PRÁCTICA 2.

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

1. FASE CONFIRMATIVA

**INTRODUCCIÓN**

El grupo de coliformes fecales, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a 44.5 ± 0.1°C. Este grupo no incluye una especie determinada, sin embargo la más prominente es *Escherichia coli.* La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales. *Escherichia coli* es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia *Enterobacteriaceae* (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas. Estas se clasifican con base en las características que presentan sus factores de virulencia únicos, cada grupo provoca enfermedad mediante un mecanismo diferente. Se sabe que sus propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes s

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 determinación del número más probable de microorganismos coliformes fecales se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de 44.5 ± 0.1°C por un periodo de 24 a 48 h. Finalmente, 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

Confirmar la presencia de bacterias coliformes en muestras alimentarias diversas.

MATERIALES Y REACTIVOS.

1. Materiales.
   * 4 Gradillas (1 por equipo).
   * 8 Tubos con rosca (2 por equipo).
   * 8 campanas durham (2 por equipo)
   * Micropipeta de 1 mL.
2. Reactivos

* Caldo lactosa bilis verde brillante.
* Etanol.
* Agua destilada.

1. Equipos

* Balanza analítica.
* Campana de flujo laminar.
* Autoclave.
* Placa de calentamiento con agitación.

**PROCEDIMIENTO.**

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo Lactosa Bilis Verde Brillante con campana Durham.
2. Incubar durante 48 ± 3 h a 35 ± 0.5 °C.
3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.

**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.