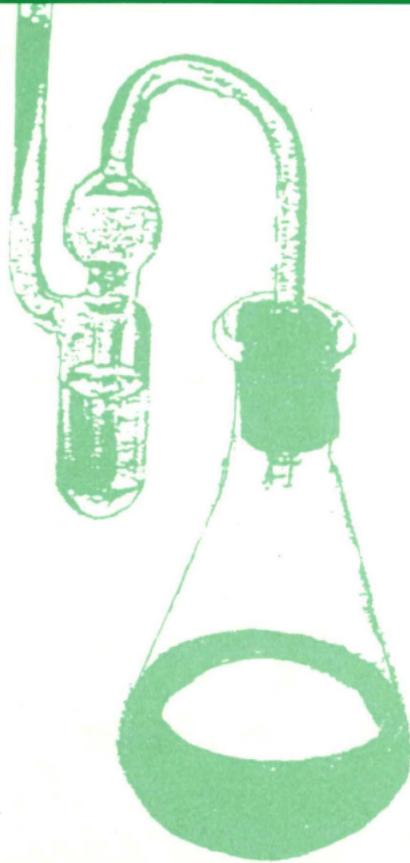


Susana A. Sanz Cervera

PRÁCTICAS de MICROBIOLOGÍA



Universidad de La Rioja

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA.

MATERIAL DIDÁCTICO

Agricultura y alimentación

nº 1

Susana A. Sanz Cervera
*Profesora del Departamento de Agricultura y Alimentación
de la Universidad de La Rioja*

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA
(2ª edición)

UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
Servicio de Publicaciones



Prácticas de microbiología

de Susana A. Sanz Cervera (publicado por la Universidad de La Rioja) se encuentra bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© La autora

© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2011
publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es

ISBN: 978-84-694-0870-4

INDICE

I.-Técnicas Generales.	9
I.1 Manejo de muestras y toma de inóculo.	11
I.2 Tinción de Bacterias.	12
- Preparación de un frotis bacteriano para tinción.	12
- Tinción simple.	14
- Tinción de Gram.	15
- Tinción de esporas.	16
I.3 Preparación de medios de cultivo	18
I.4 Obtención y mantenimiento de cultivos puros.	20
- Técnica de aislamiento por agotamiento por estría.	20
- Metodo de aislamiento en placa por diluciones sucesivas.	22
- Mantenimiento de cultivos puros.	24
I.5 Medida del N° de microorganismos totales por recuento microscópico directo.	26
- Método de Breed.	26
- Conteo con cámara de recuento.	27
I.6 Seguimiento del crecimiento microbiano.	29
II.-Bacterias.	31
II.1 Pruebas de identificación de Enterobacterias.	33
- Cultivos selectivos: Agar MacConkey.	33
- Agar Triple azúcar e hierro.	33
- I.M.V.I.C.	36
- Urea.	39
- Movilidad.	40
- Confirmación serológica de <i>Salmonella</i>	40

II.2 Pruebas de identificación de cocos Gram +.	42
- Prueba de la Catalasa.	42
- Prueba de la DNAasa.	42
- Fermentación del Manitol.	43
- Crecimiento en Agar Bilis Esculina.	44
II.3 Antibiograma.	45
II.4 Actividad de bacterias lácticas.	47
III.- Levaduras.	49
III.1 Morfología.	51
III.2 Fermentación de azúcares.	51
III.3 Capacidad de esporulación.	52
III.4 Asimilación de Nitratos.	52
III.5 Medida de la Velocidad de Producción de CO ₂	53
IV.- Mohos.	57
IV.1 Métodos de identificación de mohos.	59
- Exámen del moho <i>in situ</i>	60
- Realización de preparaciones.	60
- Microcultivos.	60
V.- Microbiología Alimentaria.	63
V.1 Recuento de microorganismos aerobios totales.	65
V.2 Detección y recuento de <i>Enterobacteriaceae</i> lactosa positivas	68

V.3 Detección y recuento de <i>Escherichia coli</i>	70
V.4 Detección de <i>Salmonella</i>	73
V.5 Detección de <i>Staphylococcus aureus</i>	75
V.6 Control microbiológico de superficies.	79
- Análisis de superficies planas.	79
- Análisis de superficies no planas.	80
VI.-Análisis Microbiológico de Aguas.	83
VI.1 Determinaciones microbiológicas por el método del Número Más Probable (NMP).	85
VI.2 Determinaciones microbiológicas por el metodo de las membranas filtrantes.	87
VII.- Microbiología de suelos.	89
VII.1 Aislamiento de bacterias aerobias esporuladas.	91
VII.2 Aislamiento de <i>Azotobacter</i>	92
VII.3 Efecto del pH en el desarrollo de microorganismos en el suelo.	92
VII.4 Fijación biológica de Nitrógeno. Observación de <i>Rhizobium</i>	93
VIII.- Bibliografía	95

I . TECNICAS GENERALES

- I. 1. - Manejo de muestras y toma de inóculo.
- I. 2.- Tinción de bacterias.
- I. 3.- Preparación de medios de cultivo.
- I. 4.- Obtención y mantenimiento de cultivos puros.
- I. 5.- Medida del nº de microorganismos totales por recuento microscópico directo.
- I. 6.- Seguimiento del crecimiento microbiano.

I. 1.- MANEJO DE MUESTRAS Y TOMA DE INOCULO

Para la toma del inóculo de una muestra a examinar, bien sea procedente de una placa de Petri o de un tubo en slant (medios sólidos) o de un tubo con caldo (medio líquido), deben seguirse los siguientes pasos:

1.-Coloque frente a usted el mechero y la preparación o muestra que contiene los microorganismos, así como el resto del material necesario (portaobjetos con una gotita de agua si se va a realizar una tinción, tubos, placas...). Todo ello ha de ser alcanzado con facilidad y sin tropiezos.

2.-Tome el asa de siembra con la mano derecha y flamee el alambre hasta que alcance un rojo incandescente. Enfríe el alambre en la proximidad de la llama (unos 10 segundos).

3.-Tome con la mano izquierda el recipiente (tubo, placa) que contiene la muestra o los microorganismos:

-Si la muestra está en un tubo, quite el tapón con los dedos meñique y anular de la mano derecha (sin soltar el asa de siembra) y flamee la boca del tubo.

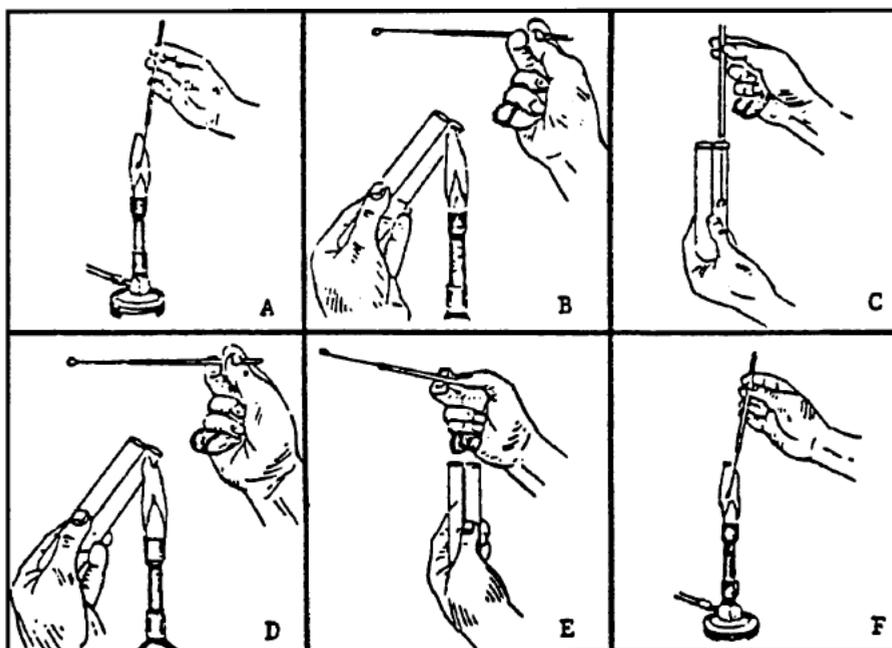
-Si la muestra está en una placa de Petri, coloque la placa invertida sobre la mesa de trabajo y levante con la mano izquierda la parte de la placa que contiene el medio de cultivo con los microorganismos. Llévela a la proximidad del mechero.

4.-Trabajando siempre en la proximidad de la llama, introduzca el asa de siembra y tome una pequeña muestra del cultivo que crece sobre la superficie del agar. Si el medio es líquido, agite ligeramente el tubo y tome una gotita con el extremo del alambre.

5.-Manteniendo el inóculo en el extremo del asa, flamee el extremo del tubo y coloque de nuevo el tapón. Si es una placa de Petri, póngala de nuevo sobre la tapa que está en la mesa de trabajo.

6.-Transfiera el inóculo a otro medio de cultivo tomando las mismas precauciones para su manejo (flamear bocas de tubos, trabajar en la proximidad de la llama...) o prepare un frotis bacteriano sobre un portaobjetos.

7.-Antes de dejar la asa de siembra sobre la mesa, flaméela de nuevo para esterilizarla.



Demostración gráfica del manejo y toma de inóculo

I.2.-TINCION DE BACTERIAS

Preparación de un frotis bacteriano para tinción

1.-Tome con el asa de siembra una pequeña muestra del cultivo:

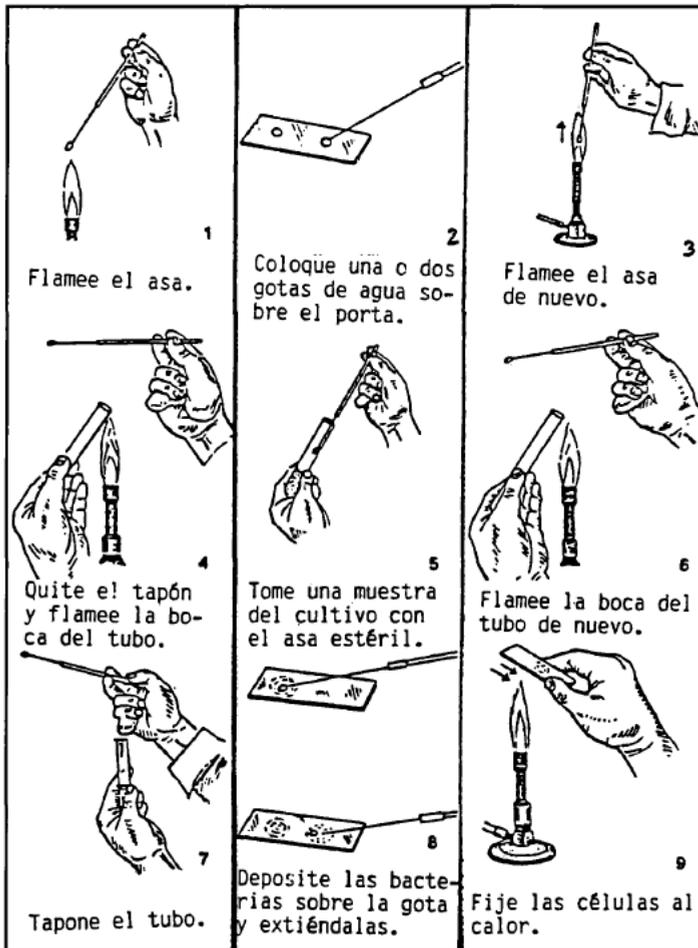
-Si la preparación se ha de hacer de un cultivo sólido, ponga una pequeña gota de agua sobre un portaobjetos limpio. Con el asa de siembra flameada, transfiera una cantidad pequeña de bacterias a la gota resuspendiéndolas por frotamiento. Extienda ahora la gota para facilitar su secado.

-Si la preparación se ha de hacer a partir de un caldo, no es preciso colocar la gota de agua sobre el portaobjetos y, salvo esto, la mecánica es la misma.

2.-Deje que la capa fina líquida sobre el portaobjetos se seque al aire. Es también posible secarla pasando el portaobjetos rápidamente sobre la llama, pero en ese caso la temperatura del vidrio no debe sobrepasar la de la mano.

3.-Fije la preparación al calor, invirtiendo el portaobjetos y pasándolo por la llama dos veces durante uno o dos segundos. Si la preparación no está convenientemente fijada, las bacterias no se adherirán al vidrio y se perderán durante el proceso de tinción. Por el contrario, una exposición excesiva al calor lleva a la ruptura o distorsión de las bacterias.

4.-Realice ahora la tinción deseada.



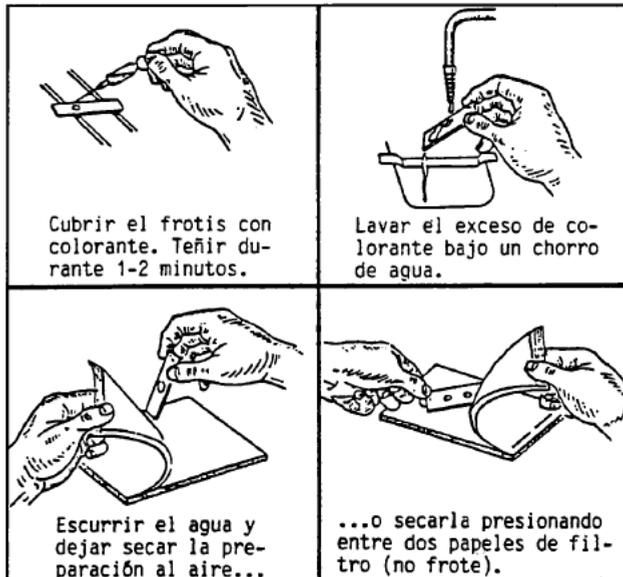
Demostración gráfica del método de preparación de un frotis bacteriano para tinción

Tinción simple

El objeto de este tipo de tinción es únicamente incrementar el contraste de las bacterias con respecto al fondo de observación para así facilitar la determinación de su forma, tamaño y disposición relativa. Para ello basta el empleo de un único colorante.

Procedimiento:

- 1.-Preparar y fijar un frotis de bacterias procedentes del cultivo o muestra que se quiere examinar.
- 2.-Cubrir el frotis con abundante cantidad de colorante, trabajando siempre encima del fregadero. Dejar actuar el colorante durante 1-2 minutos.
- 3.-Lavar con abundante agua del grifo para quitar el exceso de colorante.
- 4.-Dejar secar el porta al aire. Puede emplearse también papel de filtro, presionándolo contra el portaobjetos, pero sin frotar la preparación.



Demostración gráfica del método usado en la realización de una tinción simple

La preparación está ahora lista para ser observada al microscopio:

- 1.-Centrar la preparación sobre la platina del microscopio, ajustar la iluminación y enfocar con el objetivo de 10X. Seleccionar un campo adecuado.
- 2.-Examinar la preparación con el objetivo de 40X.
- 3.-Hacer lo propio con el objetivo de inmersión.

Tome notas y realice dibujos de lo observado de forma clara y precisa junto a los datos que conoce (nombre del microorganismo, tipo de medio de cultivo, origen de la muestra...).

Tinción de Gram

Es una de las tinciones diferenciales de más uso en bacteriología. Como es sabido, el distinto efecto de la combinación de colorantes, mordiente y disolventes sobre los distintos microorganismos está relacionado con la composición química de su pared celular. Por ello, las bacterias a las que se va a aplicar esta tinción deben proceder de cultivos jóvenes (12 a 18 horas para las bacterias más comunes) con células en fase exponencial de crecimiento. Las bacterias Gram + en fase de crecimiento más tardío dan resultados irregulares en esta tinción.

Reactivos:

Solución I:(primer colorante) Cristal de Violeta al 1% en agua.

Solución II:(mordiente) solución acuosa de iodo iodurado (Lugol) al 2%

Solución III:(disolvente diferenciador) Acetona:Etanol 1:3

Solución IV:(colorante de contraste) 2% Safranina en etanol:agua (1:9)

Procedimiento:

- 1.-Preparar un frotis bacteriano y fijar a la llama.
 - 2.-Cubrir la preparación con cristal violeta y dejar actuar el colorante durante 1 minuto. Lavar con abundante agua del grifo.
-

3.-Cubrir la preparación con Lugol y dejarlo actuar durante 1 minuto. Lavar el exceso de lugol con abundante agua del grifo.

4.-Añadir el disolvente diferenciador (solución III) goteándolo sobre la preparación, que mantendremos inclinada sobre el fregadero, hasta que el disolvente no arrastre consigo más cristal violeta. A continuación lavar la preparación con agua del grifo.

5.- Añadir el colorante de contraste (Safranina) y dejarlo actuar durante 0.5-1 min. Lavar el exceso de colorante y secar la preparación con las precauciones descritas para las tinciones simples.

6.-Observar la preparación con el objetivo de inmersión.Las bacterias Gram + aparecerán teñidas de color violeta y las Gram - rosa o rojo. Es necesario un enfoque exacto, pues de otra manera el color violeta puede aparecer como rojo al dispersarse la luz en los bordes de la célula.

Realice las anotaciones pertinentes, tanto del resultado de la tinción Gram como de otros aspectos de la muestra (forma, tamaño...).

Tinción de esporas

Ciertas bacterias, que incluyen como más características las de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*, desarrollan endosporas que poseen una extraordinaria resistencia al calor, sequedad, irradiación y agentes químicos. La espora se produce en el interior de la célula vegetativa con el tamaño, forma y posición características de la especie a la que pertenece. Finalmente por lisis de la célula formadora, es liberada al medio. Las esporas aparecen cuando el cultivo ha finalizado la fase exponencial de crecimiento.

La naturaleza estructural de la espora hace que su tinción requiera procedimientos drásticos y que, por el contrario, una vez teñidas sean difícilmente decoloradas. Una tinción normal, la de Gram por ejemplo, puede revelar su presencia “en negativo” cuando aún están incluidas en las células formadoras, pero no cuando están presentes como esporas libres. Por ello, existen tinciones específicas de esporas.

Colorantes:

Solución I: 5% de Verde Malaquita en agua

Solución II: 0.5% de Safranina en agua

Procedimiento:

- 1.-Prepare y fije un frotis del cultivo a examinar
- 2.-Coloque un papel de filtro sobre la mesa de trabajo y sobre él el mechero encendido. Sujete la preparación con las pinzas de madera, cubra el frotis con Verde Malaquita y caliente la preparación ligeramente sobre la llama hasta que el colorante emita un vapor ténue, pero evitando que hierva.
- 3.-Continúe calentando intermitentemente durante 5 min. en las mismas condiciones. Reponer el colorante sobre la muestra si se observa que el mismo se evapora excesivamente. No deje que la preparación se seque.
- 4.-Enfríe la preparación a temperatura ambiente y entonces, nunca antes, lave el exceso de colorante con agua del grifo.
- 5.-Cubra la muestra con Safranina y deje actuar el colorante durante 0.5-1 min. Lave el exceso de colorante con agua del grifo y seque la preparación.
- 6.-Observe la preparación con el objetivo de 40X y el de inmersión. Las esporas, libres o no, aparecerán teñidas de color verde. Por el contrario, las células sin esporas y las células formadoras de esporas aparecerán de color rosa o rojo.

Como de costumbre, realice anotaciones cuidadosas de todo lo que observe.

I.3.-PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

En la actualidad, la gran mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados por diferentes compañías, normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar. Por ello, en la mayoría de los casos la preparación de un medio de cultivo se reduce a pesar la cantidad deseada del mismo y redissolverla en agua destilada siguiendo las instrucciones del fabricante. Si se trata de un caldo, se pasa directamente a la esterilización en las condiciones descritas en el envase. Si es un medio sólido (con agar), habitualmente se procede a fundir el agar en un baño María antes de esterilizarlo.

Las sustancias termolábiles se esterilizan por filtración y se añaden al resto de los componentes con posterioridad a la esterilización en autoclave de los mismos. Antes de su esterilización, los caldos se distribuyen en los recipientes adecuados (tubos, matraces) y se taponan: en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe exceder 1/3 del volumen total del mismo. Los medios sólidos, una vez fundidos, se distribuyen en caliente en tubos o frascos (no en placas Petri) (límite 1/3 del volumen del recipiente), se tapan y se esterilizan de igual manera.

Finalizada la esterilización en el autoclave, los medios se dejarán enfriar a temperatura ambiente. Los medios sólidos contenidos en tubos deberán inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado o "slant", si es tal su finalidad. Las placas de Petri pueden ser también preparadas ahora, vertiendo el medio aún fundido y estéril dentro de las mismas en la proximidad de una llama. También es posible conservar el medio destinado a las placas solidificado y estéril en tubos que se fundirán al baño María en el momento de prepararlas.

Caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente. Sin embargo, para reducir la deshidratación de los mismos y el consiguiente cambio en las concentraciones de los componentes, es preferible conservarlos a 4° C.

Instrucciones para el uso del autoclave

- 1.-Abrir la tapa superior
- 2.-Verificar que las válvulas de Vapor y Desagüe están cerradas.

3.-Comprobar que el nivel del agua alcanza la gradilla. Si no es así, añadir más agua (preferentemente destilada)

4.-Seleccionar la temperatura de esterilización, teniendo en cuenta la relación entre la temperatura y la presión de vapor saturado.

5.-Introducir el material a esterilizar

6.-Cerrar la tapa del autoclave mediante giro del volante hasta el fondo y ejercer una ligera presión

7.-Seleccionar el tiempo de esterilización.

8.-Accionar el interruptor general con lo que comenzará a elevarse la temperatura.

El autoclave del laboratorio va provisto de una válvula de expulsión automática del aire, por lo que durante el calentamiento hasta 110° esta válvula permanece abierta expulsando el aire del interior del autoclave. Al llegar a 110° la válvula se cierra automáticamente.

Una vez alcanzada la temperatura seleccionada, comienza a contar el tiempo de esterilización.

9.-Cuando el temporizador llega a cero (fin del tiempo de esterilización programado), se desconecta automáticamente el autoclave lo que es avisado por un zumbador. Para parar este, situar el interruptor general en la posición OFF.

10.-¡**ATENCIÓN!** no abrir la tapa superior hasta que el manómetro esté a cero y la válvula de vapor abierta.

Sólo si se han esterilizado **SOLIDOS** se podrá desvaporizar rápidamente abriendo la válvula de vapor.

Si se han esterilizado **LIQUIDOS** habrá que dejar que el autoclave vuelva a la temperatura ambiental por sí solo o, en último extremo, abriendo muy ligeramente la válvula de Vapor. La descompresión súbita de líquidos provoca la rotura de frascos y tubos, derrame de líquidos... con la consiguiente obstrucción de los tubos de la parte inferior del autoclave.

I.4.-OBTENCION Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS PUROS

Técnica de aislamiento por agotamiento por estría

Se trata de un método simple y rápido de agotamiento progresivo y continuo del inóculo sobre un medio sólido, generalmente contenido en una placa de Petri. El objeto es obtener a partir de un elevado número de bacterias, un número reducido de ellas distribuidas individualmente a lo largo de la superficie de la placa. Al incubar esta, cada una de las bacterias originará una colonia. Las colonias individuales constituyen cada una un cultivo puro.

Procedimiento:

(En esta técnica es muy importante emplear un asa de siembra en buen estado. Un asa de siembra rota o deteriorada rasgará el agar al realizar el agotamiento).

- 1.-Esterilizar el asa flameándola en el mechero hasta conseguir un rojo incandescente.
- 2.-Enfriar el asa en la proximidad de la llama. Tomar un inóculo de la muestra.
- 3.-Transferir el inóculo a un área pequeña de la superficie de la placa, próxima al borde. Extender el inóculo formando estrías muy juntas sobre la superficie de una porción pequeña de la placa.
- 4.-Flamear de nuevo el asa y enfriarla. Tomando como inóculo el obtenido mediante el rozamiento del asa de siembra con las estrías sembradas la primera vez, realizar sobre una porción virgen de la placa una segunda tanda de estrías que no toque la primera.
- 5.-Flamear y enfriar el asa. Repetir exactamente la operación descrita en el punto 4 pero empleando como inóculo la segunda tanda de estrías.

6.-Flamear y enfriar el asa. Repetir de nuevo 4, pero empleando como inóculo la tercera tanda de estrías. Las nuevas series de estrías no deben tocar ninguna de las series anteriores.

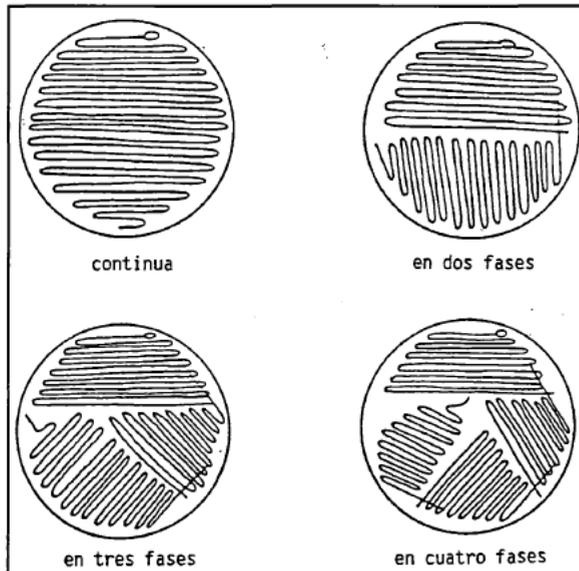
7.-Flamear el asa y tapar la placa de Petri. Esta se incubará a temperatura adecuada en posición invertida ya que, de otra manera, el agua de condensación que se iría depositando sobre la superficie del agar impediría la obtención de colonias aisladas.

Para realizar el agotamiento por estría, la placa de Petri puede mantenerse sobre la mesa de trabajo en posición normal y, levantando la tapa con la mano izquierda, realizar las estrías con la derecha. Aún mejor, es posible hacerlo colocando la placa en posición invertida sobre la mesa de trabajo y, tomando la parte que contiene el medio de cultivo, levantarla hasta la altura de la llama del mechero. Allí, con ella en posición casi vertical, realizar las sucesivas tandas de estrías.

Para realizar las estrías, oscile el asa de siembra sobre la superficie del agar mediante un balanceo sucesivo y rápido de la muñeca. No haga más presión sobre el agar que la debida al propio peso del asa y su mango.

La figura que se muestra a continuación ilustra cuatro posibles maneras de realizar el agotamiento por estría: de modo continuo, en dos, tres o cuatro fases. Debe intentar realizar al menos el agotamiento por estría en tres fases.

Pautas para la realización de aislamiento por agotamiento por estría



Método de aislamiento en placa por diluciones sucesivas

Este método consiste en realizar diluciones sucesivas de la muestra en condiciones de esterilidad con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en una serie paralela de placas de Petri. Evidentemente, alguna de las diluciones será tal que al distribuir una parte de ella en la placa, originará colonias separadas. Conocidos el número de colonias, la cantidad sembrada y la dilución correspondiente, esta técnica permite también evaluar el número de gérmenes viables en la muestra original.

Procedimiento:

Material: Pipetas estériles, suero salino estéril, tubos estériles, gradilla y muestra. Coloque el material enfrente suyo sobre la mesa de trabajo de forma que pueda alcanzarlo fácilmente, encienda el mechero y proceda del modo siguiente.

1.-Tome una pipeta estéril de 10 ml sin tocar con las manos mas que el extremo que se ha de llevar a la boca. Flamear ligeramente la punta, abrir el recipiente que contiene el suero salino estéril, flamear la boca del mismo y tomar 9.0 ml de su contenido. Flamear de nuevo la boca del recipiente y taponarlo.

2.-Transferir los 9.0 ml a uno de los tubos estériles, flameando la boca del tubo después de retirar el tapón y antes de volverlo a colocar. Recuerde que los tapones han de mantenerse en la mano y no dejarse sobre la mesa durante la operación. No deje tampoco la pipeta sobre la mesa al finalizar y evite que su punta toque algún objeto. Trabaje siempre en la proximidad de la llama.

3.-Con la misma pipeta, caso de que no la haya contaminado, transferir de nuevo 9.0 ml de suero salino estéril a otro tubo siguiendo las instrucciones dadas en 1 y 2.

4.-Repetir 3 tantas veces como sea necesario.

5.-Con una pipeta estéril, tomar 1 ml de muestra original y transferirlos al primero de los tubos con 9.0 ml de suero estéril. Depositar la pipeta en "Material contaminado" y marcar el tubo como 1/10 (o 10^{-1}).

6.-Agitar bien el tubo con la primera dilución haciéndolo girar entre las palmas de las manos y, con una nueva pipeta estéril, transferir 1 ml de esta primera dilución al segundo tubo con 9.0 ml de suero salino. Deshechar la pipeta y agitar el tubo. Marcarlo como 1/100 (o 10^{-2})

7.-Repetir 6 tantas veces como sea necesario.

Por este procedimiento hemos obtenido las diluciones $1/10^1$, $1/10^2$, $1/10^3$, $1/10^4$ etc..Al denominador de estas fracciones se le llama FACTOR DE DILUCION.

Siembra para aislamiento o recuento

Material: Pipetas estériles, placas de Petri vacías estériles, agar nutritivo estéril fundido en tubos y equilibrado a 40-50° en baño termostatado.

Procedimiento:

1.-Transferir con una pipeta estéril una cantidad conocida de cada dilución de la muestra a una serie de placas de Petri marcadas previamente con el factor de dilución correspondiente. Para esta operación es posible emplear tan sólo una pipeta si se comienza por la dilución y la placa de factor más alto (la más diluida). La cantidad a transferir habitualmente es de 0.2 ml.

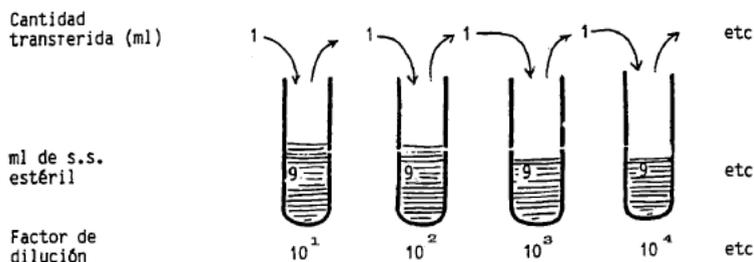
2.-Añadir a cada placa un tubo de agar fundido y mezclar el inóculo con el medio mediante rotación suave de la placa, unas 10 veces hacia la derecha y otras 10 hacia la izquierda.

3.-Dejar que solidifique el agar completamente e incubar las placas a la temperatura deseada en posición invertida.

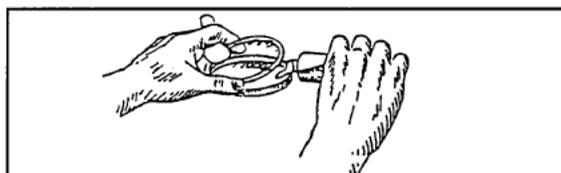
4.-Después del periodo de incubación, examinar las placas. Las colonias aparecerán bien sobre la superficie del agar, bien en la masa del mismo como pequeños discos lenticulares con orientación variable. Cada colonia representa los descendientes de una bacteria, si bien en realidad resulta más exacto hablar de “unidades formadoras de colonias” (UFC) ya que pueden ser una sola célula viable, un agregado de ellas difícil de dispersar, un fragmento de micelio etc..

Para el recuento se procurará utilizar aquellas placas que contengan entre 30 y 300 colonias. El número original de microorganismos en la muestra será:

$$\text{N}^\circ \text{ microorg.} = \text{N}^\circ \text{ colonias} \times \frac{1}{0,2 \text{ ml dil./placa}} \times \text{factor de dil.}$$



Esquema del procedimiento a seguir en la realización de diluciones sucesivas y técnica aséptica para preparar placas de agar

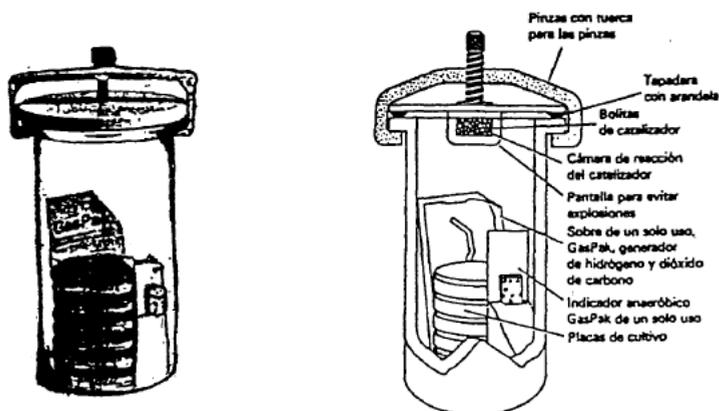


Mantenimiento de cultivos puros

Las colonias aisladas por cualquiera de los métodos descritos, se toman como inóculo para la siembra de medios frescos donde las bacterias, al multiplicarse, constituirán cultivos puros.

Esta multiplicación se realiza en estufas de cultivo en las que se selecciona la temperatura idónea de crecimiento para el microorganismo del que se trate.

Sin embargo, en el caso de microorganismos anaerobios es necesaria la utilización de recipientes en los que el oxígeno quede eliminado. El sistema más comúnmente empleado es el frasco Gas-Pak que se muestra en la figura:



Esquema y componentes de un frasco Gas-Pak para el cultivo de anaerobios

En este sistema se consigue la eliminación del oxígeno por reacción con hidrógeno, con lo que se forma agua en presencia de un catalizador que, en el frasco Gas-Pak, está constituido por granos de alúmina recubiertos con paladio.

Así pues, el sistema está formado por un recipiente de cierre hermético, un sistema generador de H_2 y CO_2 descartable y un indicador del potencial de oxidorreducción. Para la generación de ambiente anaerobio, se abre el envase del generador de H_2 y CO_2 , se introduce en el recipiente, se añaden unos 10 ml de agua para permitir la generación de dichos gases y se cierra la tapa herméticamente.

El control de la anaerobiosis suele realizarse mediante la inclusión de tiras de azul de metileno (BBL), que es azul cuando está oxidado y blanco al reducirse. El cambio de color se realiza a +0,11mv de potencial de oxidorreducción por lo que, si se logran condiciones anaerobias, las tiras se vuelven gradualmente blancas y permanecen así si no hay escapes que permitan la entrada de oxígeno al sistema.

Una vez colocadas las placas o tubos inoculados en la jarra de anaerobios y dispuestas las condiciones para la creación de anaerobiosis, se introduce el conjunto en la estufa de cultivo a la temperatura deseada.

Para conservar los cultivos puros obtenidos, es necesario mantenerlos bajo refrigeración y transferirlos a medio fresco cada cierto tiempo, procedimiento laborioso y expuesto a la contaminación de los cultivos. Para evitar estos inconvenientes, suele recurrirse a la congelación en una suspensión de leche descremada al 20% de las cepas o bien a su liofilización, procedimiento este que asegura la conservación de las bacterias durante largos periodos de tiempo.

I.5.-MEDIDA DEL N° DE MICROORGANISMOS TOTALES POR RECUENTO MICROSCOPICO DIRECTO

Con este método se determina el n° total de células de una suspensión sean viables o no, a diferencia de las medidas realizadas por el método de las diluciones sucesivas con el que sólo se cuentan las células viables.

La preparación que se realiza puede teñirse o no. En el caso de una suspensión de leche u otros alimentos con alto contenido graso, es necesario eliminarlo antes, por ejemplo, lavando el frotis seco con xilol. El colorante Newman elimina la grasa y a la vez tiñe, pero no sirve si quiere efectuarse una tinción Gram.

Método de Breed

Esta prueba se utiliza mucho en la industria láctea ya que proporciona una idea rápida del n° de microorganismos de un producto lácteo.

Procedimiento:

- 1.-Partir de una suspensión, sea dilución o no, que contenga unas 20 células por campo.
- 2.-En un porta desengrasado se delimita un área de 1 cm² con una cuadrícula metálica. Sobre este cm² se coloca 0,01 ml de leche o de muestra.

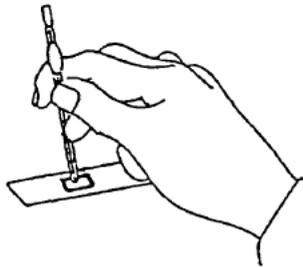
3.-Fijar y teñir la preparación y observar al microscopio con objetivo de inmersión.

4.-Contar el nº de microorganismos de varios campos y hallar la media. Con un micrómetro ocular contrastado, se mide el radio del campo microscópico (r_{mm}), siendo la superficie del campo $3,1416 \times r^2 \text{ mm}^2$, en este habrá una media de (A) microorganismos. En 1 cm^2 en el cual hemos depositado $0,01 \text{ ml}$ de muestra habrá (a) microorganismos:

$$\begin{array}{r} r^2 \times 3,1416 \text{ mm} \text{-----} A \\ 100 \text{ mm} \text{-----} a \\ \\ 0,01 \text{ ml} \text{-----} a \\ 1 \text{ ml} \text{-----} M \end{array}$$

Siendo M el nº de microorganismos por ml.

Al contar se consideran los grupos de células (grumos), por ejemplo, una cadena de estreptococos, como una sola ya que estos grupos darán lugar a una única colonia, al igual que una célula individual.



Modo de determinar el área en el protaobjetos en el método de Breed

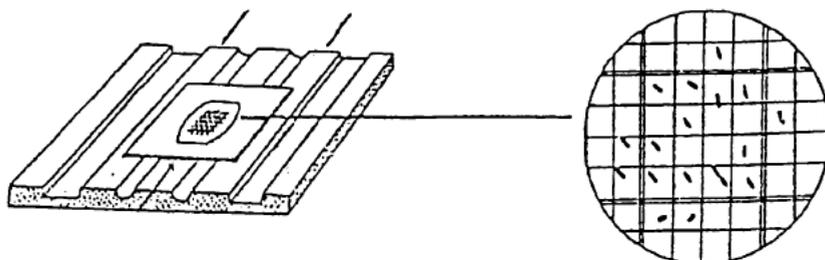
Conteo con cámara de recuento

Otro modo de hacer un conteo microscópico directo es utilizando cámaras especiales como las de Thomas, de Petroff-Hauser, de Neubauer etc.

Estas cámaras son unos portas especiales que tiene grabada una superficie cuadrículada exactamente medida. Sobre ella se pone la suspensión de la muestra de la que se quiere determinar el nº de microorganismos y, al ser cubierta por un cubreobjetos, se delimita un volúmen exacto sobre cada cuadro. Este volúmen, así como la superficie del cuadrado más pequeño viene indicado en el mismo porta.

Procedimiento:

- 1.-Homogeneizar el medio que se va a contar. Si el nº de células por cm^3 es muy alto, hacer diluciones.
- 2.-Con ayuda de una pipeta se deposita asépticamente, sin tocar la cámara, dos gotas sobre las cuadrículas. Es necesario operar rápidamente ya que los microorganismos tienden a acumularse en el extremo inferior de la pipeta.
- 3.-Colocar el cubreobjetos y esperar unos minutos a que la células se depositen.
- 4.-Observar la preparación al microscopio y contar las células presentes en varios cuadros de áreas distintas y hacer la media de los valores obtenidos.
- 5.-Teniendo en cuenta los valores de volúmen y áreas que se indican en la cámara de conteo, así como el factor de dilución en su caso, determinar el nº de microorganismos por ml de muestra.



Cámara de recuento y observación al microscopio

Normas de conteo:

-Evitar contar dos veces la misma célula. Para ello hay que adoptar una regla con las células que estén sobre los lados de los cuadrillos: las que estén

sobre las líneas horizontales se consideran pertenecientes al cuadrado de abajo; las que estén sobre líneas verticales, al cuadrado de la derecha.

-En caso de conteo de levaduras, las gemaciones se cuentan como media levadura.

-Tener en cuenta que el error que se comete con este método de conteo suele ser por defecto y los resultados son sólo aproximados.

I.6.-SEGUIMIENTO DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

Para seguir el curso del crecimiento es necesario efectuar medidas cuantitativas. El crecimiento exponencial es, por lo general, equilibrado de modo que para determinar la velocidad de crecimiento puede utilizarse la medición de cualquier propiedad de la biomasa. Una de ellas es la determinación de la masa celular y el método más empleado es un método óptico, consistente en la determinación de la cantidad de luz absorbida por una suspensión de células.

El espectrofotómetro es adecuado para estimar la densidad poblacional (número de células por unidad de volumen de la suspensión celular) y cuando se calibra con suspensiones bacterianas de densidad conocida, constituye un método exacto y rápido de determinar la masa celular por unidad de volumen del cultivo.

Procedimiento:

1.-Preparar 200 ml de caldo de peptona (10 g de peptona de soja, 5 g de NaCl en 1000 cc de agua destilada. Ajustar el pH).

2.-Esterilizar el caldo en uno de los matraces diseñados especialmente para el seguimiento del crecimiento bacteriano. Estos matraces permiten, gracias al tubo que presentan, realizar medidas seriadas de la absorbancia de su contenido sin modificar las condiciones de esterilidad del cultivo (ver figura).

¡Atención!, son extremadamente frágiles y deben manejarse con cuidado.



Matriz para el seguimiento del crecimiento bacteriano mediante medidas de absorbancia

Para la esterilización, introducir los matraces y su contenido, bien cerrados, en el autoclave durante 20 minutos a 120°C.

3.-Una vez los matraces alcancen la temperatura ambiente, inocular su contenido con un inóculo de un cultivo puro de la bacteria cuya velocidad de crecimiento se quiere determinar.

4.-Realizar medidas a tiempo cero y a distintos intervalos de tiempo, de la absorbancia del cultivo a 550 nm mediante espectrofotómetro. Con los datos obtenidos, trazar la curva de evolución de la absorbancia en el tiempo.

Los resultados se compararán con los obtenidos por otros grupos de prácticas. Para ello, las incubaciones se realizarán a distintas temperaturas (ambiente, en estufa a 37°C, en baño termostático a 45°C...), partiendo de distintas condiciones iniciales (ajustar pH del medio de cultivo a 5.0, 7.0, 8.5...) ,partiendo de inóculos de diferentes tipos de bacterias...

II . BACTERIAS

- II. 1.- Pruebas de identificación de enterobacterias.
- II. 2.- Pruebas de identificación de cocos G+.
- II. 3.- Antibiograma.
- II. 4.- Actividad de bacterias lácticas.

II. 1.- PRUEBAS DE IDENTIFICACIÓN DE ENTERO-BACTERIAS

1.-Cultivos selectivos: Agar MacConkey.

Composición del medio:

Peptona.....	17 g
Proteasa peptona.....	3 g
Lactosa.....	10 g
Sales biliares.....	1.5 g
ClNa.....	5 g
Agar.....	13.5 g
Rojo neutro.....	0.03 g
Cristal violeta....	0.001 g
Agua destilada.....	1000 cc.
pH	7.1

Las enterobacterias no son inhibidas a determinadas concentraciones de colorantes ni por la presencia de sales biliares, lo que hace del medio MacConkey un medio de cultivo selectivo para ellas. Este medio contiene también lactosa y un indicador de pH, lo que nos permite diferenciar aquellas colonias que fermentan la lactosa con producción de ácidos (cambio de color del medio de cultivo a rojo) de las que no lo hacen.

2.-Agar triple azúcar e hierro (TSI)

Composición del medio:

Peptona de caseína.....	14 g
Peptona de carne.....	3 g
Extracto de levadura.....	3 g
Glucosa.....	1 g
Lactosa.....	10 g
Sacarosa.....	10 g
Citrato amónico de hierro.....	0.2 g
ClNa.....	5 g

Tiosulfato sódico..... 0.3 g
Rojo fenol..... 0.024 g
Agar..... 12.5 g
Agua destilada.....1000 cc.
pH 7.4

El número de componentes y la concentración a la que se encuentran en este medio es muy importante para la interpretación del test:

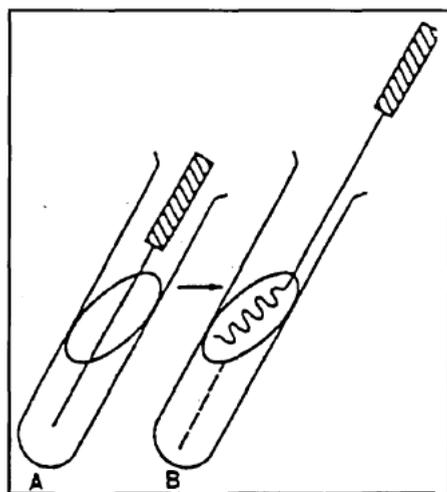
-La incorporación de proteínas hace del TSI un medio nutricional muy rico y la falta de inhibidores permite el crecimiento de casi todo tipo de microorganismos. Es pues muy importante realizar la siembra a partir de un cultivo puro.

-La lactosa está presente en el medio a una concentración diez veces mayor que la glucosa.

-La presencia de tiosulfato de sodio y de citrato amónico de hierro que permitirán la formación de sulfuro de hierro en ciertos casos.

-El rojo de fenol usado como indicador es amarillo por debajo de un pH 6.8 por lo que podemos visualizar, por variación del color, si existen cambios de acidez en el medio.

El cultivo en TSI se realiza en tubos en slant sembrando en dos zonas: una que queda en contacto con el aire (zona aeróbica) y otra en la parte profunda, que está protegida del mismo (zona relativamente anaeróbica). El siguiente gráfico es ilustrativo de la manera en que se realiza la siembra.



Modo de realizar la siembra de un tubo de TSI

Una vez sembrado el inóculo, el slant se coloca en la estufa a 37° C durante 24 horas. Pasado este tiempo podemos encontrar las siguientes reacciones:

A.-Muchos microorganismos pueden reducir el tiosulfato a sulfato de hidrógeno. Este reacciona con el hierro presente en el medio para dar sulfuro de hierro, de color negro. Esta reacción es característica de los organismos que no fermentan la lactosa y producen sulfuro de hidrógeno (SH₂, gas).Típico de los géneros *Salmonella*, *Arizona*, *Citrobacter* y algún *Proteus*.

B.-Microorganismos que son incapaces de fermentar la glucosa o lactosa. No existe pues cambio en el color del medio. Característico de las bacterias no fermentadoras, como *Pseudomonas*. El slant queda alcalino (color rojo) en aerobiosis y anaerobiosis por liberación de aminas a partir de las proteínas.

C.-Organismos que solo fermentan la glucosa. En aerobiosis, los ácidos producidos en la fermentación de la glucosa quedan neutralizados por las aminas formadas en la decarboxilación oxidativa de las proteínas. Característico de las bacterias que no fermentan la lactosa (*Salmonella*). El slant queda alcalino (rojo) en aerobiosis y ácido (amarillo) en anaerobiosis.

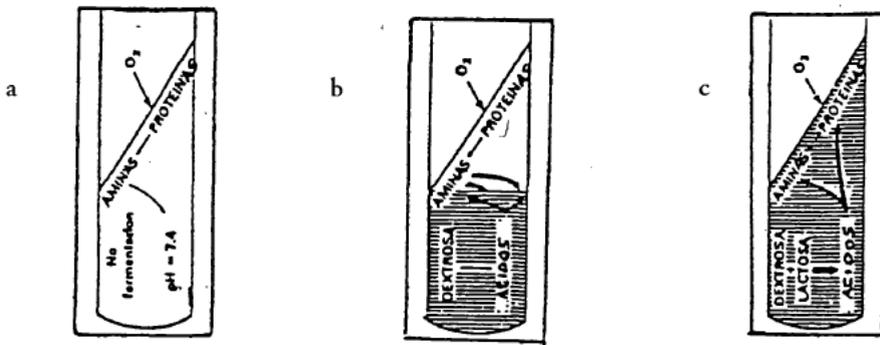
D.-Organismos que fermentan la lactosa y la glucosa. En esta fermentación, debido a la alta concentración de lactosa, se produce tal cantidad de ácidos que

estos no pueden ser neutralizados por las aminas formadas en la decarboxilación oxidativa de las proteínas. Típico de las bacterias coliformes fermentativas como *E. coli* y *Klebsiella*. El slant queda ácido (amarillo) en aerobiosis y anaerobiosis.

En la fermentación puede haber producción de gas. Esto se traduce en un levantamiento del agar.

Las siguientes figuras recogen el aspecto del slant en las reacciones B, C y D.

(□=rojo, ▨=amarillo):



Diferentes aspectos que puede mostrar un cultivo de TSI tras su incubación

3.-I.M.V.I.C.

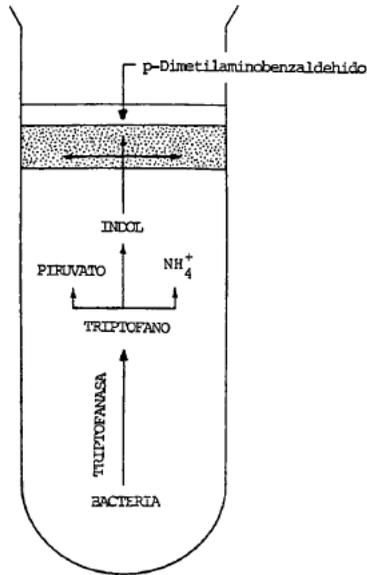
El I.M.V.I.C. es una serie de pruebas que agrupa los test del Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato.

A.-Indol

El medio para esta prueba es un caldo de peptona que contiene gran cantidad de triptófano (su composición es: 10 g de peptona de soja, 5 g de NaCl en 1000 cc de agua destilada a un pH 7.2). Las bacterias que poseen Triptofanasa metabolizan el aminoácido con producción de piruvato, NH_4^+ e indol. Este reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehído dando un producto rojo que es extraído con cloroformo. El reactivo de Kovac contiene ambos productos y así,

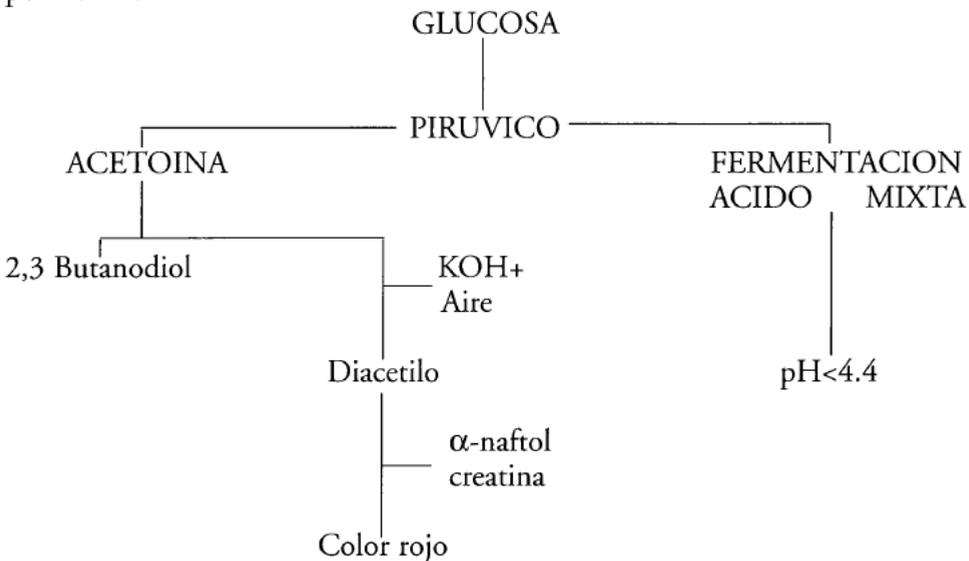
basta con añadir unas gotas del mismo al medio donde han crecido las bacterias y agitar para que se forme un anillo rojo en la superficie si la prueba es positiva.

Prueba del Indol

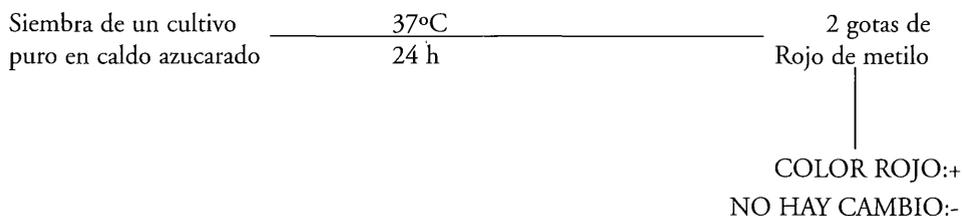


B.-Rojo de metilo (RM), Voges-Proskauer (VP)

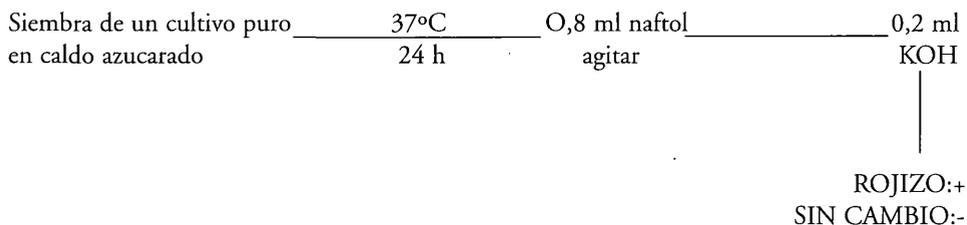
El siguiente esquema muestra dos alternativas del metabolismo del piruvato por las Enterobacterias:



I.-Los fermentadores ácido-mixtos acidifican a $\text{pH} < 4.4$. El viraje en el pH tras incubación (24 h a 37°C) se detecta por la adición de un indicador de pH, el Rojo de Metilo, al medio:



II.-Alternativamente, el ácido pirúvico puede ser metabolizado hacia la producción de 2,3 butanodiol. En presencia de O_2 y en medio básico (adición de KOH) la acetoína se oxida a diacetilo. El diacetilo reacciona con el α -naftol para dar un color rojizo.



Composición del caldo:

Fosfato dipotásico..... 5 g
 Peptona tamponada... 7 g
 Dextrosa..... 5 g
 Agua destilada.....1000 cc pH 6.9

C.-Citrato

El objeto de esta prueba es determinar si una bacteria puede utilizar el citrato como única fuente de carbono. La composición del medio es:

Sulfato magnésico 0,2 g
 Fosfato monoamónico 1 g

Fosfato dipotásico	1 g
Citrato sódico	2 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
Azul de bromotimol	0,008 g
Agua destilada	1.000 cc
pH 6,8	

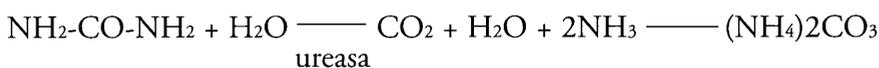
La única fuente de carbono y energía de este medio es el Citrato sódico y por tanto en él sólo crecen las bacterias que emplean el citrato. Estas bacterias al desarrollarse emplean también necesariamente el fosfato monoamónico con liberación del NH_4^+ y basificación del medio. El viraje de un indicador (azul de bromotimol, verde a pH 6, azul a pH 7.6) denuncia por tanto la utilización del citrato.

El citrato se utiliza por incorporación directa al ciclo de Krebs y por tanto requiere aerobiosis (siembra en la superficie). Es característica de *Enterobacter aerogenes*.

Siembra en superficie	37°C	VIRAJE AZUL:+
del cultivo puro	24 h	

4.-UREA

Hay muchas especies de microorganismos que poseen un enzima, ureasa, capaz de hidrolizar la urea, según la siguiente reacción:



Esto produce una alcalización del medio con cambio de color del indicador rojo-fenol que, frente a un aumento del pH se visualiza como rojo. Es una reacción típica de *Klebsiella*.

Siembra en superficie	37°C, 24h	VIRAJE ROJO:+
de la colonia		

Composición del medio:

Peptona.....	1 g
NaCl.....	5 g
Dextrosa.....	1 g
Potasio fosfato monobásico	2 g
Urea.....	20 g
Rojo fenol.....	0,012 g
Agua destilada.....	1000 cc pH 6.8

Se preparan 100 ml de esta base que se esterilizan por filtración y se añaden a una disolución de 15 g de agar en 900 ml previamente esterilizada en el autoclave cuando ésta se ha enfriado a 50-55°C.

5.-MOVILIDAD

La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de una especie. Las bacterias se mueven por medio de flagelos cuyo número y ubicación varía en las diferentes especies.

Para poner de manifiesto la movilidad se utiliza un medio semisólido cuya composición es la siguiente:

Extracto de carne.....	3 gr
Peptona.....	10 gr
Cloruro sódico.....	5 gr
Agar.....	4 gr
Agua destilada.....	1000 cc pH 7.3

El medio se inocula verticalmente y se incuba durante 24 h a 37° C. La movilidad se observa por un halo de crecimiento alrededor de la zona de inoculación.

6.-CONFIRMACION SEROLOGICA DE SALMONELLA

Esta confirmación se lleva a cabo por aglutinación en porta.

En un portaobjetos bien limpio se coloca una gota de antisuero O polivalente (poli A-I y Vi) que se emulsionará con unas colonias de cultivo puro de la cepa en estudio. Observar si se produce aglutinación sobre un fondo oscuro. Si la cepa aglutina, la reacción se considera positiva, en cuyo caso se mandaría a un centro de referencia (Majadahonda) para el completo serotipado con sueros monovalentes.

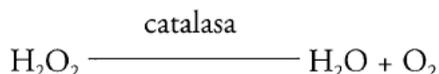
Características de algunas especies de Enterobacterias

	TSI	Indol	RM	VP	Cit.	Urea	Mov.	Lac
<i>Citrobacter freundii</i>	A/A/+ +	-	+	-	+	-	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A/A/+ -	-	-	+	V ⁺	+	-	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	A/A/+ -	+	-	+	V ⁺	+	-	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	A/A/+ -	-	-	+	+	-	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i>	A/A/+ -	-	-	+	+	-	+	V
<i>Proteus mirabilis</i>	R/A/- -	-	+	-	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	A/A/+ -	+	+	-	-	-	+	+
<i>Salmonella spp.</i>	R/A/+ +	-	+	-	+	-	+	-
<i>Shigella spp.</i>	R/A/- -	V	+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia spp.</i>	A/A/- -	V	+	-	-	-	+ a 22° C - a 37° C	V

II.2.-PRUEBAS DE IDENTIFICACION DE COCOS GRAM +

1.-Prueba de la Catalasa

La catalasa es un enzima (hemoproteína) que detoxifica el H_2O_2 producido como consecuencia de la respiración oxibióntica:



Para realizar esta prueba el procedimiento es el siguiente:

1.-Con un asa de siembra transferir células del cultivo a identificar a un portaobjetos limpio.

2.-Añadir una o dos gotas de agua oxigenada al 3%. Es recomendable que los organismos no sean añadidos directamente sobre el reactivo ya que las asas de siembra que se usan contienen hierro y pueden dar falsas reacciones positivas.

La presencia de gas o efervescencia significa que el test es positivo. Como algunas bacterias poseen enzimas diferentes de la catalasa pero capaces también de descomponer el agua oxigenada, las pequeñas burbujas que se forman después de los 20 ó 30 primeros segundos no son consideradas como test positivo.

2.-Prueba de la DNAasa

La DNAasa es un enzima hidrolítico específico para el DNA. Aunque está presente en los extractos de la inmensa mayoría de los microorganismos, sólo unas pocas especies bacterianas (como *Staphylococcus aureus*) presentan DNAasa extracelular.

Para la realización de la prueba se procede de la siguiente forma:

1.-Tome con el asa de siembra un inóculo de la bacteria a testar y transfiera-lo a la placa con el medio específico para esta prueba. El inóculo debe quedar como un botón central bastante denso.

2.-Incubar a 37°C durante 24 h.

3.-Añadir HCl 1N a la superficie de la placa. Deje actuar el reactivo durante unos minutos, transcurridos los cuales elimine sobre el fregadero el exceso de HCl.

4.-Mire la placa al trasluz. La aparición de un halo transparente alrededor del lugar de crecimiento de las bacterias significa que la prueba es positiva: el HCl solubiliza los oligonucleótidos resultantes de la hidrólisis del DNA por la acción de la DNAasa, esto produce la clarificación del medio en la zona fácilmente observable debido a la turbidez del resto de la placa en la que el DNA (molécula de gran tamaño y viscosidad) no ha sido alterado.

Composición del medio:

Triptosa..... 20 g
DNA..... 2 g
NaCl..... 5 g
Agar..... 15 g
Agua destilada.....1000 cc pH 7.3

3.-*Fermentación del Manitol*

Uno de los medios indicados para detectar la fermentación del Manitol es el medio Chapman. En él se combina la presencia de Manitol y un indicador de pH (rojo fenol) para detectar metabolitos ácidos. Contiene también una alta concentración de NaCl lo que le hace selectivo para *Staphylococcus*.

Composición del medio:

Extracto de carne..... 1 g
Peptona..... 5 g
NaCl..... 75 g

Manitol..... 10 g
 Rojo fenol..... 0.025 g
 Agar..... 15 g
 Agua destilada.....1000 cc pH 7.4

En este medio las colonias Manitol + aparecen rodeadas de un halo amarillo producido por el viraje del indicador como consecuencia de la aparición de metabolitos ácidos.

4.- *Crecimiento en Agar Bilis Esculina*

Todos los Streptococcus del grupo D de Lancefield (actualmente Enterococcus) crecen en el medio Agar Bilis Esculina, al tolerar la bilis en su crecimiento y ser capaces de hidrolizar la esculina.

Composición del medio:

Extracto de carne..... 3 g
 Peptona..... 5 g
 Esculina..... 1 g
 Sales biliares..... 40 g
 Citrato férrico..... 0.5 g
 Agar..... 15 g
 Agua destilada..... 1000 cc pH 6.6

Se siembra en placas y se observa el crecimiento y la hidrólisis de esculina mediante la presencia de un halo de ennegrecimiento alrededor de la colonia.

Interpretación de los resultados obtenidos:

	MANITOL	DNAasa	
	+	+	<i>S. aureus</i>
CATALASA +: <i>Staphylococcus</i>	-	-	<i>S. epidermidis</i>
	+	-	<i>S. saprophyticus</i>
CATALASA -: <i>Streptococcus</i>	Grupo D:	Bilis esculina +	

II.3.-ANTIBIOGRAMA

El método se basa en la capacidad de inhibición del crecimiento de una cepa bacteriana por la acción de un antibiótico. Se expresa en función del diámetro (en mm) del halo de "no crecimiento" formado alrededor del disco del antibiótico en la superficie de un medio de cultivo sembrado con la bacteria a estudiar.

Procedimiento:

1.-Se toma con el asa de siembra previamente esterilizada 2-3 colonias de un cultivo bacteriano reciente y se suspende en 3-5 ml de suero salino estéril.

2.-Se introduce el hisopo de algodón estéril en la suspensión bacteriana y se elimina el exceso de líquido por rotación del hisopo sobre la pared interna del tubo, por encima del nivel del líquido.

3.-Se inocula la superficie de una placa de Muller-Hinton con el hisopo de algodón, de forma que se consiga una distribución homogénea que cubra todo el agar.

4.-Colocar rápidamente los discos de antibióticos con una pinza sobre la superficie del agar, a una distancia mínima unos de otros de 2 cm presionándolos ligeramente con el fin de asegurar el contacto con el agar.

5.-Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 24 h.

6.-Se miden los halos de inhibición (expresados en mm) y se caracteriza a la bacteria como sensible, intermedia o resistente a cada uno de los antibióticos analizados.

Interpretación:

Tan pronto como el disco impregnado en el antibiótico toma contacto con la superficie húmeda del agar, el agua es absorbida por el papel de filtro y el anti-

biótico difunde por el medio circundante. A medida que aumenta la distancia al disco, hay una reducción logarítmica de la concentración del antibiótico. Las bacterias crecerán hasta una distancia del disco equivalente a la concentración mínima que inhibe su desarrollo.

El diámetro de inhibición depende de la sensibilidad propia del microorganismo y de ciertas propiedades fisicoquímicas del antibiótico que, "in vitro", influyen sobre la difusión en el agar. Por tanto, los diámetros mínimos de inhibición correspondientes a "sensible" dependen del tipo del antibiótico (ver Tabla I). Por último, hay que advertir que la sensibilidad "in vitro" no se correlaciona necesariamente con la actividad del antibiótico "in vivo".

Similar al antibiograma y con el mismo fundamento, es el método empleado para la detección de antibióticos o sustancias inhibitoras (anticuerpos procedentes de la presencia de calostro, por ejemplo) denominado Método del disco. Para su realización se emplea como bacteria de referencia *Bacillus subtilis* o *B. stearothermophilus* con la que se siembra la placa. Sobre ella se colocan discos similares a los empleados en el antibiograma realizado pero empapados en las muestras de leche a examinar. También suelen colocarse discos de referencia con distintas concentraciones de penicilina. Se incuban las placas y se interpreta la presencia o ausencia de halos de crecimiento mediante los criterios indicados.

Esta prueba es de gran importancia en industrias lácteas que emplean microorganismos en la elaboración de sus productos (quesos, leches fermentadas, yogur, etc.) ya que la presencia de sustancias inhibitoras en la leche de partida impediría el desarrollo de los mismos y, en consecuencia, la obtención de los productos deseados.

Diámetros de inhibición y sensibilidad frente a diversos antibióticos

ANTIBIOTICO	µg (o unidades) por disco	Diámetro del halo de inhibición (mm)		
		R(≤)	I	S(≥)
AMIKACINA	30	14	15-16	17
AMPICILINA: organismos entéricos G-	10	11	12-13	14
estafilococos	10	20	21-28	29
<i>Haemophilus spp.</i>	10	19	-	20

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA

AZIOCILINA	75	14	15-17	18
BACITRACINA	10 unidades	8	9-12	13
CARBENICILINA: <i>Proteus spp.</i> y <i>E. coli</i>	100	17	18-22	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	13	14-16	17
CEFAMANDOL	30	14	15-17	18
CEFALOTINA	30	14	15-17	18
CEFAZOLINA	30	14	15-17	18
CEFOPERAZONA	75	15	16-20	21
CEFOTAXIMA	30	14	15-19	20
CEFOXITINA	30	14	15-17	18
CEFTIZOXIMA	30	14	15-19	20
CEFUROXIMA	30	14	15-17	18
CINOXACINA	100	14	15-18	19
CLORAMFENICOL	30	12	13-17	18
CLINDAMICINA	2	14	15-16	17
COLISTINA	10	8	9-10	11
DOXICICLINA	30	12	13-15	16
ERITROMICINA	15	13	14-17	18
ESTREPTOMICINA	10	11	12-14	15
GENTAMICINA	10	12	13-14	15
KANAMICINA	30	13	14-17	18
LINCOMICINA	2	14	15-16	17
METICILINA	5	9	10-13	14
MINOCICLINA	30	14	15-18	19
MOXALACTAM	30	14	15-19	20
NAFCILINA	1	10	11-12	13
NALIDIXICO, ACIDO	30	13	14-18	19
NEOMICINA	30	12	13-16	17
NETILMICINA	30	12	13-14	15
NITROFURANTOINA	300	14	15-16	17
NOVOBIOCINA	30	17	18-21	22
OXACILINA	1	10	11-12	13
PENICILINA G: estafilococos	10 unidades	20	21-28	29
otros microorganismos	10 unidades	11	12-21	
PIPERACILINA	100	14	15-17	18
POLIMIXINA B	300 unidades	8	9-11	12
RIFAMPINA	5	24	-	25
SULFONAMIDA	300	12	13-16	17
TETRACICLINA	30	14	15-18	19
TOBRAMICINA	10	12	13-14	15
TRIMETROPINA	5	10	11-15	16

VANCOMICINA	30	9	10-11	122
DIBEKACINA	10	11	12-13	14
FOSOFMICINA	75	11	12-14	15
ACIDO FUSIDICO	10	19	-	20
MEZLOCILLINA	75	12	13-15	16
SISOMICINA	10	12	13-14	15

II.4.-ACTIVIDAD DE BACTERIAS LACTICAS

En esta práctica se comprobará la producción de ácido láctico y la consiguiente acidificación del medio, por parte de las bacterias del ácido láctico presentes en el yogur: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*.

Procedimiento:

1.-Mezclar con 200 ml de leche, previamente calentada en baño termostático a 40°C, dos cucharadas de yogur comercial.

2.-Rápidamente determinar el pH de la mezcla mediante pHmetro. Tomar una muestra de 10 ml y enfriarla introduciéndola en agua con hielo.

3.-Colocar la mezcla leche-yogur en el baño a 40°C y poner en marcha el cronómetro.

4.-Determinar el contenido en ácido láctico de los 10 ml extraídos mediante valoración frente a una disolución 0,1 N de NaOH, usando como indicador fenoftaleína.

5.-A distintos intervalos de tiempo se procederá de la misma manera que a t=0: medir el pH de la mezcla leche-yogur y determinar su contenido en ác. láctico por valoración de muestras de 10 ml extraídas de la misma.

6.-Con los datos obtenidos elaborar una gráfica que refleje la evolución del pH y del contenido en ác. láctico de la mezcla leche-yogur en el tiempo.

III . LEVADURAS



- III. 1.- Morfología.
- III. 2.- Fermentación de azúcares.
- III. 3.- Capacidad de esporulación.
- III. 4.- Asimilación de nitratos.
- III. 5.- Medida de velocidad de producción de CO₂.

III.1.-MORFOLOGIA

La observación microscópica de levaduras (hongos unicelulares y, por tanto, microorganismos eucariotas) permite distinguir tanto sus rasgos morfológicos como la formación de yemas, cicatrices de gemación etc.

Para una mejor diferenciación, se realizará una tinción simple empleando como colorante Safranina al 0,5%.

III.2.-FERMENTACION DE AZUCARES

La capacidad de las distintas levaduras para fermentar un tipo determinado de azúcares se estudia mediante el empleo de tubos con medio de cultivo líquido en cuyo fondo se coloca, en posición invertida, una pequeña campana de vidrio (campana Durham) cuya finalidad es la de recoger las burbujas de CO₂ que se desprenderán en el caso que se produzca fermentación.

Procedimiento:

1.-Llenar los tubos de ensayo con 5 ml de Agua de levadura (extracto de levadura al 0,5%). Introducir en cada uno la campana Durham invertida, tapar y esterilizar en el autoclave. Advertencia: en el empleo de campanas Durham y con el fin de evitar que queden burbujas de aire atrapadas en ellas, se dejará que el autoclave alcance la temperatura ambiente antes de abrirlo.

2.-Añadir el azúcar a ensayar en la cantidad necesaria para que su concentración final en el medio sea del 2%. Para ello se partirá de disoluciones de azúcares del 10% y el volumen a añadir se esterilizará mediante filtración.

3.-Inocular con las levaduras en estudio.

4.-Incubar de 24 a 48 h a 25°-30°C y observar la aparición o no de burbujas de CO₂ en las campanas.

III.3.-CAPACIDAD DE ESPORULACION

Esta prueba estudia la capacidad de reproducción sexual de la levadura.

Las esporas son formas de resistencia de las levaduras: poseen una extraordinaria resistencia al calor, sequedad, irradiación y agentes químicos. La espora se produce en el interior de la célula vegetativa con el tamaño, forma y posición característica de la especie a la que pertenece.

Procedimiento:

1.-Siembre la levadura a estudiar en tubos en slant conteniendo el medio agar Gorodkova. Este medio favorece la formación de esporas en las especies capaces de esporular y su composición es la siguiente:

-Peptona..... 1 g
-Glucosa..... 0,25 g
-NaCl..... 0,50 g
-Extracto de carne.1 g
-Agar..... 2 g
-Agua destilada..100 cc

2.-Incubar de cinco a seis días a 25°-30°C.

3.-Realice una tinción de esporas y observe al microscopio.

III.4.-ASIMILACION DE NITRATOS

Esta prueba se basa en la distinta capacidad de las levaduras para la obtención de energía a partir de nitratos.

Para ello se siembran las levaduras a estudiar en un medio cuya única fuente de energía es el NO_3K . Su composición es la siguiente:

- Yeast carbon base.... 11,7 g
- Nitrato potásico..... 0,78 g
- Agar..... 20 g
- Agua destilada..... 1000 cc

Una vez inoculados los tubos, se incuban a 25°-30°C. En aquellos tubos en los que las levaduras sembradas son capaces de asimilar el nitrato se observará crecimiento. Por el contrario, si no son capaces de asimilarlo el desarrollo será nulo.

III.5.-MEDIDA DE LA VELOCIDAD DE PRODUCCION DE CO₂

Aunque esta prueba tiene un escaso valor taxonómico en general, para las levaduras vínicas sí lo tiene, y sobre todo es un procedimiento de una gran importancia y significado tecnológico.

Se entiende por poder fermentativo la medida del porcentaje (v/v) de etanol que una cepa de levadura es capaz de producir.

Procedimiento:

1.-En matraces de 100 ml se distribuyen 50 ml exactos de mosto de uva fresco diluído hasta unos 12° Baumé, se cierran con tapón de algodón y se esterilizan en el autoclave a 115°C durante 15 minutos.

2.-Se inoculan los matraces con cultivos jóvenes de las levaduras a estudiar.

3.-Se sustituyen los tapones de algodón por válvulas Müller con ácido sulfúrico concentrado, que evitan la entrada de oxígeno y permiten la salida de CO₂.

4.-Una vez sembrados, se pesan los matraces, operación que se repite

diariamente hasta que se alcance un peso constante, para de este modo poder medir por diferencia de peso, el anhídrido carbónico formado.

5.-Calculando la diferencia entre la primera pesada y la última, y multiplicando esta diferencia por el factor 2,5, se obtiene el valor del poder fermentativo expresado en % de alcohol en volumen. ¹

El cálculo de este factor se realiza de la manera siguiente:

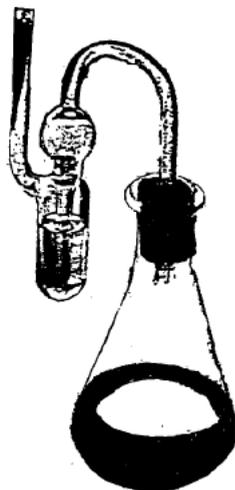
180 g de glucosa producen al fermentar 88 g de CO₂ y 92 g de etanol, por lo que a 1 g de CO₂ le corresponden 1,04 g de etanol y considerando la densidad del etanol como 0,79, los 1,04 g ocupan un volumen de 1,3 ml.

La diferencia de peso en gramos (p) multiplicada por 1,3 dará el volumen de etanol producido.

$$\begin{array}{l} 50 \text{ ml mosto} \text{ ————— } 1,3 \times p \text{ ml de etanol} \\ 100 \text{ ml mosto} \text{ ————— } X \text{ ml de etanol} \end{array}$$

$$X = \frac{1,3 \times 100 \times p}{50} = 2,6 \times p$$

En la práctica se multiplica por 2,5 dado que existe una contracción de volumen al mezclarse el etanol que se produce con el medio acuoso.



Matraz con válvula Müller para la determinación del poder fermentativo

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA

Características de algunas especies de Levaduras

	MORFOLOGIA	GLU	GAL	MAL	SAC	ESPORAS	NITRATOS
<i>Hansenula saturnus</i>	Ovoide	+	+	-	+	+	+
<i>Rhodotorula rubra</i>	Ovoide	+	-	+	-	-	-
<i>Kloeckera apiculata</i>	“Limón”	+	+	-	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Alargada	+	+	+	+	+	-
<i>Saccharomyces uvarum</i>	Ovoide	+	+	+	+	+	-
<i>Candida utilis</i>	Ovoide	+	+	+	+	-	+
	(pseudomicelio)						
<i>Candida lipolytica</i>	Ovoide	-	-	+	+	-	-
	(pseudomicelio)						
<i>Torulopsis candida</i>	Globosa	+	-	-	+	-	-

IV . MOHOS

IV. 1.- Métodos de Identificación de mohos.

IV.1.-METODOS DE IDENTIFICACION DE MOHOS

La identificación de los mohos (hongos filamentosos) depende en gran parte de sus características morfológicas y culturales. Deben determinarse por lo tanto:

- características de las hifas: color, septos, tamaño...
- grado de desarrollo de las estructuras de fructificación.
- tipo de estructuras de esporulación.
- características de las esporas: color, forma, tamaño, tabicación...
- grado de crecimiento (lento o rápido).
- color de la colonia y su reverso.
- textura superficial.
- presencia de exudado.
- olor.

Estos datos bastarán normalmente para que, ayudándose de las claves de identificación existentes, puedan determinarse tanto la clase y orden como la familia, género y especie del moho del que se trate.

Para obtener estos datos se procederá como sigue:

1.-*Exámen del moho in situ*

Este tipo de observación se realiza siempre en primer lugar:

-Si el moho procede de un alimento, bien sea por contaminación del mismo o por formar parte de su composición (quesos con mohos), deben observarse con ayuda de la lupa, anotándose el mayor número de características que sea posible.

-Si se trata de un cultivo en placa de Petri, colocar esta sobre la platina del microscopio, bien sea en su posición normal o invertida, y observar con luz indirecta o transmitida.

-Los cultivos en tubos de agar inclinado pueden ponerse a lo largo de

la platina, examinándose los bordes mediante luz transmitida con el objetivo de menor aumento.

2.-Realización de preparaciones

Para el exámen a mayor aumento, es necesaria la realización de preparaciones utilizándose como colorante el azul de lactofenol. Para ello se procede de la siguiente forma:

1.-Colocar sobre el portaobjetos una gota del colorante.

2.-Depositar con el asa sobre el líquido parte del micelio del moho procurando romper lo menos posible las hifas. Para ello, resulta conveniente cortar con una cuchilla estéril una pequeña porción del medio de cultivo sobre el que crece el moho y transferirlo al portaobjetos cuidadosamente.

3.-Colocar el cubreobjetos cuidando que no queden burbujas de aire y observar al microscopio.

3.-Microcultivos

En el estudio de algunas especies que producen estructuras conidióforas muy pequeñas y frágiles, el único método adecuado para hacer preparaciones microscópicas consiste en hacer cultivos en portaobjetos.

Procedimiento:

1.-Se toma una tira de aluminio, no mas ancha de 1 cm, y se dobla en Z de manera que encaje en una placa de Petri en la que previamente habremos colocado en su fondo papel de filtro. Sobre la tira de aluminio se coloca un portaobjetos y el conjunto se esteriliza por calor seco.

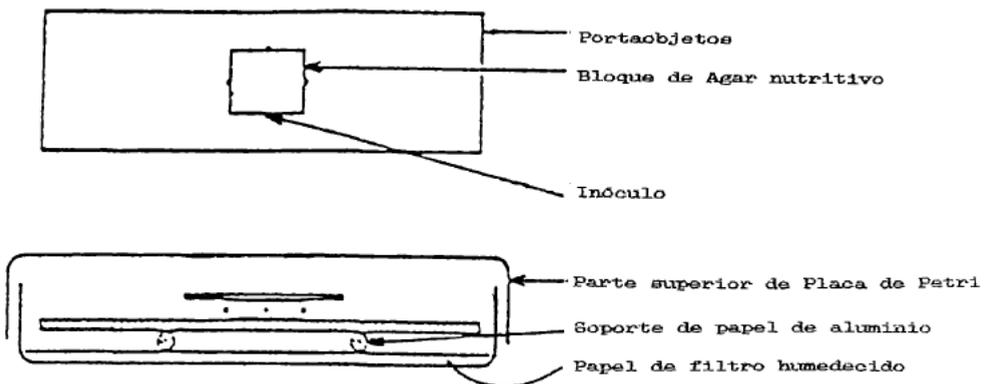
2.-En otra placa de Petri se vierte Agar malta (Extracto de malta: 20 g, agar 15 g en 1 l de agua destilada, pH 5,4) hasta una altura de unos 2 mm. Una vez solidificado se recorta con un instrumento estéril un cuadrado de 1 cm de lado aproximadamente y se coloca en el centro del portaobjetos estéril.

3.-Se inocula por los cuatro bordes y se cubre con un cubreobjetos estéril.

4.-A continuación se vierten unos 5 ml de agua destilada estéril en el fondo de la placa con lo que la capa de agar se mantiene húmeda pero no mojada.

5.-Cuando se ha alcanzado la fase de desarrollo deseada, se retira el portaobjetos. Se separa cuidadosamente el cubre de la capa de agar y se coloca, con la cara de cultivo hacia abajo, sobre un porta sobre el que se ha depositado una gota de azul de lactofenol. Por otro lado, se desprende y quita cuidadosamente la capa de agar del porta de cultivo y se realiza sobre él una segunda preparación.

6.-Observar ambas preparaciones al microscopio y anotar cuantas características sean necesarias para la identificación del moho cultivado.



Esquema de microcultivo

V. MICROBIOLOGIA ALIMENTARIA

- V. 1.- Recuento de microorganismos aerobios mesofilos.
- V. 2.- Detección y recuento de *Enterobacteriaceae* lactosa positivas (coliformes).
- V. 3.- Detección y recuento de *Escherichia coli*
- V. 4.- Detección de *Salmonella*
- V. 5.- Detección de *Staphylococcus aureus*
- V. 6.- Control microbiológico de superficies

V.1.-RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS

Son microorganismos que pueden multiplicarse en aerobiosis a temperaturas de 25°-40°C. En general, se detectan de forma óptima tras una incubación a 31°C durante 72 h, en un agar de recuento (Plate Count Agar, P.C.A.), dando lugar a colonias visibles. El conjunto de esta flora incluye gérmenes patógenos y no patógenos (saprófitos, putrefactivos...)

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos es un método que permite conocer, en conjunto, la calidad microbiológica de los alimentos sin relacionarla con la posible presencia de gérmenes patógenos. Un alimento con un recuento total elevado debe ser considerado impropio para el consumo humano.

Preparación de la muestra y de la serie de diluciones decimales

La preparación de diluciones decimales a partir de una muestra, tiene por objeto realizar, escalonadamente, diluciones progresivas del producto para poder llevar a cabo recuentos microbianos posteriormente (ver "Método de aislamiento en placa por diluciones sucesivas").

Procedimiento:

1.-Pesar 25 g del alimento en condiciones asépticas e introducirlo en una bolsa para STOMACHER estéril. Añadir 225 ml de agua peptonada al 0,1 %. (1 g de peptona en 1 l de agua destilada).

2.-Homogenizar la muestra utilizando el STOMACHER obteniendo así la suspensión madre (dilución al 1:10 del alimento). En el caso de alimentos líquidos (leche, zumo...), la suspensión madre será el mismo alimento.

3.-Preparar el número de tubos con 9 ml de agua peptonada al 1 % que sean necesarios.

4.-Transferir 1 ml de la suspensión madre a uno de los tubos mediante pipeta estéril. Mezclar bien. Desechar la pipeta usada. Esta operación se repite en 5-6 tubos (ver esquema). De esta forma se obtiene la "serie de diluciones decimales".

Método de recuento en profundidad de microorganismos aerobios mesófilos.

Procedimiento:

1.-A partir de la "serie de diluciones decimales", depositar con pipeta estéril 1 ml de cada dilución en tantas placas de Petri estériles como sea necesario. No será necesario cambiar de pipeta si se comienza desde la dilución más alta a la más baja ordenadamente.

2.-Añadir aproximadamente 15 ml de Agar Nutritivo de Recuento (P.C.A.), previamente atemperado a unos 47° C, a cada placa. El tiempo transcurrido desde que se deposita la muestra hasta que se vierte el medio de cultivo no debe sobrepasar los 10 minutos.

Composición del medio P.C.A.:

Triptona..... 5 g
Extracto de levadura.. 2,5 g
Dextrosa..... 1 g
Agar..... 12 g
Agua destilada..... 1000 cc pH 7,0

3.-Mezclar perfectamente el medio y el inóculo con movimientos circulares de la placa a favor y en contra de las agujas del reloj, y otros tantos en ángulo recto, evitando siempre que el medio impregne la tapa.

4.-Mantener las placas en superficie horizontal hasta que se solidifique el agar completamente.

5.-Invertir la placas e introducirlas en la estufa evitando que se apilen en exceso. Incubar a 31°C durante 72 horas.

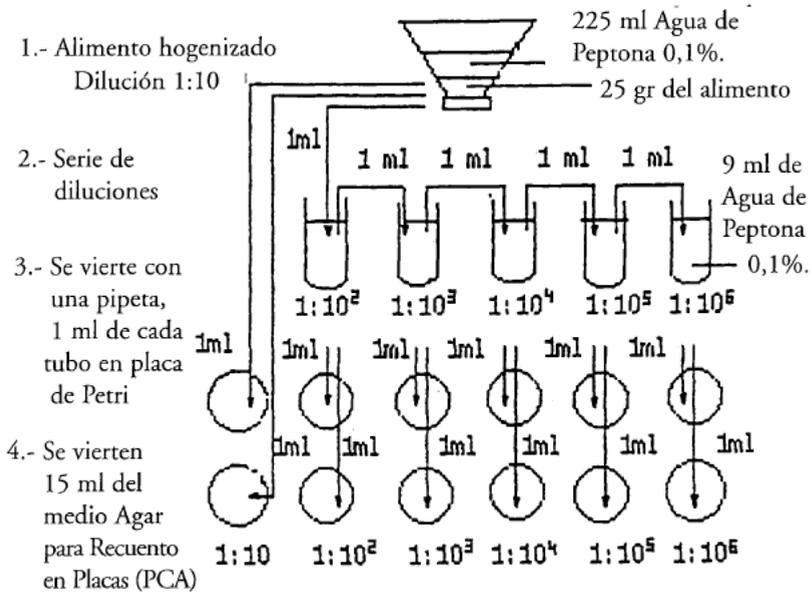
6.-Después del periodo de incubación se cuentan las colonias de aque-

llas placas en las cuales sean visibles entre 30 y 300 colonias, que se irán marcando para evitar volver a ser contadas. El número total de colonias contadas, multiplicado por el factor de dilución de la placa elegida, será el recuento total de colonias por gramo o mililitro de alimento.

Los recuentos también pueden realizarse por otros métodos:

- Medio sólido: Método por siembra en superficie.
- Medio líquido: Método del Número Más Probable (NMP).
- Recuento por examen microscópico directo.

RECUESTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS



Procedimiento a seguir en la realización del recuento de microorganismos aerobios mesófilos en un alimento

V.2.-DETECCION Y RECUESTO DE *ENTEROBACTERIA- CEAE* LACTOSA POSITIVAS (COLIFORMES)

Para la detección de *Enterobacteriaceae* lactosa positivas (coliformes), se aprovechan ciertas características que las diferencian de otras *Enterobacteriaceae* como, por ejemplo, su capacidad de fermentar lactosa con producción de ácido en presencia de sales biliares. Las coliformes incluyen los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klesiella*.

Se encuentran en el intestino humano y de animales, pero también en otros ambientes como suelo, plantas, etc, por lo que como indicadores de contaminación fecal no presentan buena especificidad. A pesar de ello se utilizan por su frecuencia en heces, su fácil detección y por presentar unas características muy semejantes a las de los géneros patógenos de Enterobacterias.

Para la detección de coliformes utilizaremos un caldo lactosado con sales biliares y verde brillante, que es un colorante selectivo. Este medio, contenido en tubos, lleva una campana Durham para la recogida de los gases desprendidos.

Procedimiento:

1.-Se prepara la muestra del alimento homogeneizada y una serie de diluciones decimales de la misma al 1:10, 1:100 y 1:1000 (ver práctica anterior).

2.-Se preparan 3 series de 3 tubos cada una conteniendo caldo lactosado biliado al verde brillante (B.G.B.L.) con campana Durham.

Composición del caldo B.G.B.L.:

Peptona.....	10 g	
Lactosa.....	10 g	
Bilis de buey.....	20 g	
Verde brillante.....	0,0133 g	
Agua destilada.....	1000 g	pH 7,4

3.-A cada uno de los tubos de la primera serie se les añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:10

4.-A cada uno de los tubos de la segunda serie se les añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:100

5.-A cada uno de los tubos de la tercera serie se les añade 1 ml de la dilución del alimento al 1:1000

La lectura consiste en observar si se ha producido desprendimiento de gas, por lo menos en un 20 % del volumen de la campana de Durham, como consecuencia de la fermentación de la lactosa, tras incubación de los tubos a 31°C durante 24-48 h. En caso afirmativo, el resultado es positivo.

Con los resultados obtenidos se acude a las Tablas del Número Más Probable (NMP). Estos resultados se expresarán como Número de Coliformes/gramo o mililitro de alimento.

Tubos positivos			NMP por gramo o mililitro
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
0	0	0	<3
0	0	1	3
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	1	1	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
2	2	1	28
3	0	0	23
3	0	1	39

3	0	2	64
3	1	0	43
3	1	1	75
3	1	2	120
3	2	0	93
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	240
3	3	1	460
3	3	2	1100
3	3	3	>2400

V.3.-DETECCION Y RECuento DE *ESCHERICHIA COLI*

E. coli es el coliforme más estrechamente relacionado con fuente fecal y el testigo más específico de contaminación fecal reciente. Su presencia en agua o alimentos significa contacto con heces reciente y, siempre, falta de higiene en la preparación de los alimentos.

La detección y recuento de *E. coli* en alimentos la realizaremos a partir de los coliformes obtenidos en el caldo lactosado biliado verde brillante en la práctica anterior.

Procedimiento:

Con el asa de cultivo, se subcultivan todos los tubos positivos obtenidos en la detección de coliformes en la práctica anterior en tubos conteniendo 10 ml de caldo lactosado biliado al verde brillante (B.G.B.L.) con campana de Durham. Se incuban los tubos a 45°C durante 24-48 horas. Cualquier tubo que presente gas en la campana de Durham se considera *E. coli* presuntamente-

te positivo. Para su confirmación se siembran todos los tubos positivos sobre agar Levine, de tal forma que se obtengan colonias aisladas.

Composición del Agar Levine:

Peptona.....	10 g
Lactosa.....	10 g
Fosfato dipotásico.....	2 g
Eosina.....	0,4 g
Azul de metileno.....	0,065 g
Agar.....	15 g
Agua destilada.....	1000 cc pH 7,1

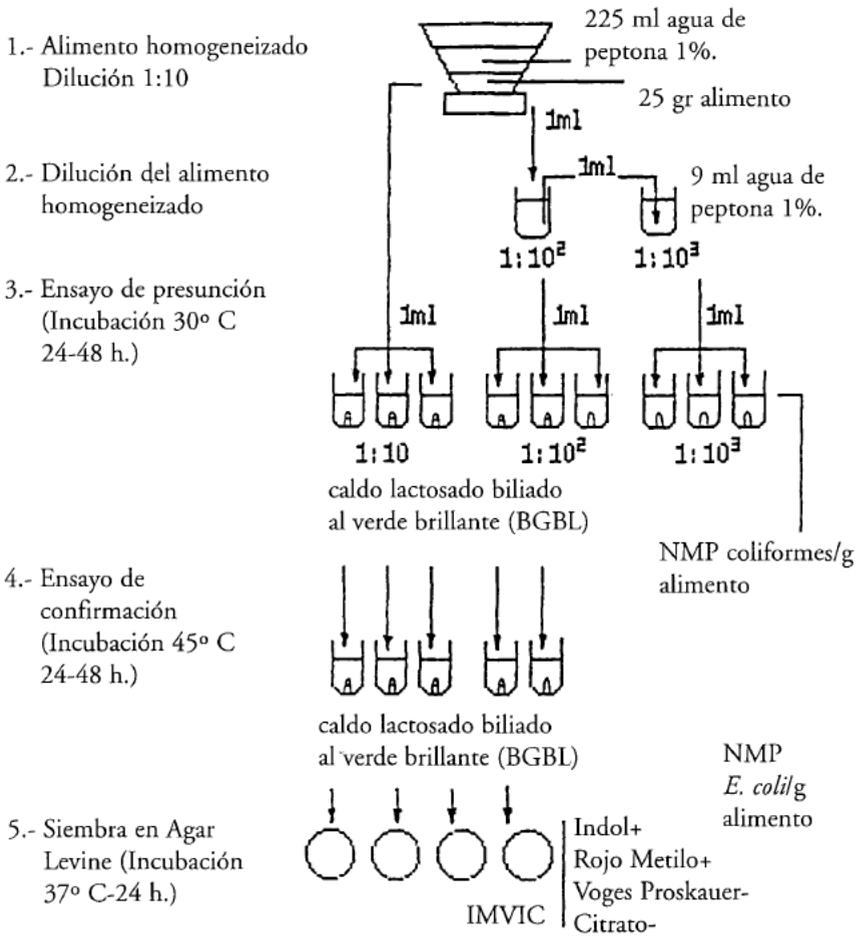
Las colonias de *E. coli* en agar Levine presentan un centro azul-negro con brillo metálico verdoso cuando se observan con luz refleja. A veces este brillo no se manifiesta.

Para confirmación de la presencia de *E. coli*, se subcultiva una colonia típica de cada placa de agar Levine en agua de peptona para la investigación de la producción de indol. *E. coli* es una de las especies bacterianas que desaminan e hidrolizan el triptófano hasta formar indol, cuya presencia se pone de manifiesto mediante la adición del reactivo de Kovacs (ver "Pruebas de identificación de Enterobacterias").

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a la formación de gas en el caldo B.G.B.L., crecimiento característico en agar Levine y producción de indol en agua de peptona, se hace la lectura en la tabla del Número Más Probable (NMP) para calcular la cifra de *E. coli*/ gramo o mililitro de alimento.

En ocasiones es necesario realizar pruebas de confirmación complementarias (I.M.V.I.C.).

RECuento DE *ESCHERICHIA COLI* Y COLIFORMES



Procedimiento a seguir en la realización de recuento de Coliformes, Coliformes fecales y *Escherichia coli* en un alimento

V.4.-DETECCION DE *SALMONELLA*

Las fuentes más importantes de *Salmonella* son los alimentos proteicos de origen animal, aunque también es posible la contaminación a partir de aguas, vegetales (ensaladas), y otros productos.

La salmonelosis humana crea un importante problema de salud pública. Los animales también padecen salmonelosis y constituyen reservorios importantes del germen.

Procedimiento:

A.-*Enriquecimiento en medios líquidos selectivos.*

Estos medios facilitan la multiplicación de *Salmonella* e inhiben el crecimiento de gérmenes competitivos. Deben reunir las siguientes características:

- Ser suficientemente selectivos.
- Mantener constantemente su selectividad
- Ser capaces de recuperar todos los serotipos.

Uno de los medios más empleados es el Caldo Selenito cuya composición es la siguiente:

Triptona.....	5 g
Lactosa.....	4 g
Fosfato disódico.....	10 g
Selenito ácido sódico.	4 g
L-cistina.....	0,01 g
Agua destilada	1000 cc pH 7,0

Para esta prueba se transfiere 1 ml de la dilución inicial (25 g del alimento más 225 ml de agua de peptona) a un tubo con este caldo (transparente). Incubar 24 h a 37°C. Tras la incubación puede apreciarse un cambio de color en el medio (naranja) debido a la transformación del selenito en selenio por los microorganismos.

Este cambio no asegura la presencia de *Salmonella* por lo que es necesario recurrir a medios selectivos-diferenciales.

B.-Aislamiento en medio selectivo-diferencial.

Se emplean los medios Hektoen y BGA (Brillant Green Agar). Estos medios están constituidos por un agar base adicionado de colorantes, sales biliares, antibióticos y/o sustancias químicas que inhiben el crecimiento de la flora competitiva. Llevan también un sistema indicador para diferenciar la *Salmonella* basado en la producción de SH₂ y/o la fermentación de determinados azúcares.

Su composición específica es la siguiente:

***Medio Hektoen:**

Peptona.....	12 g	
Extracto de levadura.....	3 g	
Sales biliares.....	9 g	
Lactosa.....	12 g	
Sacarosa.....	12 g	
Salicina.....	2 g	
Cloruro sódico.....	5 g	
Tiosulfato sódico.....	5 g	
Citrato amonio férrico.....	1,5 g	
Agar.....	14 g	
Azul de bromotimol.....	0,065 g	
Fucsina ácida.....	0,1 g	
Agua destilada.....	1000 cc	pH 7,5

***Medio BGA:**

Peptona.....	10 g
Lactosa.....	10 g
Extracto de levadura..	3 g
Sacarosa.....	10 g
Cloruro sódico.....	5 g

Agar..... 20 g
Verde brillante.. 0,0125 g
Rojo fenol..... 0,08 g
Agua destilada.....1000 cc pH 6,9

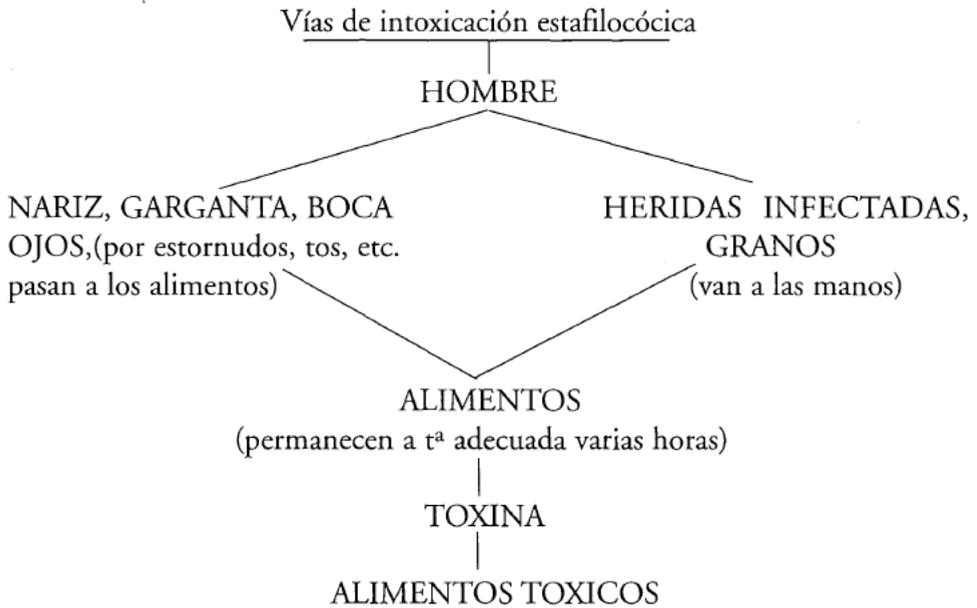
Se realiza un agotamiento por estría en Hektoen (color verde) y/o BGA (color marrón) a partir del caldo Selenito y se incuba 24 h a 37°C.

Salmonella aparecerá formando colonias rosas en medio rosa brillante en las placas de BGA mientras que en Hektoen forma colonias transparentes con punto negro (debido al SH2 formado) en medio azulado.

V.5.-DETECCION DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

En Microbiología alimentaria, el mayor interés de *S. aureus* como organismo patógeno, radica en ser el agente etiológico de brotes de intoxicación denominada estafilocócica. Lo que más interesa de este microorganismo es su capacidad para elaborar enterotoxinas extremadamente activas, que son la causa de las intoxicaciones. No todas las cepas de *S. aureus* son enterotoxigénicas.

En ocasiones no es posible aislar el microorganismo del alimento ya que puede haber muerto por calor, lisis u otro procedimiento, de forma que sólo exista en el mismo la enterotoxina previamente elaborada por el germen. Este alimento sigue siendo por tanto causa de intoxicación alimentaria.



Procedimiento:

A.-Enriquecimiento en medio líquido.

Se emplea el medio diferencial y selectivo Giolitti-Cantoni (color amarillo).
Su composición es la siguiente:

Triptona.....	10 g
Extracto de carne.....	5 g
Extracto de levadura..	5 g
Manitol.....	20 g
NaCl.....	5 g
LiCl.....	5 g
Glicina.....	1,2 g
Piruvato sódico.....	3 g
Agua destilada.....	1000 cc

pH 6,9

Una vez disuelto por ebullición, se distribuye en tubos a razón de 19 ml. Esterilizar durante 20 minutos a 121°C. Enfriar rápidamente y añadir a cada tubo 0,3 ml de una solución de telurito al 3,5%, esterilizada por filtración.

El crecimiento de *S. aureus* es estimulado por la alta concentración de manitol y la presencia de piruvato sódico. La flora competitiva es inhibida por el cloruro de litio y telurito.

Dos tubos del medio Giolitti-Cantoni se siembran con 1 ml de la muestra inicial y de la dilución 10-2 y se cubren con una capa de vaselina estéril para evitar el crecimiento de *Micrococcus* (aerobios estrictos). Incubar 24-48 horas a 37°C.

Los tubos positivos se manifiestan por la aparición de ennegrecimiento del medio debido a la reducción del telurito.

B.-Aislamiento en medio sólido selectivo.

A partir de los tubos positivos, sembrar por agotamiento por estrías placas de Baird-Parker, medio cuya composición es:

Triptona.....	10 g
Extracto de carne.....	5 g
Extracto de levadura..	1 g
Piruvato sódico.....	10 g
Glicina.....	12 g
LiCl.....	5 g
Agar.....	20 g
Agua destilada.....	1000 cc pH 7,0

Tras disolver y esterilizar, se enfría a 50°C y se añade 50 ml de emulsión estéril de yema de huevo y 3 ml de solución de telurito potásico al 3,5% esterilizado por filtración.

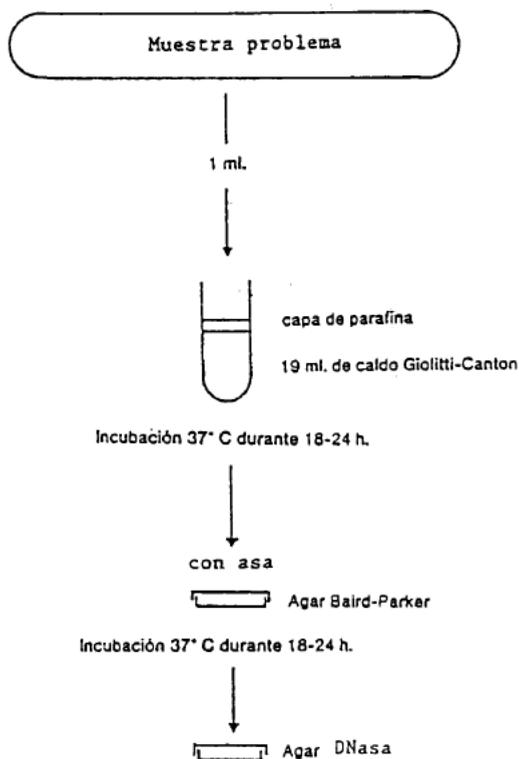
La naturaleza diferencial de este medio se basa en la capacidad de *S. aureus* para reducir el telurito a telurio dando colonias negras y a la acción de la enzima lecitinasa sobre la lecitina (yema de huevo) dando lugar a un halo alrededor de la colonia.

Incubar 24 horas a 37°C y ver resultados. Las colonias de *S. aureus* son negras, brillantes y con halo alrededor.

C.-Prueba confirmativa de poder enterotoxigénico.

Las colonias típicas de *S. aureus* crecidas en medios selectivos, deben ser confirmadas en cuanto a su poder enterotoxigénico, Esta investigación se realiza de manera indirecta, basándose en la presencia o no del enzima Desoxirribonucleasa, cuya liberación por el germen está relacionada con la producción de enterotoxina.

Para ello se realiza la "Prueba de la DNAasa" tal y como se describe en el capítulo de "Pruebas de identificación de Cocos Gram +".



Procedimiento a seguir para la determinación de la presencia o ausencia de *Staphylococcus aureus*

V.6.-CONTROL MICROBIOLOGICO DE SUPERFICIES

Los alimentos durante su procesado entran en contacto con los equipos, instrumentos, envases, embalajes, expositores, bandejas, aire, etc., los cuales pueden contaminarlos por lo que se hace necesario su control microbiológico.

Estas pruebas dan idea de la limpieza e higiene del lugar. También pueden determinar si se trata de un foco de contaminación.

A.-Análisis de superficies planas.

El método de las placas de contacto (RODAC) se recomienda para obtener datos cuantitativos de superficies planas e impermeables.

Procedimiento:

1.-Llene las placas RODAC con el medio "Agar con bilis y verde brillante". El colorante verde brillante y la bilis son selectivos para bacilos Gram -. Los bacilos Gram - capaces de fermentar lactosa forman colonias de centro rojo con halo rosa, que contrasta con un fondo verde-azulado (caso de *E.coli*). *Salmonella*, por su parte, forma colonias de incoloro a rosa claro mientras que las colonias de *Enterobacter* presentan tonos rosas.

Composición del medio:

Peptona.....	8,25 g	
Lactosa.....	1,9 g	
Bilis de buey.....	0,003 g	
Sulfito sódico.....	0,205 g	
Cloruro férrico.....	0,03 g	
Fosfato monopotásico....	0,015 g	
Agar.....	10,15 g	
Erioglaucina.....	0,065 g	
Fucsina básica.....	0,08 g	
Verde brillante.....	0,00003 g	
Agua destilada.....	1000 cc	pH 6,9

Una vez esterilizado el medio, se llenan las placas RODAC con 15.5 ml a 16.5 ml de manera que el menisco del agar sobresalga de la placa para formar una superficie ligeramente convexa con el fin de permitir el contacto con la superficie a estudiar.

2.-En la proximidad del área de estudio (mostrador, expositor, vitrina, mesa de troceado, cuchillo de corte, instrumentos de dosificación...de bares, restaurantes, comercios de alimentación...), se abre la placa y se presiona la superficie del agar sobre la superficie en estudio haciendo un ligero movimiento lateral para que todo el menisco del agar entre en contacto con la superficie.

3.-Se coloca la tapa a las placas y se incuban en posición invertida a 37°C 24-48 horas.

4.-Contar el número de colonias por cm² sirviéndose de la cuadrícula que presentan las placas RODAC. Si existe alguna colonia sospechosa, proceder a su identificación bioquímica.

B.-Análisis de superficies no planas.

Procedimiento:

1.-Se delimita la superficie a analizar con un papel de aluminio estéril de dimensiones conocidas (9 cm²).

2.-A un tubo estéril con un hisopo, se añade TSB (Tryptic Soy Broth), caldo de revitalización cuya composición es:

Triptona.....	17 g
Soitona.....	3 g
Dextrosa.....	2,5 g
Fosfato dipotásico.....	2,5 g
NaCl.....	5 g
Agua destilada.....	1000 cc pH 7,3

3.-El hisopo humedecido se pasa varias veces sobre la superficie.

4.-Tras la recogida de la muestra se deja el hisopo en el tubo de TSB para que las bacterias se revitalicen (un cuarto de hora a temperatura ambiente).

5.-Se siembra 0,1 ml en placa con Agar con bilis y verde brillante. Incubar 24 horas a 37°C.

6.-Observar el tipo de crecimiento y contar las colonias. Como en el caso anterior, si aparece alguna colonia sospechosa, proceder a su identificación bioquímica.

VI. ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS

- VI. 1.- Determinaciones microbiológicas por el método del número más probable.**
- VI. 2.- Determinaciones microbiológicas por el método de las membranas filtrantes.**

El agua es un medio que vehiculiza fácilmente microorganismos, algunos de ellos con poder patógeno y otros, aunque no patógenos, denotan una clara contaminación fecal.

Mediante las pruebas que se indican es posible determinar si la muestra de agua analizada es apta para el consumo público.

La muestra a estudiar debe reunir las siguientes condiciones:

- Debe ser representativa.
- Cantidad suficiente:
 - *250 ml para las técnicas basadas en el nº más probable (NMP)
 - *100 ml para las membranas filtrantes
- Se debe tomar en condiciones de esterilidad.
- Debe conservarse en refrigeración hasta su análisis.

VI.1.-DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS POR EL METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

Son tres:

- 1.-Aerobios mesófilos totales.
- 2.-Coliformes totales y *E. coli*.
- 3.-Estreptococos fecales.

Los grupos coliforme y estreptococo fecal son indicadores de contaminación fecal. Los indicadores son microorganismos que viven normalmente en el intestino del hombre y de los animales. Su presencia en el agua indica contaminación fecal y, por tanto, riesgo de presencia de gérmenes patógenos cuyo hábitat es también el intestino.

Para realizar las determinaciones de Aerobios mesófilos totales, Coliformes totales y *E.coli* se seguirán los procedimientos descritos en "Análisis Microbiológico de los Alimentos" si bien se empleará para la inoculación de la batería de tubos (cada uno con 10 ml del medio que se trate): 10 ml de la muestra inicial en los tres primeros, 1 ml para los tres siguientes y 0,1 ml para

los terceros. (Nota: el medio empleado en los tres primeros tubos estará a doble concentración).

En cuanto a la determinación y recuento de *Streptococos* fecales se realizarán las pruebas siguientes:

-Preparar 3 series de tres tubos con 10 ml cada uno del medio Rothe cuya composición es la siguiente:

Peptona.....20 g
Glucosa..... 5 g
NaCl..... 5 g
Potasio fosfato dibásico..... 2,7 g
Potasio fosfato monobásico 2,7 g
Azida sódica.....0,2 g
Agua destilada.....1000 cc pH 6,9

-A cada uno de los tubos de la primera serie se añade, mediante pipeta estéril, 10 ml de la muestra . Estos tubos deberán contener el medio a doble concentración.

-A cada uno de los tubos de la segunda serie se añade 1 ml de la muestra y 0,1 ml a los de la tercera serie.

-Incubar 48 horas a 37°C. Se considerarán positivos aquellos tubos que presenten enturbiamiento y/o sedimento.

-Todos los tubos positivos se someten a la prueba de confirmación. Para ello se homogeniza su contenido y con él inocular tubos conteniendo el medio Litsky. En este medio, la presencia de *Streptococos* fecales se detecta por la aparición, tras incubación 24-48 horas a 37°C, de enturbiamiento y/o sedimento de color violeta.

Composición del medio Litsky:

Peptona.....20 g
Glucosa..... 5 g

NaCl.....	5 g
Potasio fosfato dibásico.....	2,7 g
Potasio fosfato monobásico.	2,7 g
Azida sódica.....	0,3 g
Etil-violeta al 0,01%	10 ml
Agua destilada.....	1000 cc pH 6,9

-Mediante las tablas del NMP, calcular el nº de Estreptococos fecales por 100 ml de agua.

VI.2.-DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS POR EL METODO DE LAS MEMBRANAS FILTRANTES

Este método consiste en hacer pasar la muestra de agua a través de filtros de membrana estériles de 0,45 μm de diámetro. Las bacterias quedan retenidas en el filtro. Este se coloca en una placa de medio PCA y se incuba, de modo que las bacterias crecen sobre la membrana.

Procedimiento:

- Colocar el filtro sobre el kitasatos de forma que quede bien ajustado.
- Conectar el Kitasatos a una bomba de vacío que ayudará a la filtración de la muestra de agua.
- Pasar 100 ml de la muestra. Al finalizar, se retira cuidadosamente la membrana y se coloca sobre una placa de PCA.
- Incubar 24 horas a 37°C. Al ser las membranas porosas, difunden las sustancias nutritivas del medio y las bacterias crecen sobre las membrana.
- Realizar el recuento.

Si la muestra presenta alta turbidez, la filtración no es correcta y, por lo tanto, no se realiza un recuento real.

VII. MICROBIOLOGIA DE SUELOS

- VII. 1.- Aislamiento de bacterias aerobias esporuladas.
- VII. 2.- Aislamiento de *Azobacter*.
- VII. 3.- Efecto del pH en el desarrollo de microorganismos en el suelo.
- VII. 4.- Fijación biológica del nitrógeno. Observación de *Rhizobium*

VII.1.-AISLAMIENTO DE BACTERIAS AEROBIAS ESPORULADAS

Para la realización de esta práctica emplearemos los denominados cultivos de enriquecimiento. Un cultivo de enriquecimiento es aquel en el que se emplean unas condiciones (nutrientes, temperatura, pH...) que favorecen la multiplicación de un tipo de microorganismo sobre la de los demás. Por tanto, la inoculación de un medio de este tipo con una mezcla de microorganismos se traducirá, al cabo de cierto tiempo de incubación, en un cambio en las proporciones relativas de microorganismos con respecto a las existentes en el inóculo. Este tipo de medios se emplea con microorganismos que, en condiciones naturales, representan una proporción de la comunidad lo suficientemente baja para que su aislamiento directo sea poco probable.

En esta práctica se hará un tratamiento previo de la muestra que enriquecerá un tipo concreto de bacterias: el tratamiento de la muestra por calor sólo permite la supervivencia de las formas esporuladas. La incubación en aerobiosis complementa la selección.

Procedimiento:

- 1.-En un tubo de ensayo suspender una pequeña cantidad de tierra en suero fisiológico y calentar al baño María (hirviendo) durante 10 minutos.
- 2.-Enfriar, tomar una muestra con un asa estéril y sembrar abundantemente sobre dos placas de agar nutritivo.
- 3.-Incubar una placa a 37°C y otra a temperatura ambiente en la oscuridad.
- 4.-Examinar los resultados (colonias, Gram, etc.) a las 24 h y a los 4 días.

VII.2.-AISLAMIENTO DE *AZOTOBACTER*

Como en la práctica anterior, emplearemos un medio de enriquecimiento que favorece el crecimiento de un determinado tipo de bacterias atendiendo a ciertas propiedades fisiológicas. Así, el enriquecimiento del suelo con una fuente carbonada produce primeramente la multiplicación de los gérmenes heterótrofos (flora zimógena) con agotamiento del nitrógeno mineral del suelo. Cuando éste se hace limitante, los fijadores no simbióticos del N₂ prevalecen.

Procedimiento:

- 1.-Tomar una muestra de tierra de cultivo o de jardín y añadir piruvato sódico (1 g/ 100 g de tierra) y agua destilada hasta formar una pasta moldeable.
- 2.-Llenar con la pasta placas de Petri y alisar cuidadosamente su superficie.
- 3.-Introducir las placas sin cubrirlas con la tapa en una caja de plástico con un algodón empapado en agua para mantener la humedad e incubar a temperatura ambiente en la oscuridad durante 2-4 días.

Azotobacter desarrolla colonias sobre la superficie de la tierra húmeda (aerobiosis) que asemejan gotas de un líquido mucoso opalescente. Hacer una tinción de Gram.

VII.3.-EFECTO DEL pH EN EL DESARROLLO DE MICROORGANISMOS EN EL SUELO

Los suelos varían frecuentemente en cuanto su acidez o basicidad. En función de este parámetro, los microorganismos que en cada uno de ellos se desarrollan serán también distintos.

Procedimiento:

1.-Recoja muestras de diferentes suelos (ceranos a una granja, distintos campos de cultivo, de jardín...). Unos 5 g de cada serán suficientes. Introdúzcalas en bolsitas debidamente etiquetadas.

2.-Pese 1 g de cada una de ellas y viértalo sobre tubos estériles con 8 ml de suero fisiológico cada uno.

3.-Con hisopos estériles siembre abundantemente placas de agar nutritivo ajustado a diferentes pH (2.0, 5.0, 7.0, 10.0). Emplee un hisopo para cada muestra.

4.-Tras la siembra, mida el pH de las soluciones de los distintos suelos. Anote los valores obtenidos.

5.-Incube las placas a 37°C, 24-48 h.

Anote los resultados y reincube 4 ó 5 días a temperatura ambiente.

VII.4.-FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO. OBSERVACION DE *RHIZOBIUM*.

La asociación *Rhizobium*-leguminosa es la responsable de la mayoría del Nitrógeno atmosférico fijado. Las bacterias de este género, que en su forma libre tienen forma bacilar y están provistas de flagelos, infectan células meristemáticas de la raíz de leguminosas. La infección de células 2n no prospera, no así si la infección se produce en células 4n (en mitosis) en las cuales las bacterias pierden sus flagelos y su forma convirtiéndose en células aberrantes (bacteroides) que proliferan rápidamente.

Esta infección tiene respuesta por parte de la planta a través de un desarrollo celular en la zona y la síntesis de una proteína relacionada con el trans-

porte de O_2 y que tiñe la estructura resultante, el nódulo, de color rojizo. Los nódulos son activos fijadores de N_2 lo que explica la capacidad de las leguminosas para crecer en suelos pobres en N_2 y su empleo para enriquecer en este elemento suelos excesivamente explotados.

Procedimiento:

- 1.-Recoger plantas de leguminosas en desarrollo (alfalfa, trébol...) preferentemente de suelos donde se hayan cultivado varias temporadas lo que garantizará la presencia de *Rhizobium*. Procure que el suelo esté lo suficientemente húmedo para extraer las raíces con el menor daño posible.
- 2.-Lave cuidadosamente las raíces recogidas y localice los nódulos presentes.
- 3.-Deposite uno de los nódulos sobre un portaobjetos con una gota de agua y, utilizando agujas enmangadas, desgarre su estructura para formar una extensión observable al microscopio.
- 4.-Cubra el material obtenido con Azul de metileno y, una vez seca la preparación, observe al microscopio y trate de identificar los bacteroides presentes.

VIII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- BESSEY,E.A.(1971). Morfology and taxonomy of fungi. Hafner Publishing Company. Nueva York.
- BUTTIAUX,R.(1974). Manuel de techniques bacteriologiques. Flammarion. París.
- COLLINS,C.H. (1969). Métodos microbiológicos. Acribia. Zaragoza.
- DAGUET,L. (1977). Técnicas en bacteriología. Jims. Barcelona.
- Departamento de Microbiología de la Universidad de Navarra (1990). Prácticas de Microbiología. Universidad de Navarra. Pamplona.
- Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de Valencia (1986). Prácticas de Microbiología general y Prácticas de Microbiología de los Alimentos, fermentaciones y suelo. E.T.S.I.A. Valencia.
- FUNDERS,S.(1968). Practical Mycology. Manual for Identification of Fungi. Hafner Publishing Company. Nueva York.
- HARRIGAN,W.F. y McCANCE,M.E. (1979). Métodos de laboratorio en microbiología de los alimentos y productos lácteos. Academia. León.
- MOUNTNEY,G. y GOULD,W.A. (1988). Practical food microbiology and technology. 3ª ed. Van Nostrand Reinhold. Nueva York.
- OLDS,R.J. (1986). A colour atlas of Microbiology. Wolfe Publishing. Londres.
- PASCUAL ANDERSON,M.R. (1992). Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas. Díaz de Santos. Madrid.
- REFAI,M.K. (1981). Manuales para el control de la calidad de los alimentos: IV Análisis microbiológico. FAO. Roma.

- REINHEIMER,G. (1987). Microbiología de las aguas. Acribia. Zaragoza.
- RODRIGUEZ RIVEIRO,A.M. (1977). Técnicas de análisis microbiológico. Grupo de laboratorio de Química y Biología. Lisboa.
- SUAREZ,J.A. e IÑIGO,B. (1990). Microbiología enológica. Mundi-Prensa. Madrid.
- WEISBURD,M.H. y ECKEL,H. (1974). Laboratory manual and workbook in microbiology. McMillan Publishing. Nueva York.
- WISTREICH,G.A. y LECHTMAN,M.D. (1978). Prácticas de laboratorio en microbiología. Limusa. Méjico.
- ZAPATER,R.C. (1973). Atlas de diagnóstico micológico. Ateneo. Barcelona.

