

En el curso 2007-2008, cursando 2º de Bachillerato, en La Anunciata Ikastetxea, de Donostia, en la modalidad de Ciencias de la Naturaleza, nos hemos



**FOTO 1.** Recogida de agua en el punto de muestreo 3.

propuesto llevar a cabo un proyecto de investigación dentro del campo de Medio Ambiente y que a su vez tenga relación con nuestro entorno.

En primer lugar se buscó un tema acorde con nuestros intereses. Nos decidimos por el tema de la investigación de los microorganismos del Molinao Erreka. Tras esto, se lo comunicamos a nuestro coordinador

el cual estuvo de acuerdo con el tema elegido, y nos ayudó a enfocar correctamente el trabajo.

Se comenzó el trabajo buscando información sobre la presencia de diferentes microorganismos patógenos en el agua y sobre la ley vigente al respecto. (Ver **ANEXO 3**). Después de esto realizamos una ficha de campo en la que se iban a recoger los datos relacionados con la calidad del agua de los puntos de muestreo (Ver **ANEXO 1**).

Establecimos tres puntos de muestreo, el primero para analizar la influencia de los vertidos de lixiviados del vertedero R.S.U. de San Marcos en la regata; el segundo antes de un polígono industrial; y por último la tercera zona la situamos tras la zona industrial y urbana del barrio de Molinao (Ver **ANEXO 2**).



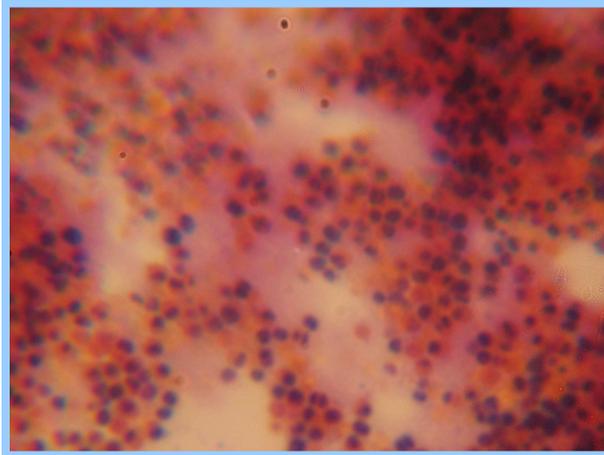
**FOTO 2.** Realización de la prueba de oxígeno disuelto.

Los parámetros analizados fueron de tres tipos:

- Parámetros físicos: pH, temperatura, turbidez, dureza total, etc.
- Parámetros químicos: nitritos, nitratos, amonio, salinidad, etc.

- Parámetros microbiológicos: *Vibrio sp*, coliformes totales, *Salmonella sp*, bacterias Gram + y Gram -, etc.

En primer lugar se estudiaron algunos de los parámetros físicos y químicos



**FOTO 3.** Tinciones de Gram – y Gram +.

“in situ”, pero completamos esta información con pruebas más completas en el laboratorio y nos valimos de todas ellas para comprobar cual era la calidad del agua.

Por otro lado, se realizaron cultivos de microorganismos en distintos medios para de esta forma analizar los microorganismos presentes en esta

regata. Para ello usamos un total de 4 medios de cultivo, Levine EMB Agar, Agar VRB, MacConkey Agar y Agar TCBS.

Esta actividad de recogida de datos se realizó 5 veces en 5 semanas consecutivas y posteriormente se comparó la calidad de agua en cada uno de los puntos de muestreo teniendo en cuenta la cantidad de colonias de microorganismos recogidas.

Además, se analizaron los microorganismos existentes en la piel y la boca de peces de la zona **3**. Para este análisis se realizó la pesca de varios corcones en 2 fechas distintas, durante marea alta, que coinciden con el análisis realizado de microorganismos patógenos del agua para el posible contraste de datos. Para este estudio se tomaron muestras con una turunda de la boca y la piel del cuerpo de cada pez y se esparcían en los diferentes medios de cultivo. Se empleaban dos placas de cada agar por cada zona del pez analizada.



**FOTO 4.** Medios de cultivo utilizados.

Contrastando también el entorno se llegó a ciertas

conclusiones sobre el estado del río y se pudieron ofrecer algunas soluciones para mejorar la calidad del agua.

Tras todo este trabajo se procedió a la redacción de un proyecto final, en el que se recogió toda la información, datos, conclusiones y soluciones obtenidos.

Mediante este trabajo además, se pudo comprobar el efecto del vertedero R.S.U. de San Marcos y la zona urbana e Polígono industrial del barrio de Molinao en la calidad del cauce fluvial, especialmente en la presencia de microorganismos patógenos.

## **1. MEDIOS DE CULTIVO.**

### **1.1. Agar EMB Levine.**

Medio adecuado para la búsqueda y diferenciación de bacilos entéricos, a partir de muestras clínicas, aguas servidas, y otros materiales.

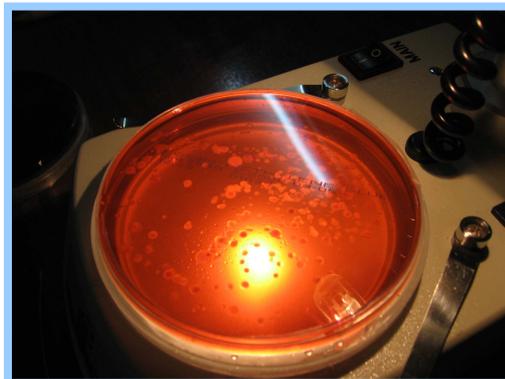
Es recomendado por la American Public Health Association, para el análisis microbiológico de productos lácteos y alimentos, y por la USP para la realización de los ensayos límite microbiológicos.

La fórmula original de este medio de cultivo, fue modificada por Levine, eliminando la sacarosa e incrementando la concentración de lactosa, lo que permite una mejor diferenciación de *E. coli*.

Es un medio selectivo y diferencial, adecuado para el crecimiento de enterobacterias.

La combinación utilizada de eosina y azul de metileno, inhibe el desarrollo de microorganismos Gram positivos y de bacterias Gram negativas fastidiosas, y también, permite diferenciar bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa.

Los microorganismos fermentadores de lactosa, originan colonias de color azulado-negro, con brillo metálico. Las colonias producidas por microorganismos no fermentadores de lactosa son incoloras. Algunas bacterias Gram positivas (cepas de estafilococos, enterococos) y levaduras, pueden crecer, originando colonias incoloras y



**FOTO 5.** Levine EMB Agar.

puntiformes.

Este medio de cultivo, es útil para la orientación y no confirmación de especies bacterianas (ya que numerosas cepas de *Citrobacter spp.* producen colonias con brillo metálico), por lo cual será necesario realizar pruebas bioquímicas, para la identificación de género y especie.

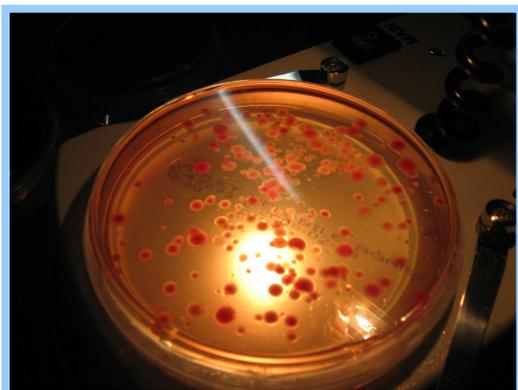
Medio preparado: color púrpura con tonos verdosos, ligeramente opalescente con un precipitado floculento disperso.

Resultados:

Microorganismos	Características de las colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Verdosas con brillo metálico y centro negro azulado
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Mucosas, rosa púrpura, confluentes
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Incoloras
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Incoloras, pequeñas, puntiformes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras

La esterilización del medio de cultivo reduce el azul de metileno al color naranja. El color púrpura se restaura por agitación. La presencia de un precipitado en el medio esterilizado es normal y no debe ser removido, ya que es parte esencial del mismo.

## 1.2. Agar VRB.



**FOTO 6.** Agar VRB.

Agar selectivo para la demostración y enumeración de bacterias coliformes, especialmente *Escherichia coli* según Davis (1951) en agua, leche, helados, carnes y otros alimentos. Puede contener MUG optativamente.

El violeta cristal y las sales biliares inhiben el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva. La

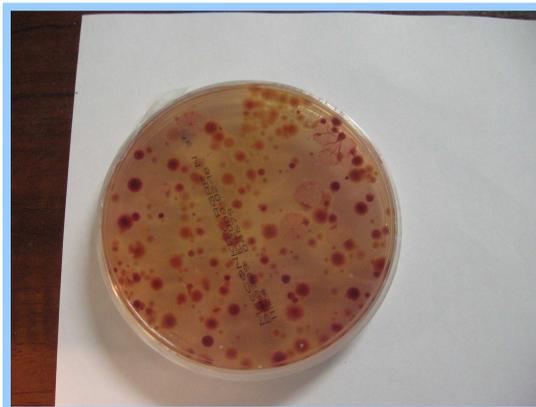
degradación de la lactosa a ácido por la *E.coli* se pone de manifiesto por el viraje al rojo del indicador Rojo Neutro.

Las bacterias coliformes lactosa positivas incluyendo la *Escherichia coli* se manifiestan como colonias rojas rodeadas de un precipitado rojizo con un tamaño de 1 a 2 mm. En el medio con MUG las colonias de *E.Coli* se observan fluorescentes con una lámpara de UV de onda larga. Los *Enterococos* y *Klebsiellas* aparecen en este medio como colonias muy pequeñas (cabeza de alfiler) de color rosado. Las *enterobacteriáceas* lactosa negativas aparecen incoloras transparentes.

### 1.3. MacConkey Agar.

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no, lactosa en muestras clínicas, de agua y alimentos. Todas las especies de la familia *Enterobacteriaceae* desarrollan en el mismo.

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva.



**FOTO 7.** MacConkey Agar.

Resultados:

Microorganismos	Colonias
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Rojas con halo turbio
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Rosadas mucosas
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Incoloras, transparentes
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Incoloras, transparentes
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Incoloras, transparentes
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Diminutas, incoloras, opacas

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

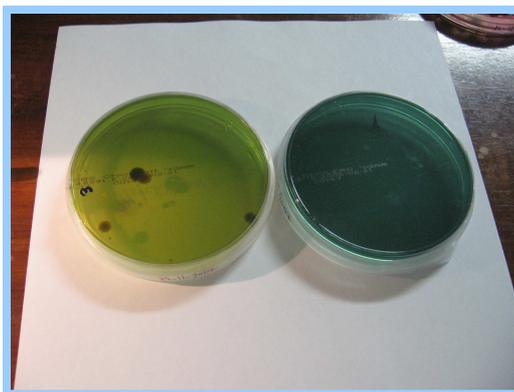
Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

El medio preparado es de color rojo púrpura.

#### **1.4. Agar TCBS.**

Agar Tiosulfato, Citrato, Bilis, Sacarosa fue propuesto por Nakanishi 1962 y modificado por Kobayashi 1963 para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros *Vibrios* enteropatógenos . Según Kampelmacher et al. 1969 este medio es recomendable para el aislamiento del *Vibrio parahaemolyticus* en pescados.

La alta concentración de tiosulfato y citrato, más la alcalinidad del medio inhiben el crecimiento de las enterobacteriáceas. Las sales biliares inhiben la flora Gram positiva acompañante. Los indicadores Azul timol y Azul de bromotimol viran al amarillo en presencia de ácido.



**FOTO 8.** Agar TCBS.

La presencia de *Vibrio cholerae* y otros *Vibrios* enteropatógenos se visualizan en este medio por colonias planas, amarillas, de 2 a 3 mm de diámetro.

El *Vibrio parahaemolyticus* presenta colonias pequeñas con centro azul-verdoso. *Pseudomonas*, *Aeromonas*, y otros se presentan con colonias azul-oscuro. Las enterobacteriáceas se visualizan como colonias muy pequeñas y traslúcidas.

## **2. REALIZACIÓN DE CULTIVOS DE MICROORGANISMOS.**

En la realización de cultivos se usaban pipetas esterilizadas y se hacía el cultivo junto al fuego para evitar la posible contaminación de los Agares y para garantizar la fiabilidad de la prueba.

En primer lugar, se tomaba una muestra de agua de los botes recogidos en cada punto de muestreo y se agregaban 0,2 ml de ella en cada Agar. A



**FOTO 9.** Recogida de la muestra de agua para la realización de la siembra.

continuación, con el asa de Digrasky se esparcía la muestra uniformemente por toda la placa y se procedía a sellarla con parafilm. Tras esto, las placas se mantenían a 37° C durante 24 horas en la incubadora para el posterior recuento de colonias, tras el crecimiento de las mismas. De esta forma se podía determinar el Ufc/ml en cada medio de cultivo.

Todas las cifras eran recogidas en tablas para realizar medias y obtener las conclusiones pertinentes.

**FOTO 10.** Siembra en el Agar TCBS.

