòlid.

Amb la nansa carregada de material es fa una sèrie d'estries paral·leles i no sobreposades sobre una tercera part de la superfície de la placa. S'esterilitza la nansa i es fa una nova sèrie d'estries en direcció perpendicular a l'anterior, començant on aquesta acaba. Aquest procés es repeteix variis cops tal com indica el dibuix.



Les primeres estries proporcionen un creixement abundant de tots els organismes presents a la mostra, les últimes en canvi, permeten l'obtenció de colònies aïllades.

### 2.- Banc de dilucions i sembra per immersió en medi sòlid.

La suspensió bacteriana es dilueix successivament traslladant volums de 1ml a 9ml de diluïent (Ringer 1/4), obtenint dilucions de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ . Es depositen 0.1ml de cada dilució en plaques de Petri estèrils, a continuació s'aboquen 20ml del medi de cultiu fos i mantingut a 45°C, s'agita la placa per homogenitzar el seu contingut i es deix



# TECHNIQUES OF SEMBRA

1. - Sembra per deposició a terra sobre medi solid.  
 Amb la màquina corresponent de material es fa una sèrie  
 d'estries paral·leles i no superposades sobre una tercera  
 part de la superfície de la placa. D'estretament la màquina  
 fa una nova sèrie d'estries en direcció perpendicular a  
 l'anterior, cobrint en aquesta acada. Aquest procés es  
 repeteix variat fins a tal com indica el dibuix.



Les primeres estries proporcionen un creixement abundant  
 de tots els organismes presents a la mostra, les últimes en  
 canvi, permeten l'obtenció de colònies aïllades.

2. - Banc de diluents i sembra per immersió en medi solid.  
 La suspensió bacteriana es dilueix successivament  
 traslladant volums de 1ml a 9ml de diluent (Ringer 1/4),  
 obtenint dilucions de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ . Es depositen 0.1ml  
 de cada dilució en plaques de Petri estèrils, a continuació  
 s'abocuen 20ml del medi de cultiu tot i mantenint a 45°C,  
 s'afegix la placa per homogenitzar el seu contingut i es deixa



solidificar. Un cop incubades a la temperatura adequada, s'observaran colònies en profunditat (inmerses al medi) i en superfície.

### 3.- Sembrar superfície.

Es dipositen 0.1ml de les dilucions adequades de la mostra en plaques de Petri que contenen 20ml del medi de cultiu. Amb una nansa de Dricalsky, previamente flamejada amb alcohol, es reparteix la mostra per tota la superfície, efectuant moviments de rotació fins a la completa absorció. Sempre cal sembrar 2 o més plaques de cada mostra o de cada dilució.

### MEDI DE CULTIU

- Solució de Ringer 1/4 (g/L): Ringer sòlida 2.25g clorur

potàssic 0.100g clorur calcic

0.100g bicarbonat sòdic 0.05g

pH 7.0

- Agar nutritiu (g/L): Extracte de carn 1.0g extracte de

lleïet 2.0g pastura 5.0g clorur sòdic

5.0g agar-agar 15.0g pH 7.4



solidificar, en los lugares a la temperatura ambiente.  
se observan cambios en el comportamiento (interacción) en  
superficie.

## 2.- Sembrar por superficie.

En el presente, una de las técnicas más usadas de la  
mostran en las clases de Física que contienen, del lado de  
colón, una línea de división, previamente llamada en  
alcohol, se reparte la muestra por toda la superficie,  
efectuando movimientos de rotación, hasta la completa absorción.  
Sembrar en sembrar 2 o más clases de cada muestra o de cada  
difusión.



## ANÀLISIS D'ENUMERACIONS TOTALS

Aquesta prova té un alt valor significatiu pel microbiòleg, esdevenint una de les proves més freqüentment usades en l'anàlisi bacteriològic de les aigües. Cal tindre en compte les temperatures d'incubació en aquest assaig, doncs si bé les bacteries per l'home tenen una temperatura òptima de creixament a 37°C, també ens és d'utilitat el coneixement de la flora bacteriana de la mostra, que creix a 22°C, assolint així un creixament homogeni de la flora microbiana existent en aquells moments.

## DISCUSIÓ

### MEDIS DE CULTIU

- Solució de Ringer 1/4 (g/L): Clorur sòdic 2.25; clorur potàssic 0.105; clorur càlcic 0.120 i bicarbonat sòdic 0.05. pH 7.0
- Agar nutritiu (g/L): Extracte de carn 1.0; extracte de llevat 2.0; peptona 5.0; clorur sòdic 5.0 i agar-agar 15.0. pH 7.4



La muestra de emulsion se divide en tres partes: una para el análisis de la fase acuosa, una para el análisis de la fase oleosa y una para el análisis de la fase sólida. El análisis de la fase acuosa se realiza mediante la técnica de la membrana, que permite la separación de los componentes de la emulsion. El análisis de la fase oleosa se realiza mediante la técnica de la extracción, que permite la separación de los componentes de la emulsion. El análisis de la fase sólida se realiza mediante la técnica de la filtración, que permite la separación de los componentes de la emulsion.

## MEDIO DE CULTIVO

- Solución de Ringer 1.4 (L) Cloruro sódico 2.251 cloruro potásico 0.1021 cloruro cálcico 0.1201 bicarbonato sódico 0.051 pH 7.0
- Agar nutritivo (L) 1 Extracto de carne 1.01 extracto de hígado 2.01 peptonas 2.01 cloruro sódico 2.01 agar-agar 15.0, pH 7.4



## PROTOCOL

- S'efectuen dilucions seriades de la mostra en Ringer 1/4
- Es sembra per immersió en agar nutritiu 0.1ml de cada dilució, cada sembra es farà per duplicat o triplicat.
- Incubar 24h. per les plaques de 37°C i de 72-120h. per les de 22°C

El recompte es farà pel la tècnica de recompte en placa (Veure pag.47) i els resultats s'expressaran en nombre d'unitats formadores de colonies per per unitat de volum.

## DISCUSIÓ

El medi de cultiu utilitzat en aquesta prova ens permet el creixament del microorganismens aeròbics heterotrofs, incloent els que són mitjanament exigents en quant a requeriments nutritius.

El mètode descrit és especialment recomanat pels casos en que existeixen més de 30 bacteris per mililitre de mostra, en cas de contatges inferiors és preferible usar el mètode de filtració sobre membrana.



- Selection of three series of 12 points in 120 sec.
- The series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.
- The series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.
- The series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.

The results of the three series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.

## DISCUSSION

The results of the three series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.

The results of the three series are: 1. 120 sec. 2. 120 sec. 3. 120 sec.



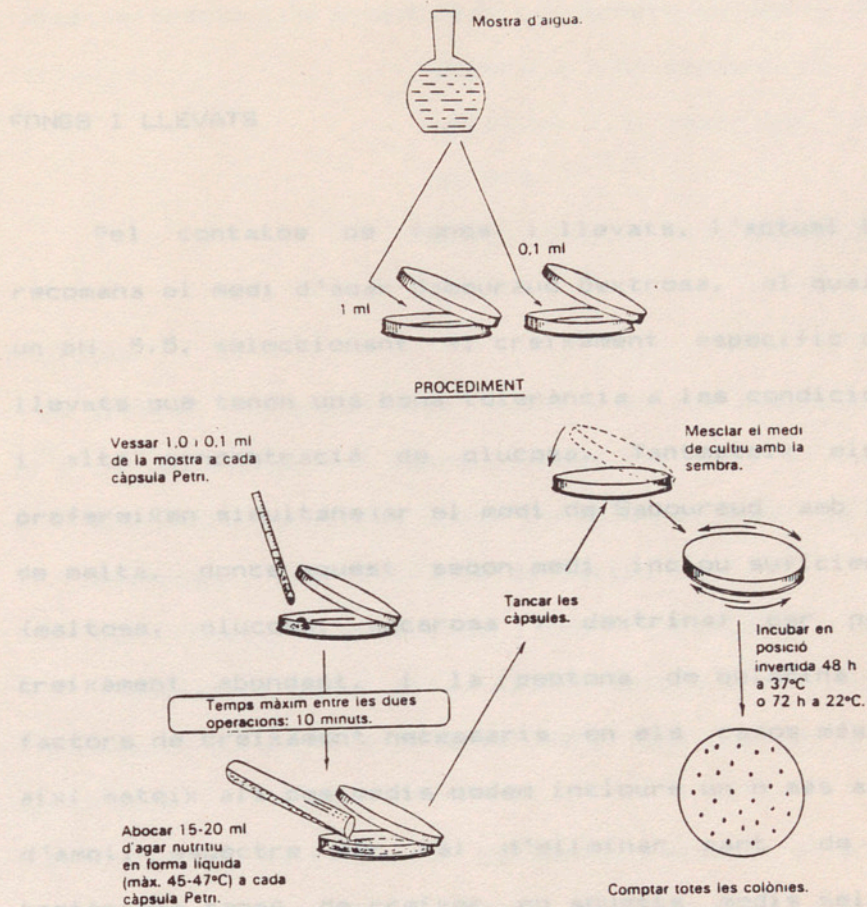


Fig. 1: Determinació de bacteris aeròbis pel mètode de Recompte en Placa

Agar Sebourn dextrosa (g/L): Dextrosa 20.0; extracte de llevat 5.0; agar-sebourn 13.0; pH 5.5; antibiòtic al 0.1% esteril.







## FONGS I LLEVATS

Pel contacte de fongs i llevats, l'actual legislació recomana el medi d'aqar Sabouraud Dextrosa, el qual presenta un pH 5.5, seleccionant el creixement específic de fongs i llevats que tenen una bona tolerància a les condicions àcides i alta concentració de glucosa. Tantmateix els experts prefereixen simultanejar el medi de Sabouraud amb l'extracte de malta, doncs aquest segon medi inclou suficients sucres (maltosa, glucosa, sacarosa i dextrina) per permetre un creixement abundant, i la peptona de gelatina aporta els factors de creixement necessaris en els casos més exigents, així mateix als dos medis podem incloure un o més antibiòtics d'ampli espectre per tal d'eliminar part de la flora bacteriana capaç de créixer en aquests medis selectius per fongs i llevats.

## MEDIS DE CULTIU

- Aqar Sabouraud dextrosa (q/L): Dextrosa 20.0; extracte de llevat 5.0; aqar-aqar 15.0;

pH 5.5

Antibiòtic al 0.1% estèril







- Agar extracte de malta (g/L): Extracte de malta 13.0;  
dextrina 2.5; peptona de  
gelatina 5.0; agar-agar 15.0  
pH 5.5  
Antibiòtic al 0.1% estèril

#### PROTOCOL

- Es sembren en superfície 0.1ml i de les dilucions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$  en Rinder 1/4 sobre plaques de:
  - a.- Medis selectius sense inhibidors: Agar de Sabouraud Dextrosa i agar extracte de malta.
  - b.- Medis selectius amb inhibidors bacterians (Neomicina, Penicilina, Cloranfenicol o Tetraciclina).
- incubació durant 5 dies a 20-22°C, fent una lectura parcial als 3 dies.
- El comptatge es farà pel mètode de recompte en placa i els resultats s'expressaran en nombre d'organismes per 100ml de mostra.

#### DISCUSIÓ

Cal esmentar un medi de Sabouraud Dextrosa modificat (dextrosa 40gr, peptona micòlica 10gr, agar-agar 15gr, aigua fins a 1L.), el qual gràcies a la peptona micòlica proporciona una homogenitat en l'aspecte macroscòpic dels foncs aïllats, doncs cal tenir present que per una mateixa



On a préparé un mélange de gomme arabique et de sucre (100g de gomme arabique et 100g de sucre) et on l'a dilué dans 1 litre d'eau. On a ajouté à ce mélange 100g de gomme arabique et 100g de sucre. On a laissé reposer le mélange pendant 24 heures. On a filtré le mélange et on l'a séché à 40°C. On a obtenu une poudre blanche.

## Discussion

On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments.

On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments.

## Conclusion

On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments. On a constaté que le mélange de gomme arabique et de sucre est très efficace pour la conservation des aliments.



espècie, l'aspecte colonial és diferent segons la peptona emplegada.

#### COLIFORMS (COLINETRIAS)

El coliforms han estat definits com bacteris Gram -, en forma de bastons, mòbils o immòbils, anaeròbils facultatius, no esporulats, que fermenten la lactosa en presència de aigua biliar, amb formació d'àcid i gas a temperatures entre 30-38°C, essent un grup format pels gèneres: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia* (mentre la lactosa es fa lentament).

El grup dels coliforms, per tant, està integrat per bacteris d'origen enteric, essent interessant la seva detecció per tal d'evidenciar una contaminació fecal relativament il·luminada en el temps, excepte en el cas de *E. coli*, doncs la seva detecció demostra una contaminació fecal recent.

#### MÈTODE DEL NOMBRE MES PROBLABLE (NMP)

##### a.- Determinació dels coliforms totals

##### MEDI DE CULTIU

- Caldo Lactosat (10/L) Peptona 5.0g Lactosa 5.0g extracte de carn 3.0g glicerol de bromocresol al 0.5% 4ml pH 7.2



repetition of aspects colonial as different regions is problems

progress.



## COLIFORMS (COLIMETRIA)

El coliforms han estat definits com bacteris Gram -, en forma de bastons, mòbils ò inmòbils, anaerobis facultatius, no esporulats, que fermenten la lactosa en presència de sals biliars, amb formació d'àcid i gas a temperatures entre 30-38°C, essent un grup format pels gèneres: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* i *Serratia* (fermenta la lactosa molt lentament).

El grup dels coliforms, per tant, està integrat per bacteris d'origen entèric, essent interessant la seva detecció per tal d'evidenciar una contaminació fecal relativament llunyana en el temps, excepte en el cas de *E.coli*, doncs la seva detecció demostra una contaminació fecal recent.

## MÈTODE DEL NOMBRE MES PROBLABLE (NMP)

### a.- Determinació dels coliforms totals

#### MEDI DE CULTIU

- Caldo Lactosat (q/L): Peptona 5.0; Lactosa 5.0; extracte de carn 3.0; púrpura de bromocresol al 0.5% 4ml; pH 7.2



## COLIFORMES (COLIMETRIA)

El coliforme, han estado definidos como bacterias gram -, en forma de bastones, móviles o inmóviles, anaerobios facultativos, no esporulantes, que fermentan la lactosa en presencia de agua biliar, con formación de ácido y gas a temperaturas entre 30-38°C, excepto un grupo formado por los géneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* (grupos de bacterias más limitados).

El grupo de los coliformes, por tanto, está formado por bacterias de origen entérico, siendo interesante la seva detectada por tal evidencia una contaminación fecal relativamente abundante en el fango, producto de la casa de E. coli, donde la seva detectada demuestra una contaminación fecal reciente.

## MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)

1.- Determinación de los coliformes totales

## MEDI DE CULTIVO

- Caldo lactosa (Lactosa 5.0g, Lactosa 5.0g, extracto de carne 2.0g) de producción al 0.5% (pH 7.5)



El caldo doble concentrat s'aconsegueix diluint les quantitats indicades dels diferents components en 500ml d'aigua.

El púrpura de bromocresol ens indicarà la producció d'àcid.

#### PROTOCOL

- Es sembren 10ml de la mostra en tubs que contenen 10ml de caldo lactosat doble concentrat i 1ml i 0.1ml de la mostra en tubs amb 10ml del medi a concentració normal (3 tubs per dilució). Cada tub haurà de portar una campana Durham per tal d'evidenciar la producció de gas.

- Incubació 24-48h. a 37°C

- Es consideren positius els tubs que presenten creixament amb acidificació del medi i producció de gas.

A partir dels tubs positius es calcularà el nombre més probable de coliforms en 100ml d'aigua problema, el contacte es farà per mitjà de les taules del NMP (pag.48).

#### PROTOCOL

b.- Determinació dels coliforms fecals

a.- Caldo lactosat-biliat al verd brillant

L'anàlisi dels coliforms fecals es realitzarà a partir dels tubs que han sortit positius en la prova de coliforms totals, en aquest cas el medi de cultiu utilitzat serà el



El caldo doble concentrat a aconseguir diluint les quantitats indicades dels diferents components en 500ml d'aigua.

El tubercle de promoció s'ha indicat la producció d'acid.

PROTOCOL

- Es pesen 10ml de la mostra en tubs que contenen 10ml de caldo lactosat doble concentrat i tal i 0.1ml de la mostra en tubs amb 10ml del medi a concentració normal (7 tubs per dilució). Cada tub haurà de portar una etiqueta duradora per tal d'evitar la producció de gas.

- Incubació 24-48h a 37°C

- Es consideren positius els tubs que presenten creixement i acidificació del medi i producció de gas.

A partir dels tubs positius es calcularà el nombre més probable de coliformes en 100ml d'aigua probiana, el resultat serà per mil·lí de les taules del 197 (pag. 49).

6.- Determinació dels coliformes fecals

L'anàlisi dels coliformes fecals es realitzarà a partir dels tubs que han resultat positius en la prova de coliformes totals, en aquest cas el medi de cultiu utilitzat serà el



caldo lactosat-biliat al verd brillant, que amb el seu contingut en sals biliars inhibeix el creixement dels Gram +, alguns dels quals també presenten la possibilitat de produir gas. Incubació a 44°C, durant 24 hores.

- També caldrà realitzar la prova del citrat, essent el medi recomanat per realitzar aquesta prova el citrat de Simmons. Continguts de citratar, fets es farà per mitjà de les taules dels NMP, expressant els resultats en foras de citratar fets del 103ml de mostra.

#### MEDIS DE CULTIU

##### 5.- Prova del citrat

- Caldo lactosat-biliat al verd brillant (B.G.B.L.), (q/L): Peptona 10.0; lactosa 10.0; bilis de bou 20; verd brillant 0.0133; pH 7.4. Es aombra una placa de citrat de Simmons.

- Incubació a 37°C durant 24h.

- Citrat de Simmons (q/L): Sulfat magnèsic 0.2; fosfat monoamònic 1.0; fosfat bipotàssic 1.0; citrat sòdic 2.0; clorur sòdic 5.0; blau de bromotimol 0.08; agar-agar 15.0;

algunes alcalinitzen el medi adut a la producció de CO<sub>2</sub> que espontàniament passa a carbonats alcalins. Per tant, es

PROTOCOL en 2. colli fets com aquelles colònies que no provoquen un viratge el medi.

a.- Caldo lactosat-biliat al verd brillant:

- Es preparen els tubs contenint 10ml del medi amb campana de Durham.







- A partir de cada tub que ha presentat creixament i formació de gas en la prova dels coliforms totals es pren un inòcul amb una nansa i es sembra en un tub de caldo B.C.D.L.

- Incubació a 44°C. durant 24 hores.

- Es consideren positius els tubs que presenten creixament i formació de gas.

El comptatge de coliforms fecals es farà per mitjà de les taules dels NMP, expresant els resultats en forma de coliforms fecals per 100ml de mostra.

#### b.- Prova del citrat

- A partir de cada un dels tubs positius en la prova dels coliforms totals es sembra una placa de citrat de Simmons.

- Incubació a 37°C durant 24h.

Les bacteries del biotip de *E. coli* no són capaces d'utilitzar el citrat mantenint així el medi de la mateixa tonalitat, és a dir, verd, en canvi els del biotip *E. aerogenes* alcalinitzen el medi degut a la producció de CO<sub>2</sub> que espontaneament passa a carbonats alcalins. Per tant, es consideraran *E. coli* fecals com aquelles colònies que no provoquen un viratge al medi.



- A partir de cada tub que se presentat creixement i formació de gas en la prova dels coliformes totals es pren un inocul amb una nanxa i es sembra en un tub de caldo 8.C.D.L. - Incubació a 44°C. durant 24 hores.

- Es consideren positius els tubs que presenten creixement i formació de gas.

El nombre de coliformes totals es farà per sí de les taulas dels IMR, expressant els resultats en forma de coliformes totals per 100ml de mostra.

#### b.- Prova del citrat

- A partir de cada un dels tubs positius en la prova dels coliformes totals es sembra una mica de citrat de simon.

- Incubació a 37°C durant 24h.

Les bacteries del díptic de E. coli no són capaces d'utilitzar el citrat mantenint així el medi de la mateixa tonalitat, és a dir, verd, en canvi els del díptic E. aerogenes alcalinitzen el medi debut a la producció de CO<sub>2</sub> que espontàniament passa a carbonata alcalina. Per tant, es consideraran E. coli totals com aueles colònies que no provoquen un viratge al verd.



## MÈTODE DE FILTRACIÓ DE MEMBRANA

El fonament del mètode consisteix en filtrar l'aigua problema a través d'una membrana d'acetat de cel·lulosa de porus adequat (es recomana 0.45  $\mu$ m), per tal de retindre els microorganismes. La filtració es fa per succió pel buit.

Un cop filtrada l'aigua, la membrana es disposa sobre un medi sòlid adequat pel desenvolupament de les colònies a la seva superfície.

Es poden trobar comercialitzats els medis Endo i McConkey per aquesta finalitat, no obstant la legislació recomana el medi de Chapman-TCC.

## MEDI DE CULTIU I TAMPO

- Aqar de Chapman-TCC (g/L): Extracte de carn 5.0; Peptona 10.0; Lactosa 20.0; extracte de llevat 6.0; blau de bromotimol (sol. al 1%) 5.0; aqar-aqar 20.0;  
Cal dissoldre els sòlids per ebullició, es deixa refredar i s'ajusta el pH a 7.2 i s'esterilitza. En el moment de la seva utilització es fon el medi i s'afegeix 50ml d'una solució de 0.05gr de trifenitetrazol i HCl en 100ml d'aigua destilada, s'esterilitza i s'adicionen 50ml de la solució formada per 0.2gr de terqiol 7 (heptadecil sulfat sòdic) en 100ml d'aigua



# METODE DE FILTRACIO DE MEMBRANA

El fonament del metode consisteix en filtrar l'aigua problema a través d'una membrana d'acetat de cel·lulosa de porus adequats (se recomana 0.45  $\mu$ m). Per tal de retindre els microorganismes. La filtració es fa per succió del buit. Un cop filtrada l'aigua, la membrana es disposa sobre un medi sòlid adequat per desenvolupament de les colònies a la seva superfície.

Es poden trobar comercialitzats els medis Endo i McCloskey per aquesta finalitat, no obstant la legislació recomana el medi de Chapman-TCC.

## MEDI DE CULTIU I TAMPÓ

- Àgar de Chapman-TCC (a/L): Extracte de carn 5.0g Peptona 10.0g Lactosa 20.0g Extracte de llevat 5.0g Biotina 0.001g Promocinol (a/L) 5.0g Agar-agar 20.0g

Cal dissoldre els sòlids per sol·licitat, es deixa refredar i s'ajusta el pH a 7.2 i s'esterilitza. En el moment de la seva utilització es fon el medi i s'afegeix 50ml d'una solució de 0.05% de cristinitrat de HCl en 100ml d'aigua destil·lada.

s'esterilitza i s'afegeixen 50ml de la solució formada per 0.2% de tartrà i 0.05% de sulfat sòdic en 100ml d'aigua



destilada. Es reparteix el medi en plaques i es deix refredar.

- Tampó fosfat a pH 7 (g/L): Fosfat dipotàssic 5.6; fosfat monopotàssic 2.2;

Si és necessari caldrà ajustar el pH amb HCl 0.1N

#### PROTOCOL

- Filtrar 20ml de mostra o 100ml per aigües potables o potabilitzades. Si es creu que la mostra està altament contaminada es pot diluir en tampó fosfat estèril a pH 7. De cada mostra cal fer dos filtrats sobre membranes diferents.

- Fer 2 o 3 rentats de la membrana amb tampó fosfat estèril pH 7.

- Incubar una de les membranes a 37°C i l'altre a 44°C durant 24 hores.

- Aspecte de les colònies:

E.coli i Citrobacter: Groques amb nucli taronja i halo groc al medi situat sota la colònia.

Klebsiella: Vermell o groc, sense nucli. El medi queda groc.

Enterobacter: Groc fosc o vermell amb nucli taronja, el medi queda groc.

No fermentadores de la lactosa: colònies de color violèta o lila, el medi queda blau.



destilada. Es recomenja el medi en minutos 1 es deix  
refredar.

- Tamps fofat a pH 7 (pH 11) Fofat dipotassic 0.54 fofat  
monopotassic 2.21

Si es necessari caldrà ajustar el pH amb HCl 0.1N

## PROTOCOL

- Filtrar 20ml de mostra a 100ml per siges potables o  
potabilitzades. Si es creu que la mostra esta altament  
contaminada es pot diluir en tamps fofat esteril a pH 7. De  
cada mostra cal fer dos filtrats sobre membranes diferents.

- Fer 2 a 3 tentats de la membrana amb tamps fofat esteril

pH 7.

- Incubar una de les membranes a 37°C i l'altra a 44°C durant

24 hores.

- Aspecte de les colonies:

Enterobacteri: Groques amb nucli farrós i halo groc

al medi situat sota la colonia.

Klebsiella: Vermell o groc, sense nucli. El medi queda groc.

Enterobacteri: Groc fosc o vermell amb nucli farrós, el medi

queda groc.

No fermentadores de la lactosa: colonies de color violeta o

lila, el medi queda blau.



La majoria de coliforms no es desenvolupen sobre aquest medi a 44°C, excepte E.coli que presenta el seu aspecte característic, de forma que s'estima el contacte sobre la membrana de 37°C com el nombre de coliforms fecals, i la de 44°C com E.coli. De totes formes, i a pesar de la bona selectivitat del medi, els resultats obtinguts només els podem considerar com a presumptius i cal confirmar les colònies de coliforms segons la tècnica descrita en la colimetria en medis líquids.

## DISCUSIÓ

A l'hora d'utilitzar el mètode de filtració de membrana cal considerar una sèrie de ventatges i desventatges de la tècnica. Entre les ventatges cal destacar que permet l'examen de grans volums d'aigua. Presenta una precisió superior al mètode del NMP i es poden obtenir resultats en un plaç de temps més breu. Està especialment indicada per aigües poc contaminades i sobre tot per les fortament mineralitzades, ja que poden donar falsos resultats en medis líquids.

Alguns dels inconvenients del mètode són que les membranes s'embussen fàcilment al treballar amb aigües tèrboles o plàncton, les substàncies retinudes a la membrana poden inhibir el creixament. Per últim indicar que aquesta tècnica no permet la determinació de producció de gas a



La mayoría de coliformes no se desarrollan sobre aguas  
 449C, excepto E. coli que crecen si son selecto  
 característico de forma que resulta el contacto sobre la  
 membrana de 275C con el nombre de coliform fecales. La de  
 449C con E. coli de forma que a pesar de la buena  
 selectividad del medio, los resultados obtenidos no son  
 pueden considerarse como una presunción y así confirmar los  
 coliformes de coliformes como la técnica descrita en la  
 colimetría en medio líquido.

DISCUSIÓN

A la hora de utilizar el método de filtración de membrana  
 así consideren una serie de ventajas y desventajas de la  
 técnica. Entre las ventajas así destacar que permite examen  
 de aguas de aguas, presencia una presión superior al  
 método del 100% y en todos los casos resultados en un día de  
 tiempo más corto. Esas ventajas, igualmente indicadas por  
 contaminantes y sobre todo por los organismos aerobios, la  
 que pueden dar tales resultados en medio líquido.

Algunos de los inconvenientes del método son que las  
 membranas a menudo facilitan al trabajar con algunas  
 débiles o débiles, las substancias retendidas a la membrana  
 pueden inhibir el crecimiento. Por tanto indicar que aquesta  
 técnica no permite la determinación de producción de gas a



partir de lactosa, i/o formació del indol a partir del triptòfan.

## ESTREPTOCOCCS (ESTREPTOMETRIS)

Cal destacar la importància de la investigació de la presència de enterococs grup enterococcus (7 espècies del gènere Streptococcus) del fet de reunir una sèrie de propietats que els converteixen en uns excel·lents indicadors de contaminació fecal, entre les coses principals que porten a aquesta conclusió cal destacar:

- Els enterococs són comuns en places dures, al sol i altres indrets sense vida animal, a diferència de bacteris com E. coli la majoria de coliformes.

- La presència d'enterococs indica necessàriament contaminació de tipus fecal.

- Els enterococs presenten uns requeriments nutritius relativament complexos, de forma que és difícil la seva multiplicació a l'aigua, tant en quantitat com en supervivència si es compara amb E. coli la cloració de l'aigua de forma que la seva supervivència és menor, així com major resistència en medi marí.



partir de la fecha de la recepción de la información

transmitida por el interesado

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial

El presente documento es de carácter confidencial



## ESTREPTOCOCS (ESTREPTOMETRIA)

Cal destacar la importància de la investigació de la presència de enterococs (grup format per 5 espècies del gènere *Streptococcus*) pel fet de reunir una sèrie de propietats que els converteixen en uns excel·lents indicadors de contaminació fecal, entre les raons principals que porten a aquesta consideració cal destacar:

- Els enterococs estan absents en aigües pures, al sòl i altres indrets sense vida animal, afirmació no extensible a la majoria de coliforms.
- La presència d'enterococs indica necessàriament contaminació de tious fecal.
- Els enterococs presenten uns requeriments nutritius relativament complexos, de forma que es fa difícil la seva multiplicació a l'aigua, tantmateix resisteixen millor que *E.coli* la cloració de l'aigua, de forma que la seva supervivència és major, així com major resistència en medis marins.



Cel. 50000000. La importancia de la investigación de la  
 presencia de estreptococos (grupo "D" de Streptococcus) en el  
 género Streptococcus, del 101 de Streptococcus, en la  
 proporción que se convierten en una excelente indicadora  
 de contaminación fecal, entre las zonas de incidencia que forman  
 la zona considerada del desarrollo.

El estreptococo está presente en aguas puras, al 101:  
 si se infecta con una vida animal, el estreptococo no sobrevive a  
 la mayoría de cultivos.

- La presencia de estreptococos indica necesariamente  
 contaminación de tipo fecal.

- El estreptococo crece en un requerimiento nutritivo  
 relativamente complejo, de forma que es difícil la seva  
 multiplicación a 1' agua. Sin embargo, resisten al calor que  
 el 101 la forma de 1' agua, de forma que la seva  
 supervivencia es mayor, así, con mejor resistencia en medio  
 marino.



## MÈTODE DEL MNP

### MEDIS DE CULTIU

- Caldo azida de Rothe (g/L): Peptona de carn 10.0; peptona de caseïna 10.0; dextrosa 5.0; clorur sòdic 5.0; fosfat dipotàssic 2.7; fosfat monopotàssic 2.7; azida sòdica 0.2; pH 7.0
- Caldo azida violeta de Litsky (g/L): Es prepara igual que l'anterior variant la concentració de clorur sòdic, del qual hi posarem 0.3 gr i afegint 0.083 gr de violeta d'etil.

El medi de Rothe conté l'azida sòdica, la qual actua com agent selectiu pels enterococs, inhibint la flora acompanyant per bloqueig de les cadenes respiratòries. Els tubs que presenten turbidesa deguda al creixament es consideren presumtívament positius i caldrà confirmar-ho sobre el medi de Litsky, el qual inclou el violeta d'etil, potenciant, junt amb l'azida sòdica, l'efecte inhibidor en front a bacteries diferents dels enterococs.

### PROTOCOL

- a.- Estreptometria presumtiva



# MÉTHODE DEL RHP

## MÉTHODE DE CULTIV

- Caldo azida de Roche (RHL) : Pese una de cada 10.01 de forma

de casina 10.01 de cada 2.01

clorur azida 2.01 total

dipotásico 2.71 total

monopotásico 2.71 azida azida

0.21 en 7.0

- Caldo azida violeta de Litsky (LVL) : Es prepara igual que

l' anterior variant la concentració de clorur azida del qual

hi posarem 0.2 or l' esteint 0.082 or de violeta d'etil.

El medi de Roche conté l' azida azida. La qual actua com

agent selectiu per a enterococs, inhibint la flora acompañant

per el seu efecte de les cadenes respiratòries. Els tubs que

presenten turbidats deuen al creixement de bacteris

presumptament positius i caldrà confirmar-ho sobre el medi

de Litsky, el qual inclou el violeta d'etil, potencialment, junt

amb l' azida azida. L' efecte inhibidor en front a bacteris

de diferents dels enterococs.

## PROTOCOL

1.- Esfronccament preliminar



- Es sembren 10ml de la mostra en tubs que contenen 10ml del medi de Rothe doble concentrat i 1ml i 0.1ml en tubs amb el medi a concentració normal (3 tubs per dilució).
- Incubació durant 48 hores a 37°C.
- El comptatge es farà per la tècnica del NMP, essent els tubs positius els que presentin turbidesa. Els resultats s'expressaran en nombre d'enterococs per 100ml de mostra.

#### b.- Estreptometria confirmativa

- Cada tub del caldo de Litsky s'inocula amb una o dues nanxes procedents d'un tub de caldo de Rothe presumiblement positiu.
- Incubació durant 24-48 hores a 37°C.
- La presència d'enterococs es manifesta per un enterboliment general del tub, no obstant, en algunes ocasions es mostra com un enterboliment molt tènue, acompanyat d'abundant sediment de color violeta al fons del tub.

#### PROTOCOL

#### TÈCNICA DE FILTRACIÓ DE MEMBRANA

- Aquest mètode ens permet fer un recompte dels estreptococs fecals presents a la mostra d'aigua donat que, un cop filtrada la mostra, els microorganismes presents a la membrana de cel·lulosa es fan créixer sobre un suport



- La muestra 1001 de la muestra en tubo que contiene 10ml del  
 agua de Rofhe cubre completamente a 1 ml y 0.1ml en tubo y el  
 agua a concentración normal 1.5 tubo por minuto  
 - Incubado durante 24 horas a 27°C.

- El control se hace por la técnica del Rofhe. Usando los tubos  
 controlados por las técnicas anteriores. Los resultados  
 se expresan en número de enterococos por 100ml de muestra.

b. Examen bacteriológico confirmativo  
 - Cada tubo del caldo de Listeria inoculado con una o dos  
 bacterias enterococos a un tubo de caldo de Rofhe presumiendo  
 negativo.  
 - Incubado durante 24-48 horas a 27°C.

- La presencia de enterococos se manifiesta por un enturbiamiento  
 general del tubo, no obstante, en algunas ocasiones se muestra  
 con un enturbiamiento más tenue, acompañado de abundante  
 sedimentación de color violeta al fondo del tubo.

# TÉCNICA DE FILTRACIÓN DE MEMBRANA

Esta técnica es permitida por la técnica de  
 extracción directa presente a la muestra de agua donde que  
 un con filtro de la muestra, sin microorganismos presentes a la  
 membrana de cel.ulosa es tan crítica sobre un soporte



nutritiu que conté inhibidors que només permeten el desenvolupament de les colònies d'estreptococs fecals.

#### MEDI DE CULTIU

- Medi de Slanetz (g/L): Peptona 20.0; Extracte de llevat 5.0; glucosa 2.0; fosfat dipotàssic 4.0; Azothidrat sòdic 0.4; pH 7.2

Afehir 10 gr. d'açar i disoldre calentant lentament sense sobrepassar els 100°C. Llavors es deix refredar a 50°C i s'afageix 10ml d'una solució estèril de 2,3,5- trifenil-tetrazoli al 1%, col·locar en plaques de Petri i deixar refredar.

#### PROTOCOL

- Un cop filtrada la mostra es col·loca la membrana sobre una càpsula de Petri de Slanetz.
- Incubar 48 hores a 37°C
- Contatge de les colònies que apareixen vermelles, violetes o roses.

En ocasions la presència d'estafilococs ens pot induir a errors per presentar un aspecte similar, de forma que cal



notitia que cones inhibitori que nonne permittit  
desenvolvimento de las colonias de bacterias - etc.

## MEDI DE CULTIV

- Medi de Blanka (0.1% Bactera 20.0% Extracte de l'ysat  
8.0% alcool 2.0% foies de l'ysat)

4.0% alcoolat de l'ysat 0.1% en 7.2

Alcool 10 cr. d'adit i disolore calientant lentament sense  
sopressar els 100°C. L'ysat es deixi refredar a 50°C i  
s'afegeix 10ml d'una solució saturada de 2,5,8-trinitro-  
ferrazol al 1% col·locar en plaques de Petri i deixar  
refredar.

## PROTOCOL

- Un cop fregada la mostra es col·loca la mostra sobre una  
càpsula de Petri de Blanka.

- Incubar 48 hores a 37°C

- Contar de les colònies que apareixen vermelles, violetes

o roses.

En ocasions la presència d'estafilococs que pot induir a  
error per presentar un aspecte similar, de forma que cal











## CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

La investigació d'espores de clostridis sulfit reductors, pertanyents majoritàriament al *Clostridium perfringens*, en general té el mateix significat que la investigació dels enterococs, amb la ventatge de tindre una supervivència major que qualsevol altre indicador bacterià de contaminació fecal degut a la seva capacitat formadora d'espores.

### MEDI DE CULTIU

- Agar SPS (g/L): Sulfat sòdic 0.5; sulfat de polimixina 0.01; sulfadiacina sòdica 0.12; peptona de caseïna 15.0; extracte de llevat 10.0; citrat fèrric 0.5; tioalcolat sòdic 0.1; polisorbato 80 0.05; agar-agar 15.0

La sulfadiacina i la polimixina presents al medi actuen com a agents inhibidors i el tioalcolat millora les condicions d'anaerobiosis, efecte que es pot potenciar afegint una capa de vaselina estèril sobre el medi de cultiu un cop inoculat.



## CLUSTRIUM PERFRINGENS

La investigación de *Clustrium perfringens* en los alimentos, especialmente en los productos cárnicos, ha sido objeto de numerosos estudios. Este microorganismo es uno de los principales agentes causantes de intoxicaciones alimentarias. Se caracteriza por su capacidad de formar esporas, lo que le confiere una gran resistencia a las condiciones adversas. En el presente trabajo se describen los métodos de cultivo y de identificación de este patógeno.

## MEDI DE CULTIVO

- Agar CPE (1%): sulfato de sodio 0.5g, extracto de levadura 0.5g, sulfamida sódica 0.12g, peptona de caseína 12.0g, extracto de levadura 10.0g.
- Agar férrico 0.5g, fósforo 0.1g, sulfato de sodio 0.1g.
- Polisorbato 80 0.05g, agar-agar 12.0g.

La sulfamida es la polimixina presente en el medio selectivo para la identificación de *Clustrium perfringens*. Este compuesto actúa como agente inhibidor de otros microorganismos, permitiendo el crecimiento selectivo de este patógeno. El medio de cultivo se prepara en condiciones asépticas y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Una vez inoculado, se incuban las placas a 37°C durante 24-48 horas.



Per acció del *Clostridium* el sulfit es redueix a sulfur, que reacciona amb el citrat fèrric del medi formant un precipitat negre de sulfur de ferro al voltant de les colònies, permetent la seva detecció i comptatge.

#### PROTOCOL

- S'escalfen 10 ml de la mostra a 80°C al bany maria durant 15 minuts, eliminant així les formes vegetatives presents a l'aigua problema.
- Refredar rapidament els tubs sota un raig d'aigua freda.
- Repartir la mostra en dos tubs amb 5ml d'aqar SPS doble concentrat, el qual s'ha mantingut fos i a 45°C.
- Mezclar el contingut de cada tub i deixar solidificar.
- Incubar a 44°C efectuant lectures a les 24 i 48 hores.

Les colònies apareixen de color negre, procedint cada una d'una espora de clostridi. Un cop fet el comptatge el resultat s'expressa en nombre d'espores de clostridis sulfit-reductors per 100ml de mostra.

Si la mostra presenta una forta contaminació ens apareixen els tubs de cultiu totalment ennegrits i cal repetir l'assaig partint de dilucions de la mostra.







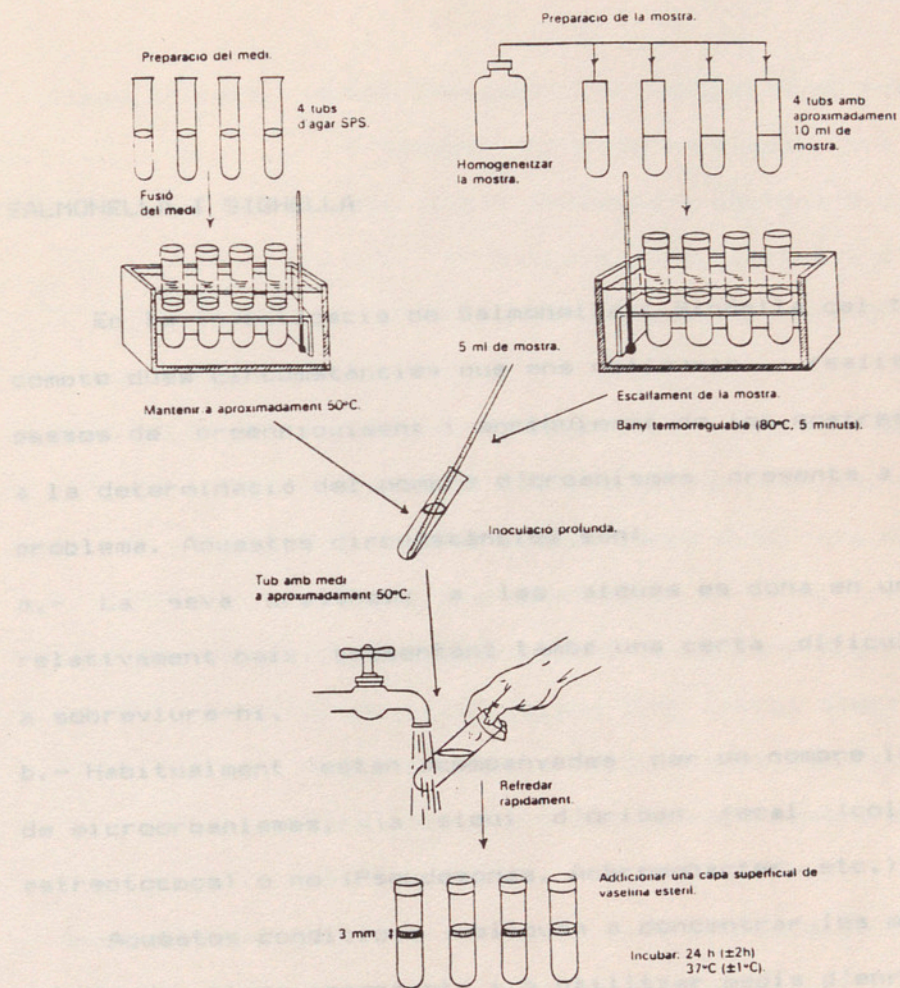


Fig. 2: Determinació dels clostridis sulfito-reductors pel mètode del Recompte en Tub.



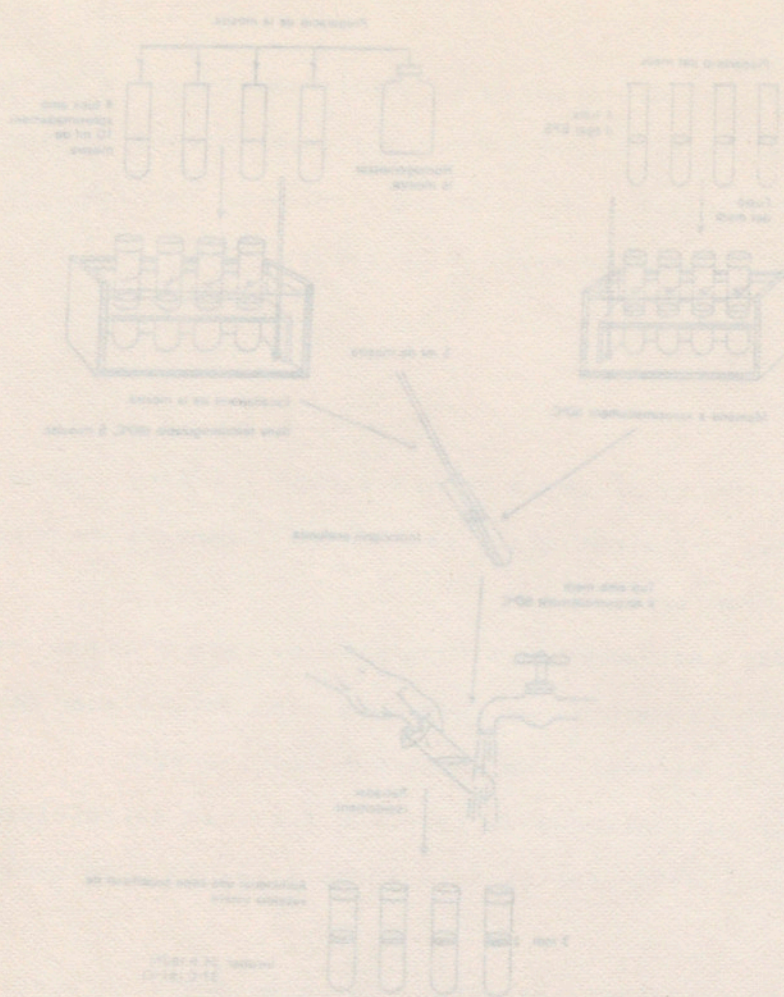


Fig. 2. Determinación de la concentración de un líquido por el método del reactivo en tubos.



## SALMONELLA I SIGHELLA

En la investigació de Salmonella i Sighella cal tenir en compte dues circumstàncies que ens obligaran a realitzar uns passos de preenriquiment i enriquiment de les mostres previs a la determinació del nombre d'organismes presents a l'aigua problema. Aquestes circumstàncies són:

- a.- La seva presència a les aigües es dona en un nombre relativament baix, presentant també una certa dificultat per a sobreviure-hi.
- b.- Habitualment estan acompanyades per un nombre important de microorganismes, ja sigui d'origen fecal (coliforms i estreptococs) o no (Pseudomonas, Achromobacter, etc.).

Aquestes condicions obliquen a concentrar les mostres a partir de volums importants i a utilitzar medis d'enriquiment selectius, per tal d'inhibir el creixament d'altres bacteris.

## MEDIS DE CULTIU

- a.- Medi de preenriquiment:

- Caldo Lactosat (g/L): Extracte de carn 3.0; Peptona 5.0; lactosa 5.0

- b.- Medis d'enriquiment:



En la investigación de salmonella, Sibielia es el factor en  
completo de las circunstancias que nos obligan a realizar una  
caso de crecimiento y enriquecimiento de los medios previos  
a la determinación del nombre y crecimiento presente a la  
problema. Posibles circunstancias son:

a.- La zona presente a los sitios es dada en un nombre  
relativamente bien, presentando también una cierta dificultad por  
a sobrevivir.

b.- Habitualmente están acompañados por un nombre importante  
de microorganismos, la cual d'orden total (coliformes y  
patógenos) o no (pseudomonas, aerobacter, etc.).

Algunas condiciones ayudan a concentrar los medios a  
partir de volúmenes importantes; a utilizar medio d'enriquecimiento  
selectivo, por tal d'indicio al crecimiento d'algas bacterias.

## MEDIO DE CULTIVO

a.- Medio de enriquecimiento:

- caldo lactoso (pH 7.4) Extracto de carne 2.0g Peptona 2.0g

lactosa 2.0g

b.- Medio d'enriquecimiento:



- Caldo Selenit (q/L): Triptona 5.0; lactosa 4.0; fosfat  
sòdic 10.0; selenit sòdic 4.0
- Caldo amb Tetratiónat (q/L): Proteosa i peptona 5.0; sals  
biliars 1.0; carbonat càlcic  
10.0; tiosulfat sòdic 30.0
- c.- Medis d'aïllament:  
- Agar DCLS (q/L): Peptona especial 10.0; citrat sòdic 10.5;  
tiosulfat sòdic 5.0; lactosa 5.0; sacarosa  
5.0; desoxicolat sòdic 2.5; roig neutre  
0.03, agar-agar 12.0
- agar SS (q/L): Extracte de carn 5.0; peptona 5.0; lactosa  
10.0; sals biliars 8.5; citrat sòdic 10.0;  
tiosulfat sòdic 8.5; citrat fèrric 1.0;  
verd brillant 0.00033; roig neutre 0.025;  
agar-agar 15;
- Agar Wilson-Blair (q/L): Peptona 5.0; extracte de carn 5.0;  
dextrosa 5.0; fosfat sòdic 4.0; sulfat  
ferrós 0.3; indicador de sulfat de bismut  
8.0; verd brillant 0.016; agar-agar 13.0;  
Cal guardar el medi a 49c durant 4 dies abans del seu us,  
doncs pot resultar massa inhibitori.
- d.- Medi d'identificació:  
- Agar Klioler (q/L): Extracte de carn 3.0, extracte de  
lleuat 3.0; peptona 15.0; proteosa i  
peptona 5.0; lactosa 10.0; dextrosa 1.0;  
sulfat ferrós 0.2; clorur sòdic 5.0;







biosulfat sodic 0.3; roig fenol 0.024;

agar-agar 12.0;

#### PROTOCOL

- Preenriquiment: S'inoculen 10ml de la mostra en 100ml de caldo lactosat doble concentrat. s'incuba 24 hores a 37°C.
- Enriquiment: A partir del preenriquiment cal inocular 2ml en 20ml de caldo selenit i la mateixa quantitat en 20ml de caldo amb tetracionat, s'incuba 24 hores a 37°C.
- Aïllament: a partir dels tubs d'enriquiment, es sembra per escotament una nansa de cada cultiu en plaques dels medis DCLS, SS i Wilson-Blair.
- Identificació: A partir dels subcultius de l'aïllament cal sembrar per superfície i per picadura en l'agar Kliqler, incubar 24 hores a 37°C.

En el caldo lactosat es desenvolupen en primer lloc els microorganismes de metabolisme ràpid, amb la producció de metabolits àcids que excreten al medi, ocasionant una baixada de pH. Les espècies de *Salmonella* i *Shigella* toleren molt millor aquestes condicions àcides que les altres bacteries presents a la mostra, de forma que prolifiren al medi.

El caldo selenit i el caldo amb tetracionat contenen inhibidors del creixement d'altres enterobacteriàcies com *E.coli*, enriquint així la població de *Salmonella* i *Shigella*.







L'agar DCLS conté citrat sòdic i desoxicolat sòdic, els quals inhibeixen el creixament de les bacteries Gram +, així com de nombroses *Proteus* i coliforms.

L'agar SS també inhibeix el creixament de les bacteries Gram +, i en particular de nombrosos coliforms i *Proteus*. Les colònies incolores que creixen en aquest medi corresponen a *Salmonella* i *Shigella*, en canvi els coliforms resistents o altres fermentadors de la lactosa formen colònies roses o vermelles.

L'agar de Wilson-Blair és un medi molt selectiu per *Salmonella typhi*, que apareix de color negre amb reflexes metàl·lics, altres *Salmonella* productores de sulfhídric donen colònies de color marronós, en canvi les no productores i els *E. coli* donen colònies de color verd.

L'agar Kliqier permet observar la fermentació de la glucosa i la lactosa, així com la producció de sulfhídric. *Salmonella* i *Shigella* únicament fermenten la glucosa, observant-se el fons del tub de color groc i la superfície vermella. Algunes *Salmonella* també produeixen gas i sulfhídric, posant-se de manifest per la rotura del medi i aparició de color negre (sulfur de ferro).

La presència de representants del gènere *Proteus* ens pot induir a errors i cal diferenciar-lo dels gèneres *Salmonella* i *Shigella* per la prova de la descomposició de la urea (Rodier, 1981), essent aquests dos últims gèneres ureasa - i el *Proteus* ureasa +.



(Hobler, 1951), essent surtout des algues denses ureas +  
induit à erreur : cet échantillon de la péninsule Salomon  
+ Salomon par la brève de la décomposition de la mer  
induit à erreur : cet échantillon de la péninsule Salomon  
la présence de représentants des autres Proctos ureas  
coûtait de color noire (autre de l'écou).  
autobiot, passant de manifest par la culture del med +  
vermelle. Salomon, même production des +  
observées et l'écou de la color noir + la substance  
Salomon + Salomon, passant, fermenter la glucose,  
glucose + la lactose, ainsi que la production de l'autobiot.  
L'écou Kilder, permet observer la fermentation de la  
E. coli donne colonies de color verd.  
colonies de color marron, on peut les ne producteur + els  
marron, les, elles Salomon producteur de l'autobiot donne  
Salomon typé, une aggrég de color noir aux colonies  
L'écou de Wilson-Biller se un med, soit sélection par  
vermelle.

algues fermentaires de la classe formant colonies roses +  
Salomon + Salomon, on peut les colonies résistantes +  
colonies incolores, une culture en milieu med correspond à  
Gram + : en particulier de nombreuses colonies + Proctos. Les  
L'écou 52 forme l'autobiot et croissent de les bactéries  
quels l'autobiot et croissent de les bactéries Gram - + ainsi  
L'écou 52 forme l'autobiot et croissent de les bactéries



Per a la confirmació definitiva de *Salmonella* caldrà fer les següents proves bioquímiques:

- Fermentació de sucres (TSI)
- Producció de sulfhídric
- Ureasa
- Lisina descarboxilasa
- Voges-Proskauer
- Producció d'Indol
- Beta-galactosidasa

#### MEDIOS DE CULTIU

El resultat de la investigació de *Salmonella* i *Shigella* s'indicarà com a presència o absència dels microorganismes a la mostra.

5.0l Extracte de llevat 1.0l  
aiguat sòda 10.0l glicina 12.0l  
biclor de liti 5.0l agar-agar  
20.0l en a.s  
Sol d'emulsió de clara d'ou  
telurit

#### Aspecte de les colònies

*Staphylococcus aureus*: negres (reduïxen el telurit),  
brillants, convexes, amb marge regular, de 1-1.5mm de  
diàmetre, rodejades d'un halo clar de líquid d'uns 2-3mm. A  
les 48 hores es poden apreciar precipitats als halos.  
*Staphylococcus saprophyticus*: negres o marrons, mates i amb  
el marge irregular.  
*Micrococcus*: marrons, molt petites i sense halo.



Por la contracción definitiva de Salmonella calderae

los siguientes grupos microbianos:

- Formas de bacterias (131)

- Formas de sub-bacterias

- Virus

- Líquidos descomponibles

- Bacterias-proteínas

- Bacterias y lípidos

- Bacterias y proteínas

El resultado de la investigación de Salmonella y Shigella  
a indicará con la presencia o ausencia de microorganismos  
la muestra.



## STAPHYLOCOCCUS

La investigació dels estafilococs es realitza preferentment dins els anàlisis bacteriològics de les aigües de les piscines, no obstant també és recomanable realitzar-la amb l'aigua embotellada.

### MEDIS DE CULTIU

- Agar Baird-Parker (g/L): Triptona 10.0; extracte de carn 5.0; Extracte de llevat 1.0; piruvat sòdic 10.0; glicina 12.0; clorur de liti 5.0; agar-agar 20.0; pH 6.8
- 50ml d'emulsió de clara d'ou-telurit

### Aspecte de les colònies:

*Staphylococcus aureus*: negres (redueixen el telurit), brillants, convexes, amb marge regular, de 1-1.5mm de diàmetre, rodejades d'un halo clar de lipòlisi d'uns 2-5mm. A les 48 hores es poden apreciar precipitats als halos.

*Staphylococcus saprophyticus*: negres o marrons, mates i amb el marge irregular.

*Micrococcus*: marrons, molt petites i sense halo.



# STAPHYLOCOCCUS

La investigation des staphylocoques est réalisée pratiquement dans les analyses bactériologiques de la suite de nos analyses, en constatant l'absence de réaction positive dans les analyses et l'absence d'antigènes.

## MÉTHODE DE CULTURE

Après avoir été lavés à l'eau stérile, les extraits de culture

2.01 Extraits de l'élevé 1.01

généralisés 10.01 dilués 12.01

clonés de 11.01 2.01 après sécher

20.01 pH 6.8

50ml d'émulsion de cloné 8.01

révisé

analyse de la colonie

Staphylococcus aureus (révisé en 11.01)

brillants, convexes, sans marces (révisé, de 11.01 de

diamètre, redoublés d'un halo clair de 1.5-2mm, à

les 48 heures on observe précipités aux bords.

Staphylococcus saprophyticus (révisé à marces, sans 11.01)

et marces irréguliers.

Micrococcus maronii, petit bacille à sensibilité



Bacillus: marrons, mates i grans.

- Agar Chapman (g/L): Extracte de carn 1.0; peptona 10.0; manitol 10.0; clorur sòdic 75.0; roïd de fenol 0.025, agar-agar 15.0; pH 7.5

L'elevada concentració de sal inhibeix el creixement de la resta de bacteris presents a la mostra, permetent el creixement dels estafilococs. Els possibles coagulasa positius produeixen colònies arrodonides amb zones groc brillant, en canvi els estafilococs no patògens formen colònies púrpura vermelloses.

- Aigua de peptona (g/L): peptona 10.0, clorur sòdic 5.0;

- Agar per DNasa (g/L): Triptosa 20.0; DNA 2.0; clorur sòdic 5.0; agar-agar 12.0; pH 7.3

#### PROTOCOL

a.- Preenriquiment:

- A partir de 1ml de la mostra es sembra un tub amb caldo Baird-Parker (igual composició de l'agar Baird-Parker sense afegir-hi l'agar).

- Incubació 24h. a 37°C.



Bacillus anthracis, spores 1 gram.

- Agar Chapeau (1/1) Extracte de corn 1.01 peptone 1.01  
manitol 10.01 chlorure sodic 5.01 phosphate 0.025, agar  
10.01 pH 7.2

L'analyse caractéristique de cet inhibiteur est l'absence de la  
testa de pectate présente à la surface, caractéristique  
l'absence de la testine. Les colonies sont toutes positives  
ou négatives aux acides aminés et sont donc brillantes, en  
carré, les testines ne sont pas formées, les colonies sont  
vermeilles.

- Agar de peptone (1/1) peptone 10.01 chlorure sodic 5.01

- Agar pour l'analyse (1/1) Triptone 20.01 DNA 2.01 chlorure sodic  
2.01 agar-agar 12.01 pH 7.2

## PROTOCOL

4. - Préparation:

- A partir de lui, de la montre est remplie au tub and caldo  
Baird-Parker (l'eau composée de 1 agar Baird-Parker sans  
stéaril, ni l'agar).

- Incubation 24h à 37°C.



b.- Identificació:

- A partir de 0.1 ml del medi de preenriquiment es sembra en superfície en agar Baird-Parker i/o agar Chapman.
- Incubació 24-48 hores a 37°C
- Les colònies sospitoses que s'observin en el creixament en placa es subcultiven en un medi absent d'inhibidors (ex. aigua de peptona), evitant així que aquests interfereixin en les proves posteriors.
- Un cop crescut en l'aigua de peptona cal assajar les següents proves:

a.- DNasa: Cal sembrar una estria al centre de la placa amb agar per DNasa i s'incuba 24 hores a 37°C. Transcorregut aquest temps s'inunda la placa amb ac. clorhídric 1N, el qual reacciona amb el DNA del medi formant un precipitat tèrbol, les colònies que han produït DNasa apareixen rodejades d'un substracte que conté fragments de nucleòtids que no precipiten amb l'àcid, mostrant un halo clar al voltant de la colònia.

b.- Prova de la Plasmococcalasa: Es mezclen a parts iguals plasma de conill i la suspensió bacteriana, s'incuba a 37°C efectuant la lectura de la coagulació a les 3-4 hores d'incubació.



## B. - Identificación

- A partir de 0.1 al 1.0 de crecimiento de sembras en  
suspensión en agar Baird-Parker y agar Chapman.

- Incubado 24-48 horas a 37°C.

- Las colonias características que se observan en el crecimiento en  
placa se inoculan en un medio ácido de inhibición (M.I.),  
algunas de las colonias, evitando así una reacción interferente en  
las pruebas posteriores.

- Un top crecido en la zona de reacción con agar Chapman  
siguiente prueba:

a. - Difusión: Cal separamos una estría al centro de la placa con  
agar por Difusión y a' incubado 24 horas a 37°C. Transparencia  
algunas formas a' inunda la placa con M.I. al cual  
reacción con el DNA del medio formando un precipitado fúndido.  
Las colonias que han producido Difusión aparecen rodeadas de un  
substrato que con el tiempo se fragmenta de nucleótidos que no  
precipitan con el ácido, mostrando un halo claro al volar de la  
colonia.

b. - Prueba de la Plasmococulosis: Se inoculan a partes iguales  
clonales de control y la suspensión bacteriana a' incubado a 37°C  
efectuando la lectura de la conductividad a las 3-4 horas  
d' incubación.



## AEROMONAS

Si bé *Aeromonas* creix bé en medis rics com l'aqar nutritiu, així com en medis selectius per enterobacteriacies, com l'aqar McConkey, m-Endo o Salmonella-Shigella, en aquests medis tenim l'inconvenient de que les morfologies colonials es poden confondre amb les de les entèriques, produint a més falces oxidases negatives.

Existeixen varis medis selectius per *Aeromonas*, essent el medi Rippey & Cabelli (medi amb trehalosa) el més recomanat per la seva selectivitat, especificitat i eficiència de recuperació.

## MEDIS DE CULTIU I REACTIUS

- Medi amb trehalosa (g/L): Triptona 5.0; extracte de llevat 2.0; trehalosa 5.0; clorur sòdic 3.0; clorur potàssic 2.0; sulfat magnèsic heptahidratat 0.2; clorur fèrric hexahidratat 0.1; blau de bromotimol 0.04; aqar-aqar 15

S'ajusta el pH a 8 amb hidròxid sòdic 10M i







s'esterilitza a l'autoclau 15 minuts a 121°C. es deix  
refredar a 55°C i s'hi afageix:

Etanol absolut 10 ml

Ampicilina 20 mg

Desoxilat sòdic 100 mg

S'agita suauement i es reparteix en plaques.

- Medi amb manitol: La preparació és igual que el medi amb  
trehalosa substituint el sucre per 5 gr de manitol i 0.08 gr  
de blau de bromotimol. Un cop esterilitzat s'afageix 1 gr/L  
de desoxicolat sòdic i es reparteix en plaques.

- Fosfat Tampó Salí (PBS) (g/L): Clorur sòdic 7.2; Fosfat  
sòdic 1.48; fosfat  
dipotàssic 0.43; pH 7.2

- Reactiu de l'oxidasas: El reactiu utilitzat és el  
N,N,N,N,tetrametil-p-fenildiamina en solució aquosa al 1%.

#### PROTOCOL

- Es preparen dilucions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  i  $10^{-3}$  de la mostra en Ringer  
1/4, cada dilució cal fer-la per duplicat.
- Les dilucions es filtren a través d'un filtre de membrana  
de 47mm de diàmetre i 0.45  $\mu$ m de tamany de porus (Gelman).



## PROTOCOL

- Es pressen dilutions 10, 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> de 14 heures en 14 heures.
- Les dilutions se filtrent à travers d'un filtre de membrane de 45 µm de diamètre 10 µm de diamètre de porus (Gelman).

- Réaction de l'antigène et réaction négative de 14 heures.

diagnostique 0.45 µm 7.2

sérum 1.48 µm 7.2

- Positif (série 1955) (1955) Chlorure de 7.2 µm 7.2

de diagnostic sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.

de la réaction sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.

de la réaction sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.

de la réaction sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.

de la réaction sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.

de la réaction sérum 1.48 µm 7.2 et réaction en dilution.



- Un cop filtrada la mostra, la membrana s'estén sobre una placa amb medi de trehalosa i s'incuba a 37°C durant 18-20 hores.

- Es trasllada la membrana en un medi amb manitol durant 2-3 hores.

- Transcorreut aquest temps es diposita sobre un paper de filtre amb PBS durant 2-3 minuts.

- Finalment es trasllada a un altre paper de filtre amb el reactiu de l'oxidasa.

Es consideren *Aeromonas* sp. aquelles colònies de 2mm de tamany que viren a color groc, tant en el medi amb trehalosa com en el manitol, i que amb l'oxidasa donen un halo violeta.







## VIBRIO

Si bé en el païssos en els que el colera practicament ha desaparegut es dona poca importància a la investigació del *Vibrio*, el seu estudi es altament útil quan es corre el risc de propagació d'una epidèmia degut a la presència de malalts o portadors de germens que provenen del estranger, en aquest cas cal procedir a l'anàlisi de les aigües residuals contaminades per les deposicions d'aquests malalts.

Degut a la baixa concentració de *Vibrio* que es preveu trobar a l'aigua cal procedir a un preenriquiment de la mostra amb aigua peptonada a diferent concentració de sal i a diferent pH, tenint en compte els diferents requeriments que presenten les diferents espècies pel seu creixament.

Pel preenriquiment partirem de 20ml de la mostra que afegirem a 200ml de cada un dels següents medis de cultiu:

- Aigua peptonada tamponada
- Aigua peptonada alcalina (clorur sòdic 5.0g/L), pH 8.5
- Aigua peptonada hiperalcalina (ClNa 50.0g/L)

Cada medi s'incubarà 18-24 hores a 37°C.

A continuació cal procedir a l'enriquiment de la mostra que es realitzarà en el medi Agar de Tiosulfat citrat-Bilis-Sacarosa (TCBS), medi selectiu pels vibrions enteropatógens.







Inhibint el creixament de les enterobactèries degut a les elevades concentracions de citrat, tiosulfat, bilis i clorur sòdic.

- creixament en aigua peptonada sense CINA i amb CINA al 12%

- Medi TCBS (g/L): Peptona de caseïna 5.0; peptona de carn 5.0; extracte de llevat 5.0; citrat sòdic 10.0; tiosulfat sòdic 10.0; bilis bovina 5.0; colat sòdic 3.0; sacarosa 20.0; clorur sòdic 10.0; citrat fèrric 1.0; blau de timol 0.04; blau de bromotimol 0.04; agar-agar 14.0;

Per l'enriquiment cal sembrar una nansa de cultiu de cada medi de preenriquiment sobre una placa de TCBS i incubar durant 18-24 hores a 37°C.

Tècniques de identificació:

a.- Identificació presumtiva:

Es realitza a partir de la morfologia colonial sobre el medi TCBS (fines i groques) essent també no productors de sulfhídric i fermentadors o no de la sacarosa, per complementar aquesta identificació presumtiva també cal realitzar les seqüents proves:

- medi de Kligler
- agar de lisina i ferro
- fermentació de la glucosa amb producció de gas
- prova de l'oxidasa







b.- Identificació definitiva:

- sensibilitat al compost Vibriostàtic 0/129
- creixament en aigua peptonada sense ClNa i amb ClNa al 13%
- prova de Voges-Proskauer
- prova del Indol
- producció de Beta-galactosidasa, lisina descarboxilasa, ornitina descarboxilasa i arginina dihidrolasa.
- aglutinació de antiseros monovalents d'anti V.cholerae



## B. - Identificació definitiva

- sensibilitat al camp elèctric 0-127
- creixement en altes condicions sense CINA i amb CINA al 13%
- prova de vides-prolongues
- prova del Indol
- producció de beta-carboxilats, fins a decarboxilats
- ermita ascarboxilats i ermita dimethylats
- adaptació de ermites novament d'anti V. cholerae



## METODE DEL RECOMPTE EN PLACA

Un cop passat el temps d'incubació es compten les colònies que s'han desenvolupat en cada una de les plaques tenint en compte les següents consideracions:

- Per fer el recompte es seleccionarà aquella placa que continui entre 30 i 300 colònies, descartant les altres.
- Si són varies les que es troben en aquest interval es comptaran totes i com a resultat es donarà la suma total del nombre de colònies referit a la suma dels volums reals de mostra sembrats a cada placa.
- Si cap placa està dins l'interval considerat es pendrà el valor més pròxim a qualsevol dels dos extrems, en aquest cas els resultats es donaran com aproximats, excepte en els casos de sèmres de mostra directe on s'efectuarà, també, el recompte de plaques amb menys de 30 colònies.

resultats equivalents:

a.- De les xifres anotades anteriorment, s'agafa un triplet, tres xifres consecutives, de manera que la última xifra sigui zero. Obtenir per mitjà de la suma del 111 el valor del triplet seleccionat. Multiplicar aquest valor per l'invers del valor de la dilució que correspon a la incubació central del triplet considerat. Aquest resultat correspon a la concentració de microorganismes en 1ml de mostra.



## MÉTODE DEL RECOPTE EN PLACA

Un cop passat el temps d'incubació es compten les colònies que s'han desenvolupat en cada una de les plaques tenint en compte les següents consideracions:

- Per fer el recopte es seleccionaran aquelles plaques que continguin entre 20 i 200 colònies, descartant les altres.

- Si són diverses les que es troben en aquest interval es comptaran totes i com a resultat es donarà la suma total del nombre de colònies referit a la suma dels volums reals de mostra sembrats a cada placa.

- Si cap placa està dins l'interval considerat es pondrà el valor més proper a qualsevol dels dos extrems. En aquest cas els resultats es donaran com aproximats, excepte en els casos de recopres de mostra directa on s'estimarà, també, el recopte de plaques amb menys de 20 colònies.



## MÈTODE DEL NOMBRE MÉS PROBABLE (NMP)

Després del temps d'incubació de cada microorganisme, es fa la lectura dels resultats. El procés de valoració és el següent:

1.- Anotar per cada sèrie de tres tubs, els nombre dels considerats com a positius, seguint l'ordre d'esquerra a dreta serà:

- La primera xifra és la corresponent al nombre de tubs positius de la inoculació feta amb 10ml de mostra.
- La segona xifra correspon al nombre de tubs positius en la inoculació feta amb 1ml de mostra.
- Així successivament fins arribar a anotar la sèrie de dilucions realitzada.

2.- Per obtenir el NMP es podran seguir dos mètodes que donen resultats equivalents:

a.- De les xifres anotades anteriorment, s'aqafa un triplet, tres xifres consecutives, de manera que l'última xifra sigui zero. Obtenir per mitjà de la taula del NMP el valor del triplet seleccionat. Multiplicar aquest valor per l'invers del valor de la dilució que correspon a la inoculació central del triplet considerat. Aquest resultat correspon a la concentració de microorganismes en 100ml de mostra.



## MÉTODE DEL NOMBRE MÉS PROBABLE (NMP)

Després del llistat d'incubació de cada microorganisme, es fa la lectura dels resultats. El procés de lectura és el següent:

- 1.- Anotar per cada sèrie de tres tubs, els nombres dels considerats com a positius, seguint l'ordre d'aparició a l'ordre de la sèrie.
- 2.- La primera sèrie és la corresponent al nombre de tubs positius de la inoculació feta amb 10ml de mostra.
- 3.- Les segones sèries corresponen al nombre de tubs positius en la inoculació feta amb 1ml de mostra.
- 4.- Així successivament fins arribar a anotar la sèrie de difusions resultants.

2.- Per obtenir el NMP es podran seguir dos mètodes que donen resultats equivalents:

- a.- De les sèries anotades anteriorment, s'aporta un triplot, tres sèries consecutives, de manera que l'última sèrie sigui zero. Obtenir per mitjà de la taula del NMP el valor del triplot seleccionat. Multiplicar aquest valor per l'invers del valor de la difusió que correspon a la inoculació central del triplot considerat. Aquest resultat correspon a la concentració de microorganismes en 100ml de mostra.



2.- De les xifres anotades agafar un triplet de manera que la xifra següent al triplet sigui zero i prosseguir seguint el mateix procés que el cas a/.

TAULA DEL NMP

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







REFERENCIES D'ALGUNS MEDIS DE CULTIU DESHIDRATATS  
COMERCIALITZATS

- Agar Sabouraud Glucosat:

EBL 11584

Difco 0109

Merck 5437

- Medi pel recompte total de colònies:

BBL 11636

Difco 0479

Merck 1621

- Caldo Lactosat per Colimetria:

BBL 11558

Difco 0227

- Medi de Rothe per Estreptomètria:

BBL 11000

Difco 0442

Merck 1590

- Medi de Litsky:

BBL 11226

Difco 0442

Merck 1590



REFERENCIES D'ALGUNES MEDIS DE CULTIU DESHIDRATATS  
COMERCIALITATS

|                                      |       |       |
|--------------------------------------|-------|-------|
| - Avar Sabouraud Bincocast           |       |       |
| 11284                                | 11284 | 11284 |
| 0109                                 | 0109  | 0109  |
| 2437                                 | 2437  | 2437  |
| - Medel del recanó total de colónies |       |       |
| 11234                                | 11234 | 11234 |
| 0439                                 | 0439  | 0439  |
| 1421                                 | 1421  | 1421  |
| - Caldo lactat per Coliforms         |       |       |
| 11226                                | 11226 | 11226 |
| 0237                                 | 0237  | 0237  |
| - Medel de Rotne per Escherichias    |       |       |
| 11000                                | 11000 | 11000 |
| 0442                                 | 0442  | 0442  |
| 1290                                 | 1290  | 1290  |
| - Medel de Listeria                  |       |       |
| 11226                                | 11226 | 11226 |
| 0442                                 | 0442  | 0442  |
| 1290                                 | 1290  | 1290  |







- Hedi de Kijder

88L

01137 0086

Herck 1345

- Hedi de Binnens

88L

0091 0091

Herck 2201

- Hedi de Binnens TGT

88L

0422 11702

Herck 8471



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ARAUJO, R.M., 1987 - Los Fenómenos de Producción en la Contaminación del Agua - Tesi Doctoral. Barcelona.
- 2.- BERG, G., 1978 - Indicators of Viruses in Water and Food - Ed. G. Berg. Ann. Arbor Science. Ann. Arbor, MI
- 3.- GUINEA, J., SANCHO, J. I PARÉS, R., 1979 - Análisis Microbiológicos de las Aguas - Ed. Omega, Barcelona.
- 4.- HOADLEY, A.W. and DUTKA, B.J., 1977 - Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water - American Soc. for Testings and Materials, Filadelfia.
- 5.- Informe - L'Anàlisi Microbiològica de les Aigües de Consum - Generalitat de Catalunya. Barcelona, 1985.
- 6.- Informe - La Qualitat de les Aigües Litorals - Generalitat de Catalunya. Barcelona, 1983.
- 7.- RIPPEY, S.R. and CABELLI, V.J., 1979 - Membrane Filter Procedure for Enumeration of *Aeromonas hydrophila* in Fresh Waters - Appl. Environ. Microbiol. 38:108-113.
- 8.- RODIER, J., 1981 - Análisis de la Aguas - Ed. Omega, Barcelona.
- 9.- TARTERA, C., 1986 - Estudi dels Bacteriòfags de *Bacteroides fragilis* com a Indicadors de la Contaminació Fecal Virica - Tesi Doctoral, Barcelona.



- 1.- ORAÑO, R.M., 1987 - Los Fenómenos de Producción en la Contaminación del Agua - Tesis Doctoral, Barcelona.
- 2.- BERG, G., 1978 - Indicators of Viruses in Water and Food - Ed. G. Berg, Ann. Arbor Science, Ann. Arbor, MI.
- 3.- GUINÉE, J., SANCHEZ, J., I. FERRAS, R., 1979 - Análisis Microbiológico de las Aguas - Ed. Omega, Barcelona.
- 4.- HODGLEY, A.W. and DUTKA, B.D., 1977 - Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water - American Soc. for Testing and Materials, Philadelphia.
- 5.- Informe - L'Anàlisi Microbiològica de les Aigües de Consum - Generalitat de Catalunya, Barcelona, 1982.
- 6.- Informe - La Qualitat de les Aigües Lliures - Generalitat de Catalunya, Barcelona, 1983.
- 7.- RIPPET, S.R. and CABELLI, G.J., 1979 - Membrane Filter Procedure for Enumeration of Aerobic Microbes in Fresh Water - Appl. Environ. Microbiol. 38:108-113.
- 8.- RODIER, J., 1981 - Análisis de las Aguas - Ed. Omega, Barcelona.
- 9.- TARTER, C., 1986 - Estudi dels Bacteriòfags de Bacteriòfages crelles com a Indicators de la Contaminació Local Vítica - Tesis Doctoral, Barcelona.



