

543.3
C/1
C.2

E.S.P. BIBLIOTECA

ESCUELA SUPERIOR DEL PROFESORADO

"FRANCISCO MORAZAN"

DEPARTAMENTO DE FORMACION TECNICA Y DOCENTE

SECCION: CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOLOGIA Y QUIMICA

PROMOCION: "PROFESOR VICENTE CACERES"

Profesores Asesores: Dr. GILBERTO S. PADILLA

Dra. JULIA BUSTILLO

ANALISIS BACTERIOLOGICO DEL AGUA DE LA COLONIA TOROCAGUA

TESIS

PRESENTADA POR LA ALUMNA

Olga Marina Mendoza de Cáliz

PREVIA OPCION AL TITULO DE

Maestra de Educación Media en Biología y Química

REGUCIGALPA, D. C.

HONDURAS, C. A.

DICIEMBRE, 1969

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

mi esposo y a mis hijos.

A todas las personas que de una u otra forma me ayudaron a coronar mi carrera profesional.

OLGA MARINA DE CALIX

o o o

TEMARIO

INTRODUCCION.

Cap. I. RECOLECCION DE UNA MUESTRA:

- a) Autopurificación de las corrientes de agua.
- b) Calidad de las diferentes clases de agua.

Cap. II. MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA BACTERIANA:

- a) Morfología
- b) Tamaño
- c) Estructura de la Célula Bacteriana
- A) Morfología y Estructura de las bacterias predominantes en el agua.
- B) Técnicas Fundamentales para el cultivo de las Bacterias.
- a) Coloración de GRAM
- b) Coloración de ZIEHL NEELSEN
- c) Examen Microscópico de las Bacterias en el agua
- d) Método de Filtro de Membrana.

Cap. III. MEDIOS DE CULTIVO:

- a) Medio Gelosa Sangre
- b) Medio de Kligler - Iron - Agar
 - 1.- Preparación
 - 2.- Procedimiento
 - 3.- Reacción
 - 4.- Fundamentos del Medio.
- c) Medio de SIM.

Cap. IV. PROTOCOLO DE TRABAJO PRACTICO:

- a) Aislamiento de Colonias Coliformes o Colibacilos

b) Identificación de las Bacterias.

Cap. V.- BREVE ESTUDIO DE LA ESCHERICHIA COLI

a) Morfología

b) Características de Cultivo

c) Resistencia

d) Metabolitos bacterianos

e) Función útil

f) Función Patógena

g) Prevención.

RECOMENDACIONES.

BIBLIOGRAFIA.

o o o

INTRODUCCION

El agua es el elemento más indispensable para la vida.

De todos es conocido que las comunidades se han desarrollado cerca de las fuentes de agua. Se ha demostrado por los estudios socio-económicos que el desarrollo económico de las ciudades está en proporción directa con su abastecimiento de agua.

Impurezas del agua: Al condensarse la lluvia en la atmósfera y caer a la tierra, recoge y absorbe polvo y gases como anhídrido carbónico y oxígeno. Inmediatamente que cae en la superficie del suelo, queda expuesta a contaminación por materia orgánica, que puede ser excesivamente peligrosa si contiene excrementos humanos. El agua que cae y es absorbida en el suelo puede filtrarse, en forma natural, al ir cayendo por la gravedad hacia las aguas profundas, y puede o no filtrarse suficientemente para eliminar la contaminación. Por esta razón se puede esperar que el agua de pozos profundos esté libre de bacterias y de materia orgánica. La materia orgánica comprende productos de descomposición de ésta y microorganismos vegetales como algas, hongos y otros agrupados con el nombre de plancton; que frecuentemente originan sabores y olores desagradables en el agua, y, finalmente, bacterias, inocuas en su mayoría, pero que pueden incluir gérmenes patógenos. El agua contaminada con materia orgánica proveniente de animales muertos, puede también producir enfermedades, aún en ausencia de gérmenes patógenos específicos. En tal caso pueden sobrevenir trastornos digestivos y diarreas. El agua cargada de bacterias puede producir en los lactantes y niños pequeños, irritaciones intestinales.

Cuando el agua de consumo está contaminada con heces puede ser

causa de algunas enfermedades, como las siguientes: disentería amibiana, disentería bacilar, cólera, tifoidea, paratifoidea y otras. La entameba histolítica puede penetrar en el conducto digestivo - del hombre por el agua de bebida, contaminada con excrementos humanos. Artigas ha dado la prueba directa de esto aislando del agua - quistes de ameba, ascaris, tricocéfalos y tenia. Para hacer el análisis bacteriológico del agua se investiga si en el agua se encuentra alguna de las bacterias que normalmente habita en las heces. Se puede investigar Escherichia Coli, Clostridium perfringens o enterococos. Se prefiere Escherichia Coli porque siempre está presente en las heces, es fácil de investigar y se calcula que una persona elimina normalmente de 200 a 400 billones de Escherichia Coli por día.

La determinación de colibacilos puede verificarse siguiendo - dos métodos:

1.- Análisis bacteriológico que consta de tres etapas:

Prueba presuntiva, prueba confirmativa, y prueba completa.

2.- Análisis bacteriológico por el Método de filtro de membrana.

CAPÍTULO I

RECOLECCION DE UNA MUESTRA DE AGUA

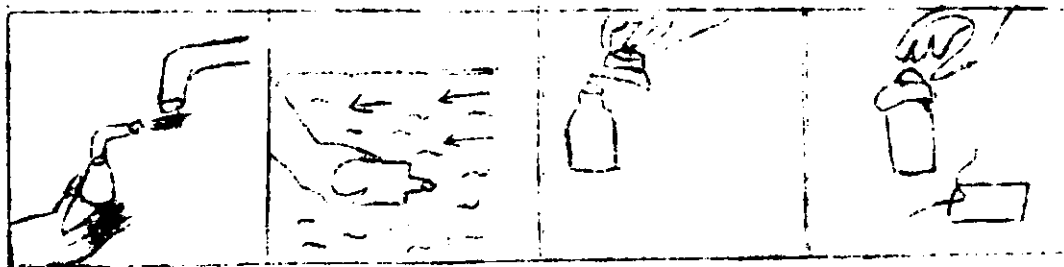
Las muestras para análisis bacteriológico han de ser recogidas en frascos bien lavados, enjuagados en agua limpia y esterilizada.- Si el agua contiene residuos de cloro, se añadirá a cada frasco de 0.02 a 0.05 g. de sulfato de sodio antes de esterilizar al horno.

Ha de procurarse recoger muestras que sean en realidad representantes del agua cuyo análisis se desea, sin que se produzca contaminación al llenar los frascos o en cualquier momento anterior al examen.

En atención a los rápidos y profundos cambios que puedan tener lugar en las muestras embotelladas, incluso conservarse a bajas temperaturas (10°C) es aconsejable realizar el examen, lo más pronto posible después de recogida.

El tiempo transcurrido entre el momento de llenar las botellas y el de realizar el examen, no debe exceder de 6 horas para las aguas impuras y de 12 horas para las relativamente puras. Durante el período de almacenamiento la temperatura ha de mantenerse entre 6° y 10°C .- Debe hacerse constar cualquier transgresión de los requisitos que hemos señalado.

Pasos para recoger las muestras:



a) Autopurificación de las corrientes de agua:

La autopurificación del agua depende de tan numerosos factores, que es imposible decir en cuánto tiempo o en qué distancia se podrá alcanzar un estado particular de purificación. Estos factores son:

La dilución: es más fácil que haya bacilos tifóidicos en un vaso de agua que se toma de una corriente de 4 m^3 por segundo y que recibió la contaminación de las heces de un tifóidico, que el que existen en el agua, tomada de una corriente que lleve 40 m^3 por segundo y en la que se arroja la misma cantidad de material infectante.- Además esta materia orgánica puede ser reducida por el oxígeno y los microorganismos de formas de vida más elevada que se encuentran en la dilución.

La sedimentación: las bacterias, que forman parte de la materia en suspensión, se van al fondo en los remansos de los ríos, dejando libres de impurezas las corrientes.

La contaminación: cuando la contaminación es intensa las bacterias son destruidas por la acción de otras bacterias y del plancton.

La temperatura: las temperaturas bajas permiten subsistir a los microorganismos mucho más que las altas. Se ha comprobado que los bacilos tifóidicos pueden vivir en hielo hasta tres meses.

La luz del sol: es un agente de purificación muy eficaz cuando está cerca de la superficie, pero los rayos activos son rápidamente absorbidos por el agua al ir penetrando hacia

las capas más profundas.

La aereación: En agua altamente contaminada la aereación ayuda mucho al proceso de purificación, proporcionando el oxígeno que necesitan los gérmenes aerobios para satisfacer la demanda bioquímica de este elemento, ejercida por la materia orgánica inestable.

b) Calidad de las diferentes clases de agua:

El agua de lluvia y de la nieve es agua destilada y, cuando menos teóricamente es agua pura. Su pureza depende de lo que arrastre de la atmósfera, en su caída a la tierra.

Agua superficial: es la que arrastran los ríos, riachuelos, estanques, lagos, etc. Siempre es agua peligrosa porque puede estar contaminada con el agua empleada por el hombre.

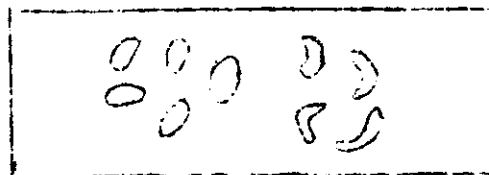
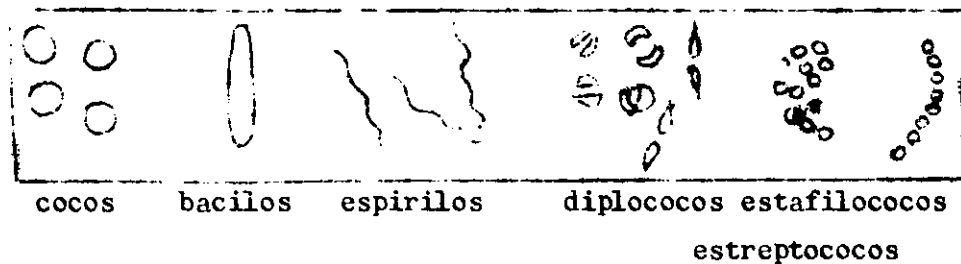
Agua de pozo: es agua pura, siempre que no le caiga tierra o polvo de la superficie o que el pozo tenga grietas.

Las aguas superficiales, mientras no estén contaminadas con heces del hombre o de los animales, no contienen microorganismos patógenos. A veces puede contener algas que le dan mal olor; algunas de estas algas pueden ser dañinas para el ganado. Pueden haber hongos del género *streptomyces* que le dan olor y sabor a tierra.

CAPITULO II

MORFOLOGIA Y ESTRUCTURA BACTERIANA

- a). Morfología y Estructura de la Célula Bacteriana. Hay tres tipos morfológicos fundamentales en las bacterias: esférico, cilindrico y espiriloides, denominados cocos, bacilos y espirilos. También se encuentran formas intermedias por ejemplo ovoideo, cocobacilos, la incurbada y vibrión. Según el modo de agruparse pueden recibir otras denominaciones ya sea que conserven la forma esférica o que sufran alguna deformación, este es el caso de los cocos denominados estafilococos, estreptococos, diplococos, meningococos, gonococo, neumococo.

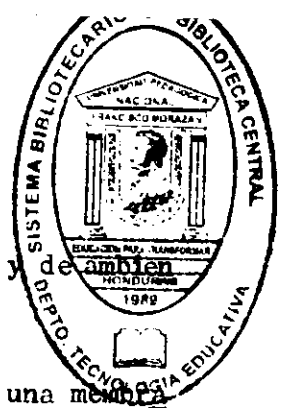


Formas intermedias

cocobacilos - vibriones.

Tamaño.- La unidad de medida en las bacterias es la micra que es igual a 0.001 ml. Los cocos tienen un diámetro igual a 1 micra por término medio.- Los bacilos tienen un tamaño que varía de 0.3 micras a 5 o 6 micras. Los espirilos son más largos, hay algunos de 15 micras.

Pleomorfismo.- Las bacterias pueden sufrir cambios de forma



debido a modificaciones en las condiciones de vida y de ambiente.
te.

Estructura de la Célula Bacteriana.- Una célula es una membrana, organismo unicelular por consiguiente consta de una cubierta exterior llamada pared celular y otra que se retrae con el citoplasma al que permanece adherida, y denominada membrana - citoplasmática.

Protoplasma.- Es la masa homogénea adherida a la membrana citoplasmática y a la pared celular, en el que encontramos el citoplasma y el núcleo, y en el citoplasma unas formaciones - granulares.

Núcleo.- De la existencia del núcleo en la célula estamos seguros pues se ha puesto en evidencia con el microscopio electrónico donde aparece claramente el núcleo, y además las investigaciones bioquímicas demuestran la existencia del ARN en el citoplasma y ADN en el núcleo.

Vacuolas, inclusiones y granulaciones intraprotoplasmáticas.- Con el microscopio electrónico se ha puesto de manifiesto que existen en el protoplasma celular durante el período - de rápido crecimiento o en determinado momento, como reproducción, desintegración o en otras actividades metabólicas.

Cápsula y estrato mucoso.- La mayor parte de las bacterias están cubiertas en condiciones normales, por una capa de sustancia mucosa de alto peso molecular, esta sustancia se concentra en la superficie de la pared celular, algunas veces, formando una especie de halo, que responde a la clásica con-

cepción de cápsula, la que se observa en los neumococos.- Si este material mucoso se presenta en forma de estrato finísimo se trata de estrato mucoso. Esto es de gran importancia en el estudio de la inmunología.

Flagelos.- Los espirilos, vibriones y algunos bacilos poseen movimientos activos los que realizan mediante unos filamentos, dispuestos de modo diverso en torno a su cuerpo, estos son los flagelos, filamentos del citoplasma que se originan en unos pequeños cuerpos redondeados debajo de la membrana. El número y disposiciones de los flagelos varía.

b). Morfología y Estructura de las bacterias predominantes en el agua.

Salmonella.- Produce la tifoidea. Grupo de bacterias frecuentes en los intestinos y por consiguiente en el agua contaminada entre las que encontramos:

Bacilo tífico.- Tiene la forma de un bastoncito de extremos redondeados y de un tamaño que oscila entre 2 y 3 micras de largo por 0.6 por 0.7 de ancho. Esto es en organismos de los enfermos, pero en los cultivos, su morfología varía un poco.- El microscopio electrónico pone de manifiesto la presencia de flagelos.- Es gran negativo, o sea que se deja colorear y presenta el fenómeno de la coloración bipolar. En este grupo encontramos el bacilo tífico, paratífico A, paratífico B y otros.

Shigella.- Disentería, produce el síndrome disentérico. Bacilo disentérico.- Su morfología es análoga a la Salmonella -

pero se diferencia por ser inmóvil, pero está dotado de movimiento browniano, es también gram-negativo.

Colibacilo.- Habita también en el intestino del hombre, estas bacterias se incluyen en el género Escherichia. Su morfología es análoga a los gérmenes intestinales estudiados anteriormente, sólo que es algo más grueso que el bacilo tífico, su forma puede variar y hacerse filamentosos y tomar el aspecto bacilar y cocobacilar según se encuentre en el pus, orina, heces fecales o en cultivos, puede tener movimiento o carecer de él. Toma bien todos los colorantes, en algunas condiciones adopta la coloración bipolar.

c). Técnicas Fundamentales para el cultivo de las bacterias.

Examen en fresco:

Este examen no es amplio respecto a diferenciación de las bacterias, pero nos da a conocer la movilidad o inmovilidad de las mismas.

1.- Coloración de GRAM:

Este método fue ideado por el histólogo danés Christian GRAM (1884), para la coloración de preparaciones histológicas, se aplicó por primera vez en el neumococo.

Procedimiento:

De la resiembra en gelosa sangre obtenemos una gran cantidad de bacterias suficientemente multiplicadas. Buscamos entre las que estén más aisladas, tomamos una de ellas con el asa de platino previamente flameada y enfriada en la orilla del plato de Petri, y la colocamos en una plaquita de vidrio.

Después procedemos a la aplicación de la prueba de la coloración de GRAM.

Fundamentos: de la prueba de GRAM:

Cuando se tratan bacterias por determinados colorantes de la anilina y se fija el color mediante la acción de un mordiente (yodo).- Al tratar después el preparado por alcohol, unas bacterias pierden el color, y otras al contrario lo conservan. En consecuencia, los primeros quedan decolorados y en condición de absorber otro colorante que se agregue después.- Las bacterias que conservan el violeta, después del tratamiento con el alcohol y que por consiguiente quedan coloreadas en violeta se llaman gram-positivas. Las que se decoloran en el primer tiempo y absorben el segundo colorante se teñirán de rojo en caso de usar fushina o safranina y se llaman gram-negativas.

A qué se debe la diferencia de comportamiento que hace posible esta primera clasificación?

- a) Es posible que se deba a la diferencia de permeabilidad de la pared celular ante el complejo alcohol yodo.
- b) Diferente punto isoeléctrico entre las bacterias positivas y negativas en el sentido de producir un mayor grado de retención del color ante un punto isoeléctrico más bajo.

2.- Coloración de ZIEHL-NEESEN.

Es otro método de coloración doble que se hace con frecuencia en el laboratorio.- El procedimiento es el siguiente: se cubre el frotis con la solución de fuchina fenicada de

ZIEHL, y se calienta por debajo del porta con el calor que da el algodón empapado en alcohol y enrollado en el extremo de una varilla de vidrio, hasta la emisión de vapores - (evitar la ebullición). Cuando cesa el desprendimiento de vapores, se vuelve a calentar hasta tres veces.- Verter el colorante y lavar. Cubrir la preparación con alcohol clorídrico (1cc de H Cl y 100 cc de alcohol), agitar suavemente el porta, hasta que arrastre el color y la preparación queda con un ligero tinte rosa.- Lavar, cubrir con la solución de azul de metileno, dejar un par de minutos, lavar bien, secar y observar.

El bacilo tuberculoso y otras bacterias ácido resistente se colorean en rojo vivo, y los que no lo son, así como los demás elementos de la preparación (células, leucocitos, etc.) en azul.

Además de los métodos de coloración que acabamos de exponer, existen otros para poner de manifiesto otros detalles estructurales como esporos, flagelos, cápsulas y granulaciones.

3.- Examen microscópico de las bacterias en el agua.

Para hacer el estudio bacteriológico de un producto - hay que comenzar por el examen microscópico directo. Dicho examen puede hacerse en preparaciones en fresco y en preparaciones coloreadas.

En fresco. Se observan las bacterias vivas, sin colorear, se averigua si la bacteria tiene movilidad, la morfología

logía, espor s. Se utiliza un dispositivo llamado de gota pendiente y un porta objeto especial que tiene una excavación en el centro. El procedimiento es el siguiente: se coloca una gota de la muestra sobre el cubreobjetos; se toma el portaexcavado y se coloca con la cavidad hacia abajo, - encima del cubre, de modo que la gota del material a examinar quede en el centro de la excavación.- Por medio de vaselina se adhiere el cubre al porta y se invierte rápidamente de modo que el cubre quede hacia arriba.

Preparaciones Coloreadas. Su uso es amplio y elemental, supone la muerte y fijación de las bacterias al porta antes de la coloración. Las preparaciones se hacen en los siguientes tiempos:

- 1o. Frotis. Se extiende el material sobre el porta formando una capa fina para que sea transparente y seque con facilidad.
- 2o. Secado, a la temperatura o en el mechero de gas o lamparilla de alcohol.
- 3o. Fijación, adherir primeramente el material al vidrio del - porta, se pasa la preparación por la llama de un mechero 3 o 4 veces.
- 4o. Coloración, se cubre la preparación con la solución colorante, se deja actuar 3 a 4 horas y después se lava con agua corriente o con agua destilada.
- 5o. Secado, con 2 hojas de papel filtro, sin frotar haciendo suaves presiones (puede utilizarse el mechero).

60. Observación y estudio del preparado. Una vez que esté bien seco se coloca sobre él una gota de aceite de cedro y se procede a la observación con lente de inmersión.

Estudio Bacteriológico: Ya que reconocemos la importancia del agua como elemento esencial en la vida, es necesario fijar la atención en algunos aspectos relacionados con el proceso a seguir en el análisis bacteriológico del agua.

El método bacteriológico fundamental es el método de cultivo, por su medio puede el investigador proveerse de pruebas concluyentes respecto a la identificación de los microorganismos presentes, y, por medio de las características de las colonias y ciertas reacciones bioquímicas, hace posible la identificación definitiva de los mismos. Se hacen esfuerzos por descubrir métodos que aceleren el desarrollo de las bacterias, mejorando los medios de cultivo y los métodos de incubación. El método del filtro de membrana (del que se hablará adelante), se puede determinar en el término de 24 horas el grado de contaminación o de potabilidad de varias muestras de agua. Para el examen bacteriológico del agua hemos utilizado el método de Filtro de Membrana, el cual representa un gasto de material elevado, pero con el que se obtienen resultados en un tiempo mucho más corto y con el menor esfuerzo.

4.- Método de Filtro de Membrana:

Los pasos que se siguieron van enumerados a continuación:

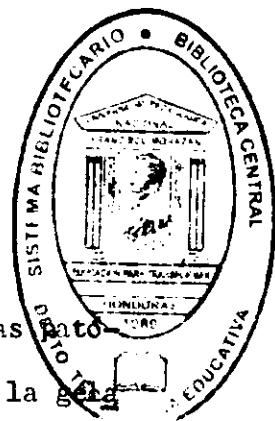
A. Preparación de los cultivos.

- 1.- Preparación de un medio en Endo sobre el cual se colocó un papel filtro.
- 2.- Filtración para aislar en una membrana plástica las bacterias contenidas en la muestra de agua.
- 3.- Incubación, a 37°C durante 18 a 24 horas.
- 4.- Recuento, se encontró una colonia por cada 100cc de la muestra.

B. Resiembra de la colonia encontrada para aislar las bacterias que la forman; y poder así identificarlas ya que las mismas pueden ser patógenas o no.

oOo

CAPTULO III
MEDIOS DE CULTIVO



- a). **GELOSA SANGRE.** Es un medio útil para cultivar bacterias patógenas fastidiosas. Este es un medio, sólido igual que la gelatina, suero o huevo coagulado.- Se recomienda la sangre de conejo, caballo o buey en vez de la sangre de hombre ya que ésta contiene anticuerpos, medicamentos o agentes quimioterápicos.

De lo anterior se deducen los principios fundamentales que rigen la preparación de los medios de cultivo:

- Proveer Nitrógeno asimilable en cantidad adecuada.
- Proporcionar carbohidratos como fuente de energía.
- Ajustar el pH.
- Aplicar el mínimo de calor compatible con la esterilización.
- Pesar con exactitud los distintos ingredientes, de manera que existan entre ellos las relaciones químicas y nutritivas adecuadas.

Preparación del Medio Gelosa Sangre.

El agar o gelosa se obtiene de cierto tipo de algas de la costa norte del Pacífico, Japón o California.- Se extrae de las algas con agua hirviendo y se deja gelificar, se corta en tiras, se hielan, se desecan y blanquean al sol. Para el uso general se recomienda el agar pulverizado porque no requiere agua fría y se disuelve en 1 o 2 minutos de ebullición. La concentración recomendada es de 1.5 a 2/100 para placas; y 6.2/100 para medios semisólidos.

1.- Preparación Gelosa Sangre:

- a) 40 cc del medio en 1000 de agua
- b) disolver
- c) Esterilizar en autoclave a 15'/15 lbs.
- d) Dejar enfriar, poner la sangre en la incubadora para que quede en la misma temperatura con el medio.
- e) Se usan 5 cc de sangre para cada 100 cc del medio
- f) Se usa jeringa esterilizada limpiando con yodo el tapón de la sangre. Este proceso se hace cerca de la llama a fin de evitar contaminación.
- g) Se pone 20 cc por cada caja
- h) Se deja solidificar y después se pone en la incubadora, se saca al siguiente día.- Se procura que el medio se reparta uniformemente mediante inclinación o movimiento giratorio.

2.- Procedimiento de rayado para el aislamiento y purificación de las bacterias:

Del centro de la colonia contenida en la membrana, tomamos una porción con el asa de platino y la llevamos a la placa en la cual hemos colocado el medio gelo sa sangre. Hacemos la resiembra por medio del método de rayado que se indica en el esquema anterior, procurando que las rayas vayan en un solo sentido.

La cápsula de Petri debe levantarse apenas para dar paso a la pipeta o al medio de cultivo, debiendo flamearse los bordes de todos los tubos de ensayo o frascos empleados para verter el medio, especialmente el a

sa de platino que se utiliza para hacer el rayado en las -
placas cuando se hace la resiembra.

b). MEDIO DE KLIGLER IRON AGAR.

La colonia aislada con el Método de filtro de membrana es una coliforme frecuente en las heces humanas.

El Método de coloración de GRAM nos la presenta como forma da de bacterias gram-negativas.

Seguimos nuestra investigación y nuevamente las bacterias aisladas en el medio gelosa sangre, las sometemos a otras reac ciones propias de bacterias gram-negativas, mediante las cua les podemos diferenciar el tipo de bacteria que hemos aislado de la colonia.- Después de estas pruebas tendremos finalmente el nombre específico de la bacteria.

1.- Preparación.

Se suspenden 55g. de bacto-Kligler-Agar en 1000 ml. de a- gua destilada, se calienta hasta el punto de ebullición para disolver el medio.- La solución se distribuye en tubos que se tapan con algodón que no apriete mucho tomando en cuenta que este es un medio aerobio. Se esteriliza por autoclave durante 15 minutos bajo 15 libras de presión a una temperatura de 121° C.- Por si hubiese necesidad de ajustar el pH hay que tener - presente que la reacción del medio después de la esteriliza- ción será de pH = 7.4

Se deja que el medio se solidifique colocando los tubos en posición inclinada.

1 libra hará 8.2 litros del medio.

Se recomienda que para lograr mejores reacciones se use un medio recientemente preparado, pero en refrigeración se puede conservar en buen estado durante algún tiempo, esto evita la molestia de tener que prepararlo cada vez que se hace un cultivo.

2.- Procedimiento.

El medio original de Kligler era un Agar nutriente blando que contenía dextrosa con indicador Andrade y acetato de plomo, muy recomendable para diferenciar los grupos tifoides, paratífoides y grupos para disentería.

Más tarde Bailey y Lacey descubrieron que el rojo fenol se adaptaba muy bien y lo recomendaron como indicador de concentraciones de iones de hidrógeno $[H]$.

Sulkin y Willett prepararon un medio parecido con sacarosa y bacto-triptone como nutriente, y agregando sulfato de hierro y thiosulfato como indicador de ácido sulfídrico.- Averiguaron que este medio es único por su habilidad de ensayar reacciones rápidas y claras.

Actualmente el medio Kligler se prepara con rojo fenol como indicador de producción de ácido, y con sulfato de hierro como indicador de la producción de ácido sulfídrico y fermentación de lactosa y dextrosa.

3.- Reacciones obtenidas:

La reacción de fermentación con el medio Kligler - Agar - Iron dió los siguientes resultados.

a) Etapa amarilla y fondo amarillo que indica fermentación de

lactosa.

- b) Etapa roja con amarillo al fondo que indica fermentación - de dextrosa.
- c) No hubo producción de ácido sulfídrico porque no apareció el color negro característico.

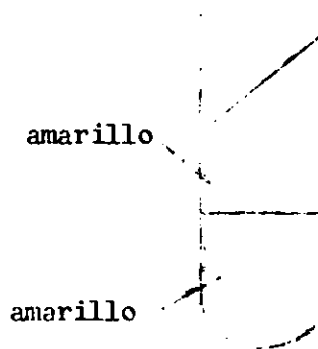
Puede observarse claramente en los tubos de ensayo la fermentación de lactosa y dextrosa y la no producción de ácido - sulfídrico.

Antes de la
inoculación



color rojo

Inoculación y reac-
ción obtenida.



color amarillo

4.- Fundamentos del Medio.

Este es un medio sumamente útil, permite la diferenciación bioquímica de bacterias, según su habilidad de producir lactosa o dextrosa como su habilidad de producir ácido sulfídrico. Establece diferencia entre los organismos que fermentan o no fermentan la lactosa o la dextrosa.- Se recomienda este medio para identificar mejor . cultivo de bacterias, por este moti

vo hemos elegido en nuestra experiencia el medio gelosa san - gre.

Para obtener reacciones verdaderas de un cultivo con este medio, es necesario tener un cultivo puro, nosotros estamos - seguros de que el método de rayado en el cultivo de placas - nos dió colonias suficientemente aisladas y hemos trabajado a demás con el centro de la colonia. Pero en caso de que hubie- ra duda sobre la pureza de una colonia, se purifica reseman- do en Agar Mac Conkey antes de inocular el Kligler Agar.- Cuando estamos seguros de que un cultivo está contaminado, se hacen varias resiembras, aunque lo ideal es aislar el organis- mo de las bacterias en un cultivo puro y después proceder a determinar la reacción típica de la bacteria.

Si al hacer la observación de las reacciones en los tubos de ensayo, no se nota ningún cambio, esto indica que ni dex- troso ni lactosa han sido atacadas.

La transformación del color rojo del medio Kligler en ama- rillo indica fermentación, positiva para lactosa en la parte inferior.

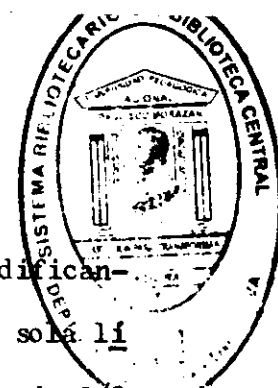
El color negro indica formación de ácido sulfídrico.

c). MEDIO DE SIM:

1.- Procedimiento:

Modo de preparar el medio SIM

36 g. del medio bacto-SIM en 1000 ml. de agua fría des- tilada y se calienta a punto de ebullición para disolverlo.- Se distribuye en tubos a 3 pulgadas de profundidad, esterili-



zando en autoclave a 15' con 15 libras a 121°C.- Solidifican-
do los tubos en posición vertical, se inocula con una sola lí-
nea usando una aguja recta por el centro a una hondura de 2/3
del medio, inocular por 18 o 24 horas a 37°C. Se observa movi-
lidad, ácido sulfídrico e Indol.

Reacción final pH = 7.3

1 libra de medio = 12.6 libras de solución.

Orlowski, Jordon y Victorson descubrieron que algunas bacte-
rias de las coliformes se podían identificar por cultivos en un me-
dio conteniendo acetato de plomo, según la producción de ácido sul-
fídrico.

Sulkin y Willett usaron 1% de agar para demostrar la movili-
dad en las bacterias, además de observar la producción de ácido -
sulfídrico y la fermentación de hidratos de carbono, por miembros
de los grupos salmonella y shigella.

En el desarrollo del medio Bacto-SIM se determinó que 0.005%
de tiosulfato de sodio añadido a un medio de 3% de bacto-peptone -
producía resultados parecidos a los que se vieron cuando el ácido
sulfídrico fue determinado en una solución de 1% de Bacto-peptone,
usando pedacitos de papel de acetato de plomo como indicador de á-
cido sulfídrico.- Cualquier apariencia de negro a lo largo de la -
línea de inoculación se considera como una reacción positiva de á-
cido sulfídrico.

R e a c c i ó n:

La reacción positiva generalmente se obtiene durante las 18 a
24 horas a una temperatura de 37°C. y varía en cuanto a la cantidad

de ácido sulfídrico.- Algunas enseñan un crecimiento difuso por todo el medio, pero otras bacterias no son tan activas.

Con este medio se puede usar la prueba de papel de ácido oxálico para comprobar la producción de Indol. Este papel se prepara mojando papel filtro en una solución de ácido oxálico, secándolo y cortándolo en tiras. Después de haber inoculado el medio, se suspende la tira de papel en la boca del tubo de modo que la tira se proyecte media pulgada debajo del algodón que lo mantiene fijo. No se debe dejar mojar el papel para no contaminar con el mismo, el medio de cultivo. La producción de Indol se observa por la formación de un color rosado sobre el papel durante la incubación.- En una prueba (-) no forma color rosado. La lectura de la producción de Indol se debe efectuar después del ácido sulfídrico y movilidad.

El procedimiento recomienda sobreponer 2 ml. de cloroformo sin agitar y 2 ml. de reactivo de Kovacs.

La prueba para el Indol también se puede hacer agregando racionamente 2 ml. de etyl éter a cada tubo, se agitan suavemente de modo que no se rompa el agar, se deja por varios minutos y luego se agrega 1 ml. de reactivo de Ehrlich dejándolo caer por el costado del tubo de modo que se quede como una etapa sobre el éter y el medio.- La formación de un color rojo morado a la superficie común entre los dos líquidos dentro de 5 minutos indica producción de Indol. En reacciones negativas dará un color rosado claro después de los 5 minutos, es decir después del tiempo indicado para esta clase de reacciones.

El reactivo de Kovacs está preparado con 75 ml. de alcohol

amyl y 25 ml. de ácido clorhídrico concentrado, más 5 gramos de p-dimetilaminobenzoico.

El reactivo de Erhrilch comprende 1 gramo de p-dimetilaminobenzoico, 95 ml. de alcohol al 95% de éter y 20 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

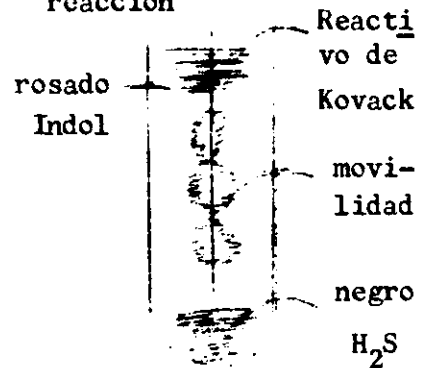
2.- Reacciones obtenidas:

Antes de la
inoculación



Color del Medio
(amarillo cremita)

Después de la
reacción



Como puede observarse en los tubos de ensayo:

- La aparición del color rosado en la parte superior del medio pone en evidencia la producción de Indol.
- La formación de burbujas en la línea de inoculación indica la movilidad de las bacterias.
- La aparición del color negro pone en evidencia la formación de ácido sulfídrico.

| H ₂ S | Indol | Movilidad |
|------------------|-------|-----------|
| + | + | + |

3.- Fundamentos:

Este es otro medio rutinario para identificar miembros de los gru-

pos salmonella y shigella.- Este medio pone en evidencia la producción de ácido sulfídrico, Indol y Movilidad en un mismo tubo. Estas características, tanto como otras reacciones bioquímicas son de primera importancia en la identificación de miembros del grupo entérico gram-negativo.

Como con otros medios diferenciales es preciso usar, cultivos puros para inocular, el período de incubación generalmente es de 18 a 24 horas aunque a veces es posible encontrar colonias atípicas que necesitan más tiempo.

o o o

CAPITULO IV

PROTOCOLO DE TRABAJO PRACTICO

Con los conceptos generales anteriores y dada la importancia del estudio bacteriológico del agua para la salud de la población, y conociendo los problemas que hay en nuestra ciudad, especialmente en el tiempo de verano, la poca cantidad de agua y más que todo para afianzar los conocimientos teóricos, pretendo hacer un trabajo de análisis bacteriológico del agua de una de las colonias.

El presente trabajo trata de hacer un análisis bacteriológico del agua de la colonia Torocagua de la ciudad de Comayagüela, para determinar si las fuentes de agua potable han sido contaminadas, encontrar el índice de contaminación que indica el grado de peligrosidad a que se expone la población que utiliza esta clase de agua o si en realidad no existe peligro alguno. Se hizo la investigación confiando en el hallazgo de colibacilos como índice de posible contaminación del agua con materias fecales humanas, este es un índice de la mala calidad del agua, de que representa un peligro potencial para la población.

AISLAMIENTO DE COLONIAS COLIFORMES O COLIBACILOS.

a) Se hizo el análisis bacteriológico de tres muestras de agua recogidas de tres casas diferentes de la Colonia Torocagua.

Método Utilizado: El método de filtro de membrana.

Materiales:

- 1.- Pipetas de tres tamaños: 1 ml., 10 ml. y 100 ml.
- 2.- Filtro
- 3.- Erlenmeyer
- 4.- Platos de Petri: tres por cada muestra

5.- Papel filtro

6.- Membranas

7.- Motor de aceite

8.- Horno de Incubación.

A.- Preparación de los cultivos:

Hay tres pasos importantes en la preparación de los cultivos que se llevaron a cabo en la siguiente forma:

a) Preparación del medio.

Se hizo una solución de ENDO en alcohol al 2% en una proporción de 1g de ENDO por 60cc de alcohol.

b) Filtración:

Después de preparado el medio, se dispone en los platos de Petri 2cc del medio sobre el papel filtro. Una vez listos los platos de Petri, se hizo la primera filtración.- Para esto hay que colocar la membrana en el filtro, humedecer la membrana, colocar la muestra sobre el filtro, lavar el filtro, sacar la membrana y colocarla en el plato de Petri correspondiente. Como son tres filtraciones por cada muestra se utiliza primero 1 ml. después 10 ml. y finalmente 100 ml, de la muestra de agua.

La bomba de succión sirve para acelerar el proceso de filtración; una vez que se conecta al filtro, el agua pasa por la membrana en unos cuantos segundos.

Los filtros de membrana están hechos de plástico preparado especialmente, del grueso del papel, de poros suficientemente finos para atrapar las bacterias y otras partículas aún menores, pero al propio tiempo lo bastante grandes para dejar pasar fácilmente el -

líquido de cualquier solución acuosa.

c) Baño de María: Incubación de las bacterias.

Una vez hecha la filtración se colocan los platos de Petri - que contienen los cultivos, en baño de María, a 35°C por un período de incubación durante el cual se llevará a cabo el crecimiento y multiplicación de las bacterias; pero este período varía según - la concentración de bacterias en el agua. En nuestro caso hubo que prolongarlo al tiempo máximo de 24 horas.

d) Recuento: de las colonias:

Después de las 24 horas de incubación se llevó a cabo el recuento, encontrando que la muestra No. 3 dió lugar al desarrollo de una colonia verde brillante, abultada y redondeada, características que la identifican como colibacilo. Esta muestra presentó una colonia por 100cc de agua examinada, índice de contaminación - muy bajo, por lo que se deduce que el agua que estamos analizando es agua potable propia para ser usada como tal, es agua de buena - calidad y no presenta peligro potencial.

e) Recomendaciones: para el uso del método de filtro de membrana.

1. Humedecer siempre la membrana antes de verter la muestra - en el filtro para evitar que las bacterias se sequen.
2. Lavar el filtro después de cada filtración y cuando se va a cambiar la muestra.
3. Todos los materiales utilizados deben ser previamente esterilizados para evitar la contaminación y lograr resultados positivos y reales.

4. No utilizar la pipeta dos veces o más, puesto que a la primera vez queda contaminada.
5. Agitar la muestra unas 25 veces antes de hacer la filtración a fin de homogenizarla.
6. Procurar que la membrana que contiene las bacterias filtradas se impregne en el medio por sus dos lados, para lo cual se invierte el plato de Petri después de algunos minutos - de colocada la membrana.

IDENTIFICACION DE BACTERIAS COLIFORMES:

b) Resiembra en Placas:

Las colonias obtenidas con el filtro de membrana han sido identificadas como soliformes por las características que presentan tales como color: en nuestro caso es un color verde brillante, y - que han sido observadas después del proceso de filtración y de incubación por un período de 24 horas.

Para poder aislar las bacterias que se han agrupado para formar esta colonia, tenemos que hacer una resiembra en medios especiales. Después de la incubación, se aprecian colonias de morfología semejantes a Escherichia Coli .- Enseguida se toma una colonia y se hace la coloración de GRAM.

Esta es la primera prueba para identificar una bacteria aislada en un medio de cultivo y se hace la observación en el microscopio con lente de inmersión.

La reacción de las bacterias que estamos analizando a la prueba de la coloración de GRAM nos muestra con gran exactitud que podemos incluirlas en el grupo de las bacterias gram-negativas. Las

razones que nos llevan a estas conclusiones son las siguientes:

- a) Al agregar alcohol hubo decoloración
- b) Al agregar el colorante de contraste las bacterias tomaron este color.
- c) Este color pudimos apreciarlo al hacer la observación de la placa al microscopio, este nos reveló un bacilo grueso y corto gram-negativo (presuntivamente Escherichias Coli). Enseguida se hacen pruebas bioquímicas y para ello usamos el Medio de Kligler y el medio de SIM con los cuales obtuvimos los resultados siguientes:

| K L I G L E R | | | S I M | | |
|---------------|---------|------------------|------------------|-------|-----|
| dextrosa | lactosa | H ₂ S | H ₂ S | Indol | Mov |
| + | + | - | + | + | + |

Los cultivos de bacterias patógenas entéricas gram-negativas dan las reacciones típicas siguientes:

| | S thiposa | Salmonella | Shigella |
|-----------|-----------|------------|----------|
| Movilidad | + | + | - |
| H S | - | - | - |
| Indol | - | - | + |

Después de las pruebas anteriores tenemos el nombre específico de la bacteria aislada de una colonia de coliformes.

Hemos visto y comprobado que se trata de un bacilo grueso y corto-gram-negativo.

Este bacilo es capaz de producir fermentación de lactosa y de
trosa.

Así mismo puede producir H_2S , movilidad e Indol.

Dadas las reacciones anteriores a la prueba del medio de Klig
ler y de Sim concluimos que el nombre específico de nuestra bacte-
ria es Escherichia Coli.

Es importante aclarar que se pudo haber identificado otra bac-
teria como Clostridium perfringens o enterococos, de los cuales no
hablaremos, ya que nuestro trabajo se limita a la identificación -
de bacterias encontradas en la muestra de agua.

Entramos pues, a la descripción y estudio de la Escherichia
Coli, haciendo un enforque especial en cuanto a la función patóge-
na de esta bacteria.

o o o

CAPITULO V

BREVE ESTUDIO DE LA ESCHERICHIA COLI

Familia: Enterobacteriaceas Rahn

Género: Escherichia Castellani y Chalmers

Especie: Escherichia Coli.

Este bacilo fue descubierto por Buchner en 1885, pero su estudio en detalle lo hizo Escherich en 1886.

Vive en el intestino del hombre desde un poco después del nacimiento y persiste allí durante toda la vida.

Abunda en la válvula ilio-cecal, y en menor cantidad en el recto.

a).- M o r f o l o g í a:

Es un bacilo grueso, corto (puede tener la forma de cocos, ca denas cortas) y aspecto filamentoso.

Mide: 0.4 a 0.7 micras de longitud.

Movilidad: variable.- Algunas cepas presentan movilidad activa, otros lenta y existen otros completamente inmóviles.

Reacción de Gram: Dan reacción negativa a esta prueba tiñendo se uniformemente por los colorantes de contraste, ej. los colorantes usuales de anilina.

Estructura interna: No presenta ninguna característica interna especial.

b).- Características de cultivo:

Los colibacilos son aerobios pero también anaerobios facultativos.

Se desarrollan rápidamente en 24 horas, en todos los medios usuales a temperatura de 20°C a 40°C, cultivados en placas de agar, las colonias aparecen a las 24 horas; a las cuarenta y ocho horas alcanzan un tamaño de 2 a 3 mm.-

Aspecto de una colonia típica: poco elevada, convexa, lisa e incolora, algo opaca, borde entero. Algunas colonias típicas presentan la forma de una hoja de vid.

En el medio de Endo, las colonias de E.Coli tienen un brillo metálico, peculiar, verde brillante algunas veces, que se observa mejor a la luz refleja.

En caldo produce un enturbiamiento a las 12 y 24 horas, después produce una ligera película, en el fondo acumula un depósito viscoso y generalmente forma Indol.

Fermenta la glucosa, lactosa, maltosa y otros azúcares, con producción de ácido y gas. Un 50% fermenta la sacarosa y otro 50% no la fermenta.

Los cultivos de colibacilos se caracterizan por su olor fétido, semejante al de las heces diluidas.

c).- R e s i s t e n c i a:

Los bacilos Coli sobreviven durante semanas en cultivos conservados a la temperatura ordinaria, y durante meses en el suelo y en el agua.- Son muy resistentes a los anticépticos usuales, tanto o más que los micrococos. A 60°C mueren en menos de 20 minutos.- Pero algunas sobreviven al proceso de pasteurización y pueden en esta forma alterar el color y sabor de la leche.- En la purificación del agua, el cloro en concentracio

nes de 0.5 a 1.0 por ml. es bactericida eficaz para *A. aerógenes*, *E. Coli* y varias especies salmonella y shigella.

Se usa también el verde brillante para impedir selectivamente el desarrollo de especies de *E. Coli*, aerobacter y *Shigella*.— La cafeína, el cloruro de litio, la telurita potásica, las sales de selenio, y el tetrionato tienen acción inhibidora sobre el desarrollo de colibacilos y otros miembros del grupo entérico.

Estas sustancias inhibidoras son muy útiles para lograr cultivos puros suprimiendo el cultivo de unos organismos y favoreciendo el cultivo de otros para aislarlos, facilitando en esta forma el estudio de los mismos.

d).— Metabolitos bacterianos:

E. Coli al fermentar la glucosa produce anhídrido carbónico e hidrógeno en proporciones aproximadamente iguales.

Se diferencia de la *A. aerógenes* porque esta última produce doble cantidad de anhídrido carbónico e hidrógeno. *E. Coli* forma catalaza y sintetiza Vit E.

e).— Función Util:

—Impide el desarrollo de ciertos microorganismos proteolíticos normalmente presentes en los intestinos— impidiendo en esta forma el desarrollo de enfermedades graves producidas por estos microorganismos.

—Sintetiza cantidades apreciables de vitaminas.— Por esto no basta con restricciones en la dieta para producir deficiencia de complejo B en los animales, sino que hay que eliminar

primero los colibacilos con sulfonamidas.-

-Prestan una gran utilidad al sanitario cuando se encuentran en los alimentos o en el agua, porque sirven como índice de contaminación fecal.

Los experimentos demuestran que los cepos aislados del intestino de sujetos normales son inofensivos no así los cepos del intestino de sujetos enfermos.- Por ingestión no produce trastorno por vía subcutánea produce abscesos locales, septicemia y peritonitis en los animales de prueba especial el conejo es el más utilizado.

f).- Función patógena:

Puede producir tres tipos de enfermedades:

- 1) Son la causa más común de pielitis y pielonefritis y pueden producir abscesos en los órganos internos, septicemia, endocarditis y meningitis.
- 2) Diarrea epidémica grave , a veces mortal.
- 3) Los productos metabólicos irritantes producidos por el colibacilo causan diarrea de verano en niños del 2o. al 3o. año de vida.

Tipos Clínicos de Infección en el hombre:

Como se dijo anteriormente E. Coli puede producir diferentes clases de enfermedades enumeradas ya, pero además puede producir - con frecuencia apendicitis, peritonitis, pepsis puerperal, infección de la vesícula biliar, en casos raros producen meningitis, septicemia y endocarditis.

La diarrea epidémica es grave y con frecuencia mortal, puede

ser introducida por un asistente y transmitida dentro de la cuna - por objetos inanimados.- Los mismos serotipos pueden atacar a los adultos y a los niños mayores pero no es tan grave como en los lactantes.

El tipo específico, esporádico, suele currir en el segundo - verano del niño.- La E. Coli irrita el intestino y produce náuseas, vómitos y diarreas violentas.- En los casos más graves puede oca - sionar la muerte en 2 o 4 días.

a).- Diarrea del turista.

Los viajeros tienen con frecuencia crisis de diarreas que se les han atribuido a causas tales como cambios de clima y - agua, amebas, salmonella, shigella o virus. Hoy se han elimi - nado estas causas y se tiene a la E. Coli como sospechosas.- Lo que sucede es que los viajeros están inmunes a las cepas - locales pero no a las de otros países.

b).- Tratamiento:

-Para la diarrea de verano a veces basta con reponer el agua y los electrolitos.

-En la diarrea epidémica de los lactantes se usa con éxito el cloranfenicol, las tetraciclinas y la neomicina.

-En las infecciones esporádicas de los órganos internos los - mismos antibióticos mencionados dan buenos resultados con la desventaja de que estas cepas se vuelven resistentes con gran rapidez y entonces son difíciles de curar. También sirven en ciertos casos la sulfamidoterapia, la penicilina es ineficaz, la estreptomycinina, aureomicina y cloromicetina y más especifi

camente se está utilizando el nuevo antibiótico Colimycina.

g).- P r e v e n c i ó n

En la diarrea de verano, dar a los niños leche ácida, aislamiento rígido de las cunas de los lactantes.

o o o

RECOMENDACIONES

Método de purificación del agua:

El proceso de purificación del agua comprende varias etapas:

- 1o. Coagulación: Se agrega al agua $Al_2(SO_4)_3$ o $FeSO_4$ que en pH alcalino forman un gel que engloba la materia orgánica en suspensión, incluyendo una buena parte de las bacterias.
- 2o. Sedimentación: El agua se deja reposar en grandes pilas - durante algunas horas, a fin de que los flóculos se sedimenten.
- 3o. Filtración: Luego se le hace pasar por filtros de arena - de "filtración rápida", lo que quita los flóculos no sedimentados y las bacterias. Si el agua no es turbia puede - no llevarse a cabo la coagulación y sedimentación, filtrándose directamente por filtros de "filtración lenta". La materia orgánica que se acumula en la superficie de estos filtros ayuda a la filtración.
- 4o. Cloración: Los procesos anteriores se complementan agregando al agua dos partes por millón de cloro; de esta manera se matan todas las bacterias y se le quita el mal olor y el mal sabor. Si la cantidad de cloro es insuficiente puede quedar con olor o sabor a cloro debido a que se forman compuestos orgánicos de cloro.

Tratamiento de aguas negras:

En las aguas negras hay bacterias, levaduras, actinomicetos, protozoos y virus. Estos microorganismos atacan la materia orgánica y producen compuestos de mal olor.

Arrojar las aguas negras directamente en los ríos, es sumamente perjudicial. La materia orgánica forma en el fondo un lodo de mal aspecto en los ríos, o si llega al mar bordea las playas dándoles también mal aspecto, por su color negro y la producción de burbujas por desprendimiento de metano. Los peces y la vegetación de los ríos se mueren, y las estructuras de acero y concreto se corroen.

En algunos lugares las aguas negras no se someten a ningún tratamiento por razones de orden económico. En estos casos se hace lo siguiente:

a) Arrojarla directamente en un río, un lago o en el mar; de lo dicho anteriormente se deduce lo inconveniente de este método.

b) Se arroja en terrenos arenosos, poco fértiles, como agua de irrigación, los vegetales sembrados en esos terrenos pueden ser la causa de la transmisión de enfermedades, sobre todo parasitarias.

c) Lagunización, se arrojan las aguas negras en grandes estanques de poca profundidad y de allí se les mantienen por 30 días. La materia orgánica es oxidada tanto por microorganismos, como por el oxígeno disuelto. Se le puede agregar fertilizantes nitrogenados, que aumentan el crecimiento de algas, las que a su vez proporcionan grandes cantidades de oxígeno. Este sería el método más recomendable en el caso de no poder someter las aguas negras a un tratamiento especial, como el siguiente:

a. Cernimiento o tamizaje para quitar sólidos voluminosos como botellas, cajas y otros objetos.

b. Sedimentación, el agua se hace pasar a grandes tanques en

donde se le deja en reposo por algún tiempo, a fin de que se sedimente la materia orgánica. Este sedimento es lo que se llama lodo. Se puede producir lo que se llama lodo activado, bombeando aire en el agua, para activar la oxidación. Una vez separado el lodo y el sobrenadante se tratan por separado:

1.- Lodo. Se pasa a tanques de anaerobiosis, donde se fermenta y la mayor parte de la materia orgánica se convierte en gases (CO_2 , CH_4 , NH_3 , H_2 , H_2S). Estos gases pueden llegar a tener un 75% de metano, puede emplearse como combustible.- El residuo es bombeado al mar o bien se le deseca, después de lo cual se tira o se vende como fertilizante.

2.- Sobrenadante. Se le agrega cloro en grandes cantidades para oxidar toda la materia orgánica y matar los microorganismos.- Luego puede tirársele al río, sin ningún riesgo.- También puede ser tratado y ser convertido en agua potable, pero es bastante caro.

BIBLIOGRAFIA

- BURKOWS, William Tratado de Microbiología
Editorial Interamericana, S.A.
- CAPELLA LUSTOS, Antonio
(Traductor) Microbiología de Zinsser
U.T.E.H.A.
Tercera edición en Español.
México, 1967
- CERVERA, Ernesto Análisis de Potabilidad del
agua.
- GARCIA, Rogelio H. Análisis Bacteriológico del -
Agua del Carrizal.
- JAWETZ, Ernesto Manual de Microbiología Médi-
ca. Editorial El Manual Moder-
no, S.A. Primera Edición.
México, 1961.
- NASON, Alvin Biología
Editorial Linusa-Wiley S.A.
Primera Edición.
México, 1968.
- SCANCA, Franco La Célula Bacteriana
Editorial Aguilar
Primera Edición
España, 1959.
- SPAULDING, Earle H.
KOLMER, John A.
ROBINSON, Howard W. Métodos de Laboratorio
Editorial Interamericana, S.A.
Quinta Edición
México, 1960.
- ZAPATECO, Emilio Microbiología Médica
Aldus, S.A. Artes Gráficas
Santander
Quinta Edición.
España, 1962.