PRÁCTICA 1.

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS COLIFORMES TOTALES POR EL MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP).

1. PREPARACIÓN DE MEDIOS

**INTRODUCCIÓN**

La determinación de microorganismos coliformes totales por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a 35°C ± 1°C durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares. Esta determinación consta de dos fases, la fase presuntiva y la fase confirmativa.

En la fase presuntiva el medio de cultivo que se utiliza es el caldo lauril sulfato de sodio el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono. Durante la fase confirmativa se emplea como medio de cultivo caldo lactosado bilis verde brillante el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares como el verde brillante.

La búsqueda de Escherichia coli se realiza a partir de los tubos positivos de caldo EC, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales (Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.

OBJETIVO

Comprender el fundamento de la preparación de medios de cultivo específicos y selectivos líquidos (caldo) y preparar todos los medios requeridos para la determinación de coliformes por el método del NMP en su fase presuntiva y confirmativa.

MATERIALES Y REACTIVOS.

1. Materiales.
	* 4 Vasos de precipitado (2 de 50, 1 de 250 y 1 de 500 mL).
	* 1 Espátula.
	* 2 Probetas (1 de 10 ml y 1 de 100 mL).
	* 1 Agitador magnético mediano.
	* 6 Tubos de cultivo de vidrio con tapa rosca.
	* 6 Campanas de Durham.
	* 3 Pipetas de vidrio (1 de 5 y 2 de 10 mL).
	* 1 Matraz Erlenmeyer (250 mL).
	* 1 Gradilla
2. Reactivos
* Caldo lauril sulfato de sodio.
* Caldo lactosa bilis verde brillante.
* Agua peptonada al 0.1% (200 mL).
* Etanol.
* Agua destilada.
1. Equipos
* Balanza analítica.
* Placa de calentamiento y agitación.
* Autoclave.
* Potenciómetro.

**PROCEDIMIENTO.**

1. Se pesa la cantidad de polvo para el volumen de medio que se desee preparar.
2. En un matraz Erlenmeyer, al medio de cultivo se le añade el volumen de agua indicado, se ajusta el pH de ser necesario, y se calienta en una placa de calentamiento, agitando el medio con agitador magnético, hasta el aclaramiento del mismo.
3. El medio aclarado se dispensa en tubos de cultivo a razón de 10 mL de medio por tubo; a cada tubo se le agrega, una campana de Durham, de tal forma que no entren burbujas en ella, y se esterilizan por autoclave.
4. Una vez esterilizado y enfriado el medio, éste se lleva a prueba de esterilidad, que consiste en incubar los tubos con el medio a 37 grados Celsius durante 6-8 h o toda la noche, y verificar, pasado el tiempo, si no hay contaminación en el medio.
5. Al terminar la prueba de esterilidad, se guardan los cultivos no contaminados a 4 grados Celsius hasta que se vaya a realizar el ensayo de determinación de NMP.

**REFERENCIAS**

Nom, N. O. M. (2000). 127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización, 13.

Ortiz, B., Cano, F., & de Miranda, T. A. (2015). Desarrollo de una metodología sencilla para establecer la presencia de coliformes en agua de consumo humano y su correlación con el método de fermentación de tubos múltiples (NMP). Revista Científica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, 13(1).

Rivera-Vázquez, R., Palacios-Vélez, Ó. L., Chávez Morales, J., Belmont, M. A., Nikolski-Gavrilov, I., DE LA ISLA DE BAUER, M., ... & Carrillo-Gonzalez, R. (2007). Contaminación por coliformes y helmintos en los ríos Texcoco, Chapingo y San Bernardino tributarios de la parte oriental de la cuenca del Valle de México. Revista internacional de contaminación ambiental, 23(2), 69-77.