

## IDENTIFICACION DE BACTERIAS COLIFORMES.

POR LA Q.B.P. HERMINIA MARTINEZ RODRIGUEZ

Como miembros del grupo coliforme se incluyen los bacilos - aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, Gram negativos que fermentan la lactosa con producción de gas en - 48 horas a 35°C.

Las bacterias incluidas en esta definición serían: Escherichia coli, Aerobacter aerogenes y formas intermedias.

Se considera que E. coli es habitante normal del intestino de animales de sangre caliente y que su presencia en una muestra de agua indicaría contaminación de origen fecal. En tanto que, Aerobacter aerogenes, es también habitantes del intestino pero es frecuente encontrarlo en suelo, vegetales y en el agua aún en casos en que es poco probable relacionar su presencia con contaminación con heces fecales. Algunos autores piensan que E. coli es el verdadero coliforme fecal.

Los bacilos coliformes han sido grandemente usados como indicadores bacterianos de contaminación fecal, la cual a su vez se utiliza para determinar la calidad sanitaria del agua.

La presencia de coliformes en el agua establecería la probabilidad de encontrar en ella bacterias patógenas intestinales. Cabe aclarar que la sola presencia de coliformes no asegura la presencia de patógenos, pero que entre mayor sea el número de coliformes mayor probabilidad habrá de encontrar patógenos intestinales en el agua.

Existen varias razones por las que los coliformes pueden actuar como indicadores:

- 1.- Se encuentran en número relativamente grande en los desechos.
- 2.- Los métodos para detectar su presencia se llevan a cabo con mayor facilidad que los métodos necesarios para detectar patógenos.
- 3.- Sobreviven en el agua por un tiempo algo mayor que los patógenos intestinales.
- 4.- Los procesos de purificación que causan su eliminación o destrucción generalmente son igual de efectivos contra los patógenos.

La principal característica usada para identificación de coliformes es la fermentación de la lactosa con producción de gas y para la diferenciación de los coliformes se utilizan pruebas bioquímicas de las cuales las mas importantes son: las reacciones del IMViC que son (formación de indol a partir de triptofano, detección de la producción de ácido a partir de glucosa usando como indicador el rojo de metilo, la formación de acetil-metil-carbinol como producto intermedio del metabolismo de la glucosa que se observa usando la reacción de Voges-Proskauer y la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono); el crecimiento en medio de KCN y la utilización de malonato y gluconato.

#### PRUEBAS PARA IDENTIFICAR COLIFORMES.

Existen varios métodos utilizados para la detección de coliformes en el agua y los mas comunes son: la prueba presuntiva, la prueba confirmatoria, la prueba completa, el NMP -

(número mas probable) de coliformes y la técnica de filtro membrana.

PRUEBA PRESUNTIVA.- Se basa en la formación de gas a partir de la lactosa, esta prueba utiliza tubos de fermentación o tubos de Durham invertido dentro de tubos de ensaye conteniendo un medio de cultivo que puede ser caldo lactosado o caldo de lauril triptosa. Estos tubos serán inoculados con volúmenes de muestra que pueden ser variables utilizándose comunmente múltiplos o submúltiplos de 1 ml. (frecuentemente se usan 10, 1 y 0.1 ml. de muestra). La concentración del medio de cultivo podrá variar de acuerdo al volumen del inóculo. Los tubos ya inoculados se incuban a 35°C y se chequea si hay producción de gas a las 24 y a las 48 horas. Si a las 24 horas de incubación hay formación de gas (o sea aparición de burbujas tanto en el tubo invertido como desprendimiento de pequeñas burbujas en todo el medio de cultivo) la prueba presuntiva es positiva, si no hay formación de gas deberá incubarse otras 24 horas, si el medio se conserva todavía sin burbujas la prueba es negativa y si éstas ya se han formado la prueba es positiva. Ocasionalmente se podrán observar burbujas que no correspondan a la formación de gas por lo cual hay que cerciorarse de que el caldo muestra crecimiento bacteriano lo cual se puede saber por la turbiedad que presentan los tubos positivos de la prueba.

Como otras bacterias también forman gas a partir de lactosa (Clostridium y Streptococcus) es necesario hacer la PRUEBA CONFIRMATORIA.- Esta prueba también utiliza la fermentación

de la lactosa pero usando medios de cultivo que permiten selectivamente el desarrollo de coliformes, o sea que inhiben el desarrollo de otros microorganismos. Los medios de cultivo usados son: caldo lactosado con verde bilis brillante o placas en agar de Endo o eosina azul de metileno agar (EMB).

La prueba con caldo lactosado y verde bilis brillante utiliza también tubos de Durham invertidos dentro de un tubo de ensaye. Se inocula un tubo de estos a partir de cada tubo positivo de la prueba presuntiva y se incuba a  $35^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 3$  horas. La formación de gas constituye una prueba confirmatoria positiva.

La prueba con agar Endo o con EMB se hace en placa. Estas placas se siembran por estría a partir de cada uno de los tubos de fermentación primaria positivo. Las placas inoculadas se incuban por  $24 \pm 2$  horas a  $35^{\circ}\text{C}$ . Las colonias obtenidas pueden ser rojas, nucleadas con o sin brillo metálico que son colonias típicas de coliformes, o pueden ser opacas, grandes, mucoides, anucleadas de color rosa y se consideran atípicas aunque algunos coliformes pueden dar este tipo de colonias algunas veces y todas las demás colonias se consideran negativas. Si aparecen colonias típicas la prueba es positiva, si solo hay colonias atípicas deberá hacerse la prueba completa y si no hay colonias tipo coliformes la prueba es negativa.

**PRUEBA COMPLETA.**- De las colonias típicas obtenidas en las placas de agar Endo y EMB se siembra en tubos de fermentación secundaria con caldo lactosado y además un tubo con

agar inclinado y se incuban a  $35^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas o por  $48 \pm 3$  horas. La formación de gas en los tubos de caldo lactosado y la observación de bacilos Gram negativos, no esporulados en una tinción hecha al crecimiento bacteriano obtenido en los tubos de agar inclinado se toman con una prueba completa positiva.

Cuando esta prueba se va a hacer a tubos positivos de caldo lactosado con verde bilis brillante, primero debe sembrarse en placas de EMB o Endoagar y de las colonias obtenidas ahí tomar para la prueba completa.

**NMP DE COLIFORMES.**- Esta técnica proporciona un cálculo aproximado del número de coliformes en una muestra de agua. Se utilizan 3 series de tubos con tubos de Durham invertidos y con caldo lactosado, cada serie puede ser de 3 o 5 tubos.

Estas series se inoculan con diferentes cantidades de la muestra cada una (por ejemplo la primera con 10 mls. cada tubo, la segunda con 1 ml. y la tercera con 0.1 ml.) y se incuba a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 horas y se checa la producción de gas. La serie que tiene mayor volumen de inóculo puede tener medio de cultivo de doble concentración. Del número de tubos positivos en cada serie resultará un número (por ejem. en la 1a. serie 4 tubos positivos, en la segunda 3 y en la tercera 2, el número será 432) que deberá llevarse a tablas ya elaboradas que nos darán el NMP de coliformes (en el ejemplo anterior el NMP sería de 39 coliformes por 100 mls.).

Esta técnica podrá estar sujeta a variaciones en cuanto a volumen de inóculo, en aguas puras la primera serie podrá inocularse con 100 ml., la segunda con 10 ml. y la tercera con 1 ml. y el NMP obtenido se multiplicará 0.1; por el contrario si el agua está muy contaminada se puede sembrar la primera serie con 1 ml., la segunda con 0.1 y la tercera con 0.01 ml. y el NMP se multiplicará por 10.

Los valores obtenidos por esta técnica son algo mas elevados que los que resultan de la cuenta por la técnica del filtro membrana.

TECNICA DE FILTRO MEMBRANA.- Se utiliza una membrana que tenga capacidad de retener todas las bacterias. Esta membrana filtrante se coloca en una unidad de filtración y se hace pasar por ella un volumen determinado del agua que se va a examinar, luego se retira la membrana filtrante y se coloca en una caja de petri con una almohadilla absorbente que previamente se han humedecido con el medio de cultivo (puede usarse caldo de Mac Conkey o de Endo) y se incuba por  $20 \pm 2$  horas en incubadora con humedad o en baño maría y se hace el recuento. Como coliformes solo se tomarán en cuenta las colonias - oscuras que pueden mostrar brillo metálico en toda la colonia o en el centro.

El volumen de muestra filtrada variará según el tipo de agua analizada. Todo el material utilizado deberá ser convenientemente esterilizado.

Se preferirá que las membranas filtrantes esten reticuladas y en este caso se colocarán con la retícula hacia arriba durante el desarrollo de la técnica. Así mismo el material no deberá contener sustancias que puedan actuar como inhibidores del desarrollo bacteriano.

Para distinguir entre coliformes de origen fecal y de otras fuentes se han usado técnicas que se basan en la capacidad de los coliformes fecales de fermentar la lactosa a  $44.5^{\circ}\text{C}$ .

Las pruebas para coliformes fecales pueden hacerse por la técnica de filtro membrana o por los tubos de fermentación.

Para la técnica del filtro membrana se sigue el mismo procedimiento mencionado anteriormente pero la temperatura de incubación se eleva a  $44.5^{\circ}\text{C}$ .

La técnica de los tubos múltiples generalmente se hace de la siguiente manera:

De todos los tubos positivos en la prueba presuntiva se toma una muestra con una asa de inoculación y se siembran tubos con medio E.C. los tubos inoculados se incuban a  $44.5^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 2$  horas.

Con la temperatura de incubación constituye aquí un factor clave es necesario tenerla bien controlada y esto se logra incubando un baño de agua de temperatura constante.

Es muy importante que la temperatura no varié mas de  $0.2^{\circ}\text{C}$  por que hay cepas de Escherichia que no producen gas cuando la temperatura varía a más de  $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ .