01H. 12241
F 29
III

42507

CENTRO REGIONAL DE ESTUDIOS AVANZADOS

Manual de Procedimientos del Laboratorio de Lactología

"Análisis Microbiológicos"

CONSEJO FEDERAL DE INVERSIONES
BIBLIOTECA
Dr. Manuel Belgrano

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS - LACTOLOGÍA- MICROBIOLOGÍA

PREFACIO

La composición química de la leche le confiere un extremado valor en la dieta del hombre pero, al mismo tiempo, hace que sea un medio adecuado para el crecimiento de un cúmulo de bacterias, levaduras y mohos. Las actividades de algunos microorganismos son de gran utilidad, como puede deducirse de las numerosas variedades de quesos que existen en el mercado, pero, es igualmente obvio, que el crecimiento incontrolado de microorganismos conduce a la alteración.

Existe extensa información acerca del comportamiento de microorganismos en la leche y sus derivados y hoy es posible, mediante una manipulación adecuada, mantener la contaminación de la leche o al menos controlar la actividad microbiana dentro de limites aceptables.

En muchos países, estos conocimientos han cristalizado generando regulaciones que controlan la producción y distribución de la leche y/o ha derivado en normas legales que especifican métodos normalizados de análisis que se utilizan como sistema de seguimiento. Independientemente de que se haya empleado uno y/u otro principio, el resultado ha sido la mejora continua de la calidad microbiológica de la leche.

La naturaleza tan diversa de los distintos productos lácteos implica, no solo normas reguladoras, y practicas industriales muy variadas, sino que también la información esté muy diseminada.

Una posible solución a este problema implica la recopilación de los temas que cubren los aspectos microbiologicos de la producción de la leche y su procesado.

Este informe final, y los manuales a los que se ha podido arribar intentan ser un aporte que cubra la necesidad del laboratorio con la metodología adecuada para el control de Calidad de Leches.

INTRODUCCION

El informe final de leche caprina, ovina, bovina trata de dar un enfoque lógico, paso a paso para la recuperación de microorganismos de importancia láctea ya que ha sido la base del informe.

Por ese motivo, incluir toda la información esencial en un informe final con las restricciones que impone un espacio limitado, representa un desafío.

Los contenidos se presentan organizados de la siguiente forma:

El Capitulo I

Microorganismos asociados a la leche

Se ha seguido un criterio selectivo al elegir las especies que se estudiaran con detalle, tratando de tener en cuenta todos los géneros que habitualmente se consideran importantes.

El Capitulo II

Preparación y almacenamiento de medios de cultivos (bloque A)

Preparación y acondicionamiento del material de vidrio utilizado en microbiología(bloque B)

El Capitulo III

Siembra y aislamiento de microorganismo

Se inicia con una introducción seguida por un glosario de procedimientos descriptos en grandes rasgos. Generalidades de la instrumentación de rutina utilizada en el laboratorio.

El Capitulo IV

Metodologías de siembra

Están aplicadas a toda la jornada de un análisis microbiologico, clasificándolas de acuerdo al medio de cultivo si se realizará siembra o aislamiento.

El Capitulo V

Esterilización Desinfección

Aplicación de los procedimientos adecuados, técnicas y productos bactericidas y bacteriostáticos.

El Capitulo VI

Pautas especificas para tomar decisiones diarias en la selección de la metodología de trabajo en el laboratorio, e identificación microbiológica de los productos lácteos.

El Capitulo VII

Alteraciones producidas por microorganismos en las de leches.

Capitulo VIII

Importancia del recuento de células somáticas en la calidad de la leche.

❖ CAPITULO I

❖ MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA LECHE

La leche, además de ser un medio nutritivo, es también un medio favorable desde el punto de vista físico para la multiplicación de microorganismos, al ser un producto de origen animal sujeto a una gran diversidad de métodos de producción se puede contaminar con un amplio espectro de microorganismos.

Para el desarrollo de este tema en lugar de agrupar las bacterias de acuerdo a ciertas características comunes por ej. Psicrotrofas, termodúricas, etc., se ha adoptado un criterio taxonómico y se ha subdividido en familias de acuerdo con la 8va. Edición del Bergey´s Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan y Gibbons, 1974)

♦ FAMILIA PSEUDOMONADACEAE

Esta comprende cuatro géneros: *Pseudomonas, Xanthomonas, zooglea* y *Gluconobacter.* Dentro del sector lácteo se consideran importantes únicamente los géneros *Pseudomonas y Brucella.*

Características generales de los géneros

Bacilos rectos o curvos. Gram negativos. Móviles mediante flagelo polar. Catalasa positiva. Habitualmente oxidasa positiva. Quimioorganotrofos. Metabolismo respiratorio, nunca fermentativo. Aerobios estrictos.

Género Pseudomonas

Pseudomonas aeruginosa

Se puede encontrar en el suelo, en el agua, se ha demostrado que produce mastitis. La mayoría de las cepas, cuando crecen en un medio adecuado, producen un pigmento fluorescente difusible y soluble del tipo fenazina, la piocinanina.

Se caracteriza por:

- La producción de un pigmento azul, rojo o marrón cuando crece en medio King- A.
- La capacidad de reducir los nitratos a nitritos.
- Crecer a 42°C.
- Capacidad de utilizar el etanol y manitol como fuente de carbono en un medio con sales de amonio y azúcares.
- Exigencias nutritivas versátiles, aerobios obligado excepto en medios con nitratos.
- Temperatura óptima de crecimiento a 37°C aproximadamente.

Pseudomonas fluorescens

Se encuentra principalmente en el agua y en el suelo, habitualmente se asocia con la alteración de alimentos.

Producen alteración de la leche y productos lácteos debido a que son psicotrofas y elaboran enzimas hidrolíticas extracelulares termoresistentes.

Características:

- Produce un pigmento fluorescente difusible especialmente en el medio King B. Algunas cepas producen un pigmento azul, no difusible. No producen pigmento en el medio KingA.
- Habitualmente no reduce los nitratos a nitritos. Generalmente puede utilizar el manitol como fuente de carbono pero no el etanol en medio con sales de amonio y azúcares.
- Exigencias de nutritivas versátiles. aeróbicos obligado. Temperatura óptima de crecimiento 25- 30 °C aproximadamente.

Pseudomonas malophilia

Se aísla del agua, leche y alimentos congelados.

Características:

- No produce pigmentos fluorescentes. Las colonias pueden ser amarillas pero este color no se debe a pigmentos carotenoides.
- Ocasionalmente puede reducir los nitratos a nitrito. Oxidasa negativa u oxidasa positiva débil (después de 10hs).
- Puede reducir la esculina y posee lisina decarboxilasa. Habitualmente es capaz de utilizar la lactosa.
- Exigencias nutritivas no tan versátiles. Aerobio obligado excepto aquellas cepas capaces de utilizar nitratos como aceptor final de electrones.
- Temperatura óptima de crecimiento 35°C aproximadamente.

Pseudomonas putrefaciens

Se encuentra en el agua y en suelo. Produce alteración en el pescado, la leche y productos lácteos.

Características:

- Produce un pigmento difusible: marrón rojizo o rosa.
- Reduce los nitratos y nitritos.
- Produce rápidamente fosfatasa en leche y otros medio.
- Posee ornitina descarboxilasa. Produce SH2 en agar hierro peptona.
- Se considera como facultativo debido probablemente, a su capacidad para utilizar el nitrato como aceptor final de electrones. Temperatura óptima de crecimiento 21°C aproximadamente.

GENERO BRUCELLA

Puede formar varios tipos de colonias: lisas (S), rugosas (R.) intermedias (I) y mucoides (M). Si un cultivo produce normalmente colonias lisas, para su identificación serológica, sólo se debe utilizar serotipo S o I. Inmóviles. Las exigencias adicionales de CO2 se deben determinar en el primer aislamiento puesto que esta dependencia puede ir disminuyendo. La producción de SH2 varia con la composición del medio.

Brucella abortus

Es patógeno habitual para el ganado vacuno, produce abortos y puede afectar al hombre. Forma colonias circulares, convexas, no pigmentadas, con superficie lisa y brillante.

Brucella melitensis

Es patógeno habitual del ganado caprino y ovino, pero puede afectar otras especies incluyendo el ganado vacuno y el hombre.

Referente al tema diagnóstico de brucelosis se describen metodologías en el manual de Sanidad Animal.

- FAMILIA ENTEROBACTERIACEA

Esta integrada por bacilos Gram negativas, anaerobias facultativas. Los géneros son: *Escherichia, Citrobacter, Salmonella, Shigella. Klebsiella. Enterobacter, Serratia, Proteus.*

Características generales

Bacilos rectos, de tamaño pequeño. Pueden presentar cápsula. Móviles mediante flagelos, o inmóviles. Gram negativos. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C.

Las colonias de Enterobacteriacease son morfológicamente homogéneas en agar nutritivo, habitualmente **lisas, poco convexas, viscosas,** con superficie brillante, borde liso, de color gris/blanco. No es posible diferenciar un género de otro por morfología de la colonia.

Al hablar de esta familia, es necesario explicar el término coliforme, se puede definir como bacilos Gram negativas, oxidasa negativa, no esporuladas, que pueden crecer en

aerobiosis, en un medio que contenga sales biliares, fermentan la lactosa en 48 horas a 37°C produciendo ácido y gas. Incluye microorganismos pertenecientes a varios géneros dentro de esta familia, entre ellos *Escherichia, Enterobacter, Citrobacter*, etc.

En la prueba presuntiva para coliforme que se emplea en lactología, se considera que el resultado es positivo cuando hay formación de ácido y gas en Caldo Mac Conkey después de 48 horas de incubación a 37°C.

En la leche, crema y productos lácteos pasteurizados, se debe realizar frecuentemente la determinación de coliformes y la prueba de la fosfatasa.

- **La presencia de coliformes junto a una prueba de fosfatasa positiva** indica que la pasteurización no ha sido correcta.
- **La presencia de coliformes junto a una prueba fosfatasa negativa** indica que la contaminación ha sido posterior a la pasteurización.

Género Escherichia Coli

Se encuentra en el intestino grueso de la mayoría de los animales de sangre caliente y por lo tanto contamina la leche ya sea directamente o indirectamente mediante la material fecal. Algunas cepas pueden ser patógenas oportunistas, como lo demuestra la capacidad de algunas cepas para producir mastitis aguda.

Esta bacteria, si las condiciones son favorables, puede alterar la leche y la mayoría de los productos lácteos, produciendo gas y un olor fecal. Puede producir el hinchamiento precoz de varios tipos de quesos.

Algunas cepas encapsuladas de *Escherichia coli*, al igual que algunas cepas de *Citrobacter y Klebsiella*, pueden producir viscosidad en la leche, aún cuando ésta haya sido mantenida a bajas temperaturas.

Caracteristicas:

- Fermenta la lactosa y otros carbohidratos de acuerdo con una fermentación fórmica mixta, con producción de ácido láctico, acético y fórmico. Mediante el sistema enzimático, el ácido fórmico produce en cantidades iguales de CO2 y H2 . Esta fermentación acidomixta permite diferenciar este microorganismo de otros coliformes merced a una serie de reacciones conocidas como pruebas de IMViC, (producción de indol, rojo de metilo, Voges- Proskauer y utilización del citrato). El IMViC para esta bacteria es (++ - -) y se diferencia de *Enterobacter aerogenes* que lleva a cabo la fermentación butanedial- fórmica y su IMViC es (- -++). Esta información es válida durante el análisis de agua de bebidas y en el procesado de alimentos y productos lácteos.

Género Salmonella

No requiere factores de crecimiento especiales. La mayoría de las cepas producen gas. Sin embargo, *S. thypi*, el agente etiológico de la fiebre tifoidea, nunca produce gas.

Son patógenas para el hombre y animal debido a la producción de una endotoxina.

Este microorganismo también puede contaminar la leche a través de materia fecal, y en ciertas circunstancias las vacas que padecen salmonelosis, eliminan microorganismos viables en la leche. El IMVic para esta bacteria es (- + - -)

Género Enterobacter

Algunos microorganismos presentan cápsula. El género presenta dos especies *Enterobacter cloacae y Enterobacter aerogenes.* Los microorganismos que pertenecen a este género pueden ser de origen fecal o provenir del suelo, del agua, etc. y la leche se puede contaminar a partir de cualquiera de estas fuentes. Algunas cepas encapsuladas de *Enterobacter aerogenes* son capaces de producir gran viscosidad en la leche.

Además fermenta la glucosa por la vía de la fermentación butanediol / fórmica, por ello la prueba de Voges- Proskauer es habitualmente positiva. IMViC (- - ++).

Género Yersinia

Con tres especies: *Y. pestis, Y. pseudotuberculosis y Yersinia enterocolitica.*

Todas son inmóviles a 37°C. No tienen cápsula. Todas son patógenas para el hombre y los animales.

Yersinia enterocolitica es un microorganismo psicotrofo. Contamina la leche y otros alimentos ya sea directamente o indirectamente a partir de heces, orina o insectos. IMViC (D + - -)

- **FAMILIA MICROCOCCACEAE**

Esta familia esta integrada tres géneros:

Micrococcus, Staphylococcus y Planococcus, y sus características generales son:

Células esféricas. Gram positivos. Generalmente inmóviles. Catalasa positiva. Aerobios o anaerobios facultativos.

El género Micrococcus se distingue habitualmente del género Staphylococcus por la capacidad de este último de fermentar la glucosa.

Género Micrococcus

Con dos especies: *Micrococcus luteus* no reviste importancia en lactología en cambio si tiene importancia el *Micrococcus varians.*

Micrococcus varians: Esta especie es común en leche y derivados. No es patógeno.

- Presenta Colonias amarillas, lisas y convexas con borde regular.
- Resistente a la novobiocina, habitualmente reduce los nitratos y nitritos.

Sólo se observa crecimiento en medios complejos. Aerobio estricto. La mayoría crecen a 10°C pero no a 45°C. Temperatura óptima de crecimiento de 22-37 °C

Género Staphylococcus

Esta integrada por tres especies: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermis y Staphylococcus saprophyticus* la más importante en la leche y su derivados son:

Staphylococcus aureus

Se encuentra principalmente en las membranas nasales y en la piel del hombre y animales. Es potencialmente patógeno, produce gran variedad de infecciones e intoxicaciones alimentarias. Las colonias son habitualmente de color naranjas. Las colonias de ciertas cepas antibiótico- resistentes y otras de origen bovino, con frecuencia son amarillas. La producción de pigmento depende de las condiciones de crecimiento y pueden variar dentro de una misma cepa. Produce, por lo menos, tres hemolisinas (alfa, beta y delta). Puede producir coagulasa. Puede producir intoxicaciones alimentarias debido a que produce una enterotoxina termoestable. Presenta exigencias nutritivas complejas. Anaerobios facultativo. Temperatura óptima de crecimiento 30-37 °C.

Staphylococcus saprophyticus

Se aísla habitualmente del aire, suelo, productos lácteos. Las colonias son lisas, convexas, con borde regular o ligeramente irregular, son normalmente blancas pero en ocasiones pueden ser amarillas o naranja.

Se caracteriza por no reducir los nitratos. Sólo se observa crecimiento en medios complejos. Anaerobio facultativo. La temperatura óptima de crecimiento es 30 -37°C.

♦ FAMILIA STREPTOCOCCACEAE

Dentro de esta familia están integrada por los géneros *Streptococcus*, *Leuconostoc, Pediococcus* y otros. Aquí sólo se trata con más amplitud el género Streptococcus.

Características generales

Células esféricas u ovoides agrupadas en pares, tetradas o cadenas de longitud variable. Gram positivos. No móviles. Generalmente catalasa negativa. Anaerobios facultativos.

Género Streptococcus

Dentro de sus propiedades es importante mencionar que:

- Fermentan la glucosa, formando principalmente, ácido láctico.
- Son catalasa negativa.

Se agrupa en las siguientes especies:

- *Streptococcus pyogenes*
- *Streptococcus equisimilis*
- *Streptococcus zooepidemicus*
-*Streptococcus dysgalactiae*
- *Streptococcus agalactiae*

-*Streptococcus acidominimus*

- *Streptococcus bovis*

- *Streptococcus thermophilus*

Streptococcus dysgalactiae

Se ha aislado de la leche y de los tejidos de la ubre de vacas con mastitis. Presenta colonias mucoides, brillantes o mate, no pigmentada.

La prueba de la esculina de Edward en agar- sangre cristal violeta es selectiva para Streptococcus productores de mastitis. Producen colonias incoloras.

Exigencias nutritivas complejas. Temperatura óptima de crecimiento 37(C.

Stretopcoccus agalactiae

Se aislado de la leche y del tejido mamario de vacas con mastitis. Presentan colonias que muestran una pigmentación amarilla, naranja o rojo ladrillo. La prueba de la esculina de Edward en agar- sangre cristal violeta es selectiva para dicha bacteria , no fermenta la esculina produciendo colonias incoloras.

Exigencias nutritivas complejas. Temperatura óptima de crecimiento 37(C.

Streptococcus acidominimus

Se encuentra habitualmente en la vagina de las vacas y ocasionalmente en la piel de ternero y en la leche. Se caracteriza por que la mayoría de las cepas son incapaces de ocasionar un descenso del pH de un medio con carbohidratos, por debajo de 6.

Crece solamente en medios complejos. Temperatura óptima de crecimiento 37°C.

Streptococcus bovis

Se ha aislado del tracto digestivo de vacas, ovejas y otros rumiantes, también se han encontrado en gran proporción en heces humanas.

Streptococcus Thermophilus

En combinación con otros microorganismos se incluye para la producción de yoghurt, queso tipo suizo y quesos italianos. Se puede emplear para la detección de sustancias inhibidoras en la leche.

Se caracteriza por su temperatura máxima de crecimiento y por su termoresistencia. Necesidades nutritivas complejas. Temperatura óptima de crecimiento 40-50°C.

Streptococcus Uberis

Sé aislado de la garganta, las heces y la leche de vaca. Es responsable de una forma de mastitis particularmente frecuente en invierno.

Necesidades nutritivas complejas. temperatura óptima de crecimiento 35-37 (C.

Streptococcus Lactis

Componentes de los Starters mesófilos, se utiliza sólo en combinación con otras especies para la elaboración de quesos de pasta dura por ej. Cheddar, Gouda y otros. Es el único microorganismo que se utiliza en el Starter que se emplea en la elaboración de la leche Taette.

Grupo láctico. Produce amoníaco a partir de arginina, ácido a partir de maltosa, pero no producen CO2 ni diacetilo a partir de citrato. Algunas cepas pueden metabolizar la leucina rindiendo 3- metil- butanol dando lugar a un sabor malta que constituye un defecto en estos productos lácteos. Puede producir nisina, un compuesto antimicrobiano activo contra microorganismos Gram positivos.

Necesidades nutritivas complejas. Temperatura óptima de crecimiento aproximadamente 30°C.

Streptococcus lactis sub- especie diacetylactis

Starter mesófilo, se utiliza en combinación con otros microorganismos en los Starters utilizados en elaboración de queso de pasta dura, quesos madurados con mohos, quesos semi-madurados, Cotagge, quesos cremosos, mantequilla madurada, mazada, Quarg y otros.

Grupo láctico. Es capaz de producir CO2 y diacetilo a partir de citrato. También es capaz de producir acético a partir de citrato, que se ha observado que inhibe a las *Pseudomonas, Coliformes y Salmonellas.*

Necesidades nutritivas complejas. Temperatura de crecimiento aproximadamente30°C.

Streptococcus Cremoris

Starter mesófilo, se utiliza en combinación con otras especies en la elaboración de quesos de pasta dura, quesos madurados con mohos, quesos semi-madurados, Feta y otros.

Grupo láctico. No produce amoniaco a partir de la arginina, no forma ácido a partir de maltosa no produce CO2 ni diacetilo a partir de citrato.

Necesidades nutritivas complejas. Temperatura de crecimiento aproximadamente 30°C.

- **FAMILIA BACILLACEAE**

En esta familia hay cinco géneros, dos de los cuales, *Bacillus y Clostridium*, tiene importancia para la microbiología de la leche.

Características generales de los géneros *Bacillus y Clostridium*

Bacilos rectos. Se puede presentar aislados, en pares o cadenas. Forman endosporas que son resistentes al calor. Inmóviles o móviles por flagelos laterales o perítricos. Aerobios, facultativos o anaerobios.

Los microorganismos comprendidos en *género Bacillus* forman esporas refringentes en condiciones de aerobiosis mientras que *Clostridum Sp.* forman esporas en condiciones de estricta anaerobiosis. Además, la mayoría de las especies de *Bacillus* produce catalasa mientras que *Clostridium Sp.* no. La producción de catalasa es también útil para diferenciar las especies de *Bacillus* de las especies de *Sporolactobacillus* que son microaerófilas.

Género Bacillus

Su hábitat típico es el suelo, pero se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y pueden llegar a la leche y productos lácteos por varias vías, como aire, agua, forraje.

Bacillus cereus

El B. cereus tiene importancia en la industria alimentaria y láctea debido principalmente a dos razones: La producción de toxinas y la producción enzima. Debido a la producción de una proteasa extracelular, una fosfolipasa C y a la formación de esporas termoresistentes; este microorganismo es capaz de producir en leche pasteurizada una coagulación y un agriado de la crema. En casos excepcionales las esporas termoresistentes de B. cereus pueden ocasionar problemas de alteración en productos lácteos que ha sido sometidos a un tratamiento a alta temperatura.

El aspecto de las colonias varía mucho según las cepas, por ej. pueden ser opacas o perladas, con bordes ondulado o pueden presentar crecimiento arboriformes que se expanden en todas direcciones.

Requieren para su crecimiento uno o más aminoácidos (depende de la cepa). No requieren vitaminas. Crecen fácilmente entre 20 y 35 (C .

Bacillus subtilis

Se ha asociado con la producción de viscosidad en leche cruda o pasteurizada, también se la ha considerado como responsable de la coagulación de la leche. La morfología de las colonias varía desde formas irregulares a redondeadas. La superficie es opaca o pardusca puede presentar arrugas y adquirir una coloración crema o marrón. El aspecto varía mucho según la composición del medio.

Bacillus coagulans

Este microorganismo ha sido relacionado con la alteración (coagulación) de la leche evaporada enlatada. Las colonias son generalmente pequeñas, redondeadas y opacas.

Este microorganismo es bastante resistente a la acidez, aunque para comenzar a crecer necesita un pH por encima de 6, algunas cepas pueden crecer a pH 4,00.

Las exigencias nutritivas, mínimas son diversas, pero generalmente necesitan algunas vitaminas y aminoácidos. Crece fácilmente entre 25 y 55°C.

LEVADURAS

Debayomyces hanseii:

Se ha aislado del queso entre otros alimentos. En caldo extracto de malta (2 días a 25°C) las células presentan formas que varían de esféricas a óvalos cortos, se pueden observar células aisladas en pares o en cadenas cortas y se propagan por gemación multipolar. No fermenta lactosa pero es capaz de asimilarla.

Kluyveromyces fragilis

Se ha aislado del yogur y está asociado con la elaboración de Kefir y Kumiss. En caldo de extracto de malta (3 días a 28°C) las células son entre elipsoidal y cilíndrica. Se puede presentar aisladas, en pares o cadenas cortas. Las ascosporas tienen forma arriñonada u oblongas con extremos obtusos. Fermenta rápidamente la lactosa con formación de gran cantidad de CO2 y poco alcohol.

Kluyveromyces lactis

Esta asociado con el yogur y se ha aislado del queso, suero de mantequilla y crema.

En caldo de extracto de malta (3 días a 28°C) las células se presentan esféricas elipsoidales y en ocasiones cilíndricas. Pueden aparecer aisladas, en pares u ocasionalmente en racimos. Se pueden formar células ameboides. Es capaz de fermentar la lactosa y galactosa.

Cándida Kefir

Se encuentra asociado con el suero de mantequilla, el queso y el Kefir. Cuando crece en agua de peptona con extracto de levadura y glucosa (3 días a 25 °C) las células son

ovoides pueden ser cortas o largas. En cultivos en portaobjeto, el pseudomicelo es abundante. Fermenta la glucosa y la lactosa, pero se caracteriza por no asimilar la D-xilosa.

MOHOS

Geotrichum candidum

Se encuentra comúnmente en productos lácteos. En agar extracto de malta las colonias son blancas, semejantes a las levaduras y de aspecto mantecoso especialmente cuando son viejas. Forma un micelio verdadero que se divide casi completamente en artrosporas que tienen forma cilíndrica con extremos redondeados.

Scopulariopsis brevicaulis

Crece mejor en sustratos con alto contenido proteico por ej. quesos, y constituye una fuente importante de contaminación de los quesos madurados con mohos donde da lugar a un sabor y olor amoniacal. Las colonias son habitualmente delgadas, lisas y aterciopeladas al principio, (frecuentemente estriadas) de color blanco - grisáceo, luego adquieren un color marrón -amarillento, crecen exuberantemente, con hifas sueltas, floculosas o funiculosas. Los conidios son más característicos, son esferas truncadas con un anillo basal engrosando alrededor de la zona truncada.

♣ CAPITULO II

❖ ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS

BLOQUE A

ALMACENAMIENTO

Dentro de lo posible, los medios de cultivo deshidratados se deberán conservar en lugar seco, protegido contra la luz, a una temperatura de 15 °C - 25 °C y envases bien cerrados. Inmediatamente después de retirar de los envases la cantidad de medio de cultivo que se necesite, deberán cerrarse éstos de nuevo firmemente. Bajo condiciones óptimas de almacenamiento, los medios de cultivos deshidratados- perfectamente cerrados y en sus envases originales- conservan sus cualidades durante 5 años, como mínimo, a partir de su fabricación.

PREPARACION

Consta de tres etapas:

1. Disolución del medio de cultivo deshidratado

2. Ajuste del pH

3. Esterilización

1-DISOLUCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO DESHIDRATADO

Para la preparación de medios de cultivo se utiliza agua recién destilada o desmineralizada y cuya reacción sea lo más cercana posible al pH neutro.

El material de vidrio destinado a la preparación (por lo general Erlenmeyer) debe estar escrupulosamente limpio, se debe enjuagar con agua bidestilada, con el objeto de eliminar totalmente eventuales residuos de otras sustancias. Secar en estufa.

Los recipientes de contención deben ser de gran capacidad para que el medio de cultivo que se prepara pueda ser agitado con facilidad y obtener así una buena homogeneización, es decir, que depende del volumen que se desea preparar.

Pesar en una balanza analítica la alícuota correspondiente al volumen deseado, trasvasar al erlenmeyer perfectamente seco, añadir a continuación aproximadamente la mitad del volumen requerido de agua destilada, agitar suficientemente hasta conseguir una suspensión homogénea. Después incorporar la cantidad de agua restante, aprovechando esta adición para desprender e incorporar al conjunto de partículas que hubieran quedado adheridas a la pared interna del recipiente.

Los medios nutritivos que no contienen agar se disuelven , por lo general en agua fría o mediante un ligero calentamiento.

A fin de obtener una preparación adecuada se debe recordar que: Todo tipo de medio de cultivo es sensible al calentamiento. Por este motivo, no debe calentarse más de lo estrictamente necesario.

Los que contienen agar debe ser calentados para lograr su disolución. Este calentamiento se realiza en baño María. En el caso de medios de cultivo que no deban ser sometidos a ulterior esterilización en autoclave es imprescindible prestar atención a su disolución completa. Puede reconocerse que se ha alcanzado este grado cuando, al agitar, no se adhiere a la pared interna del recipiente partícula alguna de agar y la solución resbala libremente.

Algunos medios de cultivo muestran una turbidez inevitable por ej. Agar -bismuto-sulfito. Para estos medios hay que procurar una turbidez homogénea, distribuyendo lo mejor posible las partes insolubles.

2- AJUSTE DE pH

El valor del pH depende mucho de la composición del medio de cultivo, de la temperatura que tenga el mismo, en el momento de su medición y del tratamiento a que fue sometido durante su obtención (disolución, esterilización).

- El pH se ajusta al valor especificado en la preparación, de cada medio de cultivo.

- A la temperatura de incubación, el valor de pH quedará dentro de los limites de oscilación previstas.
- La corrección del pH se logra por adición de solución 0,1N de ácido clorhídrico o de hidróxido de sodio.

3-ESTERILIZACIÓN

Dentro de lo posible antes de la esterilización, es conveniente trasvasar los medios de cultivo a tubos de ensayos, con la cantidad correspondiente de acuerdo al tipo de medio. Si las normas de preparación no indican otro procedimiento, la esterilización se lleva a cabo en autoclave a 121°C., durante 15 minutos.

BLOQUE B

❖ **PREPARACIÓN DEL MATERIAL DE VIDRIO A UTILIZAR EN MICROBIOLOGÍA**

Todo material de vidrio a esterilizar debe estar perfectamente limpio y seco.

Se procede de la siguiente manera:

- Pipetas (0,25; 1 ;2; 5; 10 y 25 ml): Se introduce una torunda de algodón en la boca de la pipeta, luego se las coloca en un tambor metálico (pipetero). En el fondo del

- pipetero se coloca una capa de algodón para evitar romper la punta de las pipetas. Se esterilizan en autoclave o estufa.
- Pipetas Pasteur : Se procede a colocar una torunda de algodón en la boca de la pipeta, se introducen, en grupos de 4- 6 pipetas ,en tubos de vidrio, en los cuales se debe colocar una capa de algodón en el fondo del mismo para evitar la ruptura de la punta de las pipetas. El tubo que contiene las pipetas Pasteur se tapa con un tapón de algodón, se recubre con papel y se ata.
- Tubos de ensayo : Se taponan con algodón y se empaquetan en grupos de 4-6 tubos, indicando en cada paquete la cantidad de tubos y con una flecha se indica la boca de los mismos.
- Tubos de centrifuga: Idem al anterior.
- Erlenmeyer: (50, 250, 500 ml, etc.): Se tapan con algodón, y se recubre el tapón con papel y se atan.
- Placas de Petri: Se envuelven individualmente en papel.

♣ CAPITULO III

❖ SIEMBRA AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

INTRODUCCION

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas de una gran variedad de tipos diferentes. Sin embargo el desarrollo de la microbiología se ha conseguido mediante el estudio de especies aisladas, crecidas en medios de cultivo, desprovistos de cualquier otra forma de vida contaminante. Para introducirnos en el estudio de las técnicas de cultivo de bacterias, es necesario definir los siguientes términos: Siembra, Trasplante y Aislamiento.

Siembra:

Acto de transferir o colocar un microorganismo en un medio de cultivo adecuado; la transferencia se efectúa desde el hábitat natural al medio de cultivo. Se puede efectuar la siembra de distintos materiales biológicos u otros materiales tales como agua, leche, queso, etc.

Transplantes (repique):

Es la transferencia de gérmenes, desde un medio de cultivo a otro, y se realizan cuando se quiere obtener un cultivo puro, mantener cepas, o efectuar estudios químicos, bioquímicos, etc.

Aislamiento:

Son los procedimientos que se realiza para obtener un cultivo puro a partir de una muestra, con el objeto de mantener cepas efectuar estudios químicos, bioquímicos.

PROCEDIMIENTOS A SEGUIR:

Las técnicas de siembra se efectúan bajo normas de asepsia rigurosa para impedir que se desarrollen a la par de los microorganismos en estudio, microorganismos del medio ambiente además para impedir el escape de gérmenes patógenos desde los cultivos al medio ambiente.

Todo procedimiento de siembra se efectúa:

- En Medios de cultivo previamente esterilizados así como debe ser estéril todo el instrumental empleado.
- Se debe realizar al abrigo de las corrientes de aire (puertas y ventanas) y los movimientos deben ser pausados, poco ampliados y sin brusquedad.

LAS PAUTAS POR SEGUIR SON:

A- Técnica aséptica

Para sembrar un cultivo bacteriano en un medio estéril, un cierto número de células(inoculo), se transfieren al medio con las precauciones especiales para conservar la pureza del cultivo.

En el procedimiento de siembra, el ansa de cultivo debe calentarse al rojo sobre la llama inmediatamente antes y después de usarla. Este calentamiento destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del ansa.

Se mantiene el ansa sobre la llama, para calentar la totalidad de la aguja y la parte inferior del mango.

Durante la siembra, se mantiene el tubo en la mano izquierda y se sostiene el tapón entre la base del dedo meñique y la palma de la mano derecha.

Mantener el tubo lo más cerca posible de la horizontal durante la siembra.

Las bocas de los tubos de donde tomamos los inóculos y las de aquellos en los cuales van a ser transferidos, deben también flamearse inmediatamente antes y después de que el ansa sea introducida y sacada.

Además de destruir cualquier organismo del borde del tubo, el flameado tiende a crear corrientes de convección de aire hacia afuera, decreciendo así el riesgo de contaminación.

Importante

No debe depositarse nunca un tapón sobre la mesada de trabajo y la parte del tapón que se introduce en el tubo no debe entrar en contacto con la piel ni objeto alguno, a fin de evitar posibles contaminaciones.

INSTRUMENTACION DE RUTINA

Los instrumentos que se utilizan para sembrar se pueden clasificar:

a)Según la finalidad de la siembra :

INSTRUMENTACION	ANSA	PIPETAS	ESPÁTULA DE DRIGASLKI
			HISOPO
TIPO	Recta	Pasteur Recta	Para sembrar en superficies
	Anillo	Pasteur a bolas	grandes (caja de Petri,
		Graduadas	botella de Roux)

2- **Según el tamaño y el estado físico del inoculo se utilizarán**

MATERIAL	**TAMAÑO DEL INOCULO**	**ESTADO FISICO DE LA MUESTRA**	**APLICACIÓN**
Pipeta	variable	líquido	Siembra , transferencia
Ansa recta	pequeño	sólido	Siembra, transferencia
			Aislamiento
Ansa anillo	pequeño	líquido- sólido	Siembra, transferencia
			Aislamiento

b) **En que se siembra**

MEDIOS LIQUIDOS	**MEDIOS SOLIDOS**
Medios incoloros	Inclinados o pico de flauta
Medios coloreados	Agar nutritivo u otro medio
Medios para observar la	En caja de Petri.
producción de gas(campanitas de Durhan)	gelatina

C) Como se siembra en medio sólidos

EN PLACA	Diseminación o Estrías: Ansa en anillo, recta o Espátula de Drigalski
	Difusión : inoculo más agar fundido
EN SUPERFICIE	En estrías
INCLINADA	Por contacto: directamente agregando un pequeño volumen de inóculo.
MEDIO DERECHO	gelatina Por punción

♣ CAPITULO IV

❖ METODOLOGÍAS DE SIEMBRAS

SIEMBRA EN MEDIOS LÍQUIDOS (caldo de leche, agua peptonizada, medio mineral de fosfato)

Una manera sencilla de obtener cultivos bacterianos es sembrarlos en medios líquidos, en tubos de ensayo.

Los medios transparentes se deben sembrar con ansa recta, tratando de transportar poco inoculo. Los medios se pueden sembrar con ansas en anillo, o bien con pipetas estériles.

Se debe sembrar siguiendo las indicaciones según la técnica de asepsia.

Cuando se utiliza pipeta estéril, hay que pasarla ligeramente por la llama, antes de cargarla con el inoculo correspondiente. Una vez usada, colocarla en recipientes que contienen mezcla sulfocrómica o solución desinfectantes. Una vez sembrado el tubo, rotular e incubar.

SIEMBRA EN MEDIOS SÓLIDOS

A) En medios en pico de flauta

Para sembrar se mueve el ansa recta suavemente sobre la superficie del agar, con un movimiento trazado en estrías a intervalos de poco milímetros empezando por el fondo y

llegando la parte superior del tubo teniendo cuidado de no dañar el agar. Una vez sembrado, rotular el tubo e incubar.

B) En tubos de ensayo por picadura

La toma del inoculo se efectúa utilizando un ansa recta. El tubo en el que se va efectuar la siembra contiene agar o gelatina, que se ha dejado solidificar en posición vertical. Una vez tomado el inoculo a sembrar se introduce rápidamente el ansa en el seno del medio en forma recta. Hecho esto, se retira el ansa rápidamente, se quema la boca del tubo y se tapa. Se esteriliza el ansa. Se incuban los tubos recién sembrados. El desarrollo se producirá a lo largo de la picadura.

Esta técnica sirve para conocer, en especial, si un microorganismo es móvil o no cuando se usan medios al 0,3- 0,5% de agar.

C) En Placas de agar (o placas de Petri)

Para preparar las placas de Petri se funde el agar calentándolo en baño de agua y se enfría a 45- 47°C. (El enfriamiento disminuye la cantidad de humedad que se condensa cuando el agar líquido se solidifica en las placas de Petri).

A continuación se vierten 12-15 ml de agar tibio (pero aún perfectamente líquido) en una placa de Petri estéril.

Para evitar contaminación son necesarias varias **precauciones:**

1- Cuando se retira el agar fundido del baño de agua, se seca el exterior del tubo con un papel absorbente, pues sino el agua caerá en la placa e introducirá contaminación.

2- Al quitar el algodón para verter el contenido a la placa, debe flamearse la boca del tubo, se levanta solamente un lado la tapa de la placa y únicamente lo suficiente para permitir el paso de la boca del tubo.

3- Después de haber vertido el agar en la placa se tapa esta inmediatamente y se rota sobre la mesada suavemente de tal manera que se forme una capa uniforme. Dejar solidificar. Antes de sembrar las placas conviene desecar la superficie del medio eliminando el agua de condensación que se hubiese formado. Para ello se dejan secar durante 5-10 minutos en estufa, destapadas e invertidas. Se puede sembrar con hisopo, espátula de Drigalsky o ansa. Una vez sembrada la caja, previamente rotulada, llevar a estufa en posición invertida e incubar.

- **TECNICAS DE SIEMBRA EN LOS DIVERSOS MEDIOS**

1- SIEMBRA EN AGAR O GELATINA POR PICADURA:

Esterilizar y calentando a la llama (al rojo) el alambre del ansa . Dejarlo enfriar 5 seg. Tomar el tubo del cual se va extraer el inoculo con la mano izquierda, con el meñique y la palma de la mano derecha quitar el tapón del tubo, flamear la boca y mantenerlo oblicuo, casi horizontal, para reducir al mínimo el peligro de contaminación. Retirar con el alambre esterilizado una pequeña cantidad de muestra (inoculo), flamear nuevamente la boca del tubo, taparlo y dejarlo en la gradilla. Tomar el tubo en el que se va sembrar, con la mano izquierda, quitarle el tapón con el meñique y la palma de la mano derecha. Flamear la boca del tubo y con el alambre cargado de inoculo picar en centro, hasta llegar casi al fondo del tubo. Retirar con cuidado el ansa, flamear la boca del tubo, taparlo y esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesada de trabajo. El tubo sembrado se marca para identificarlo, colocando en el rótulo, el medio, lo que se sembró y la fecha. Luego se lleva a incubar a la estufa de cultivo a la temperatura adecuada durante el tiempo necesario.

2- SIEMBRA SOBRE MEDIOS INCLINADOS (EN PICO DE FLAUTA)

Esterilizar a la llama el ansa, enfriar 5 segundos. Con la mano izquierda se toma el tubo del cual se va extraer el inoculo, con el dedo meñique y palma de la mano derecha se extrae el tapón. Flamear la boca del tubo, taparlo y dejarlo en la gradilla. Tomar el tubo en el que se va a sembrar con la mano izquierda, retirar el tapón de la manera habitual,

flamear la boca del tubo, mantenerlo inclinado, introducir el ansa cargada al tubo y extender al inoculo sobre la superficie del medio trazando estrías a intervalos de pocos mm empezando por abajo, retirar el ansa, esterilizarla y dejarla sobre la mesada. Flamear la boca del tubo y tapar.

Rotular y llevar a incubar.

3- SIEMBRA SOBRE PLACAS DE PETRI

Fundir en baño María hirviente un tubo de agar derecho. Enfriar a 45-50°C. Secar y destapar el tubo. Flamear la boca y verter el contenido en una caja de Petri estéril. Rotar la caja sobre la mesada de manera que se forme una capa uniforme. Dejar solidificar. Secar en estufa a 37 °C durante 5 minutos y luego sembrar. Se puede sembrar con hisopo, espátula de Drigalski o ansa. Una vez sembrada la caja, previamente rotulada, llevar a estufa en **posición invertida** e incubar.

4- SIEMBRA EN MEDIOS LÍQUIDOS EN GENERAL (CALDO, LECHE, AGUA PEPTONIZADA, ETC.)

Los medios transparentes se deben sembrar con ansa en anillo, tratando de transportar poco inoculo. Los demás se pueden sembrar con ansa, o bien con pipetas estériles

a- SIEMBRA EN MEDIOS LÍQUIDOS CON ANSA

Una vez que el ansa esterilizada esta cargada con el inoculo, tomar con la mano izquierda el tubo con medio líquido a sembrar, destaparlo, de la manera habitual, flamear la boca del tubo y mantenerlo inclinado, introducir el ansa y descargar el inoculo. Retirar el ansa, flamear la boca del tubo, tapar, esterilizar el ansa antes de dejarla sobre la mesa de trabajo. Rotular el tubo y llevar a incubar.

b- SIEMBRA DE MEDIOS LÍQUIDOS CON PIPETAS

Tomar la pipeta estéril, pasarla ligeramente sobre la llama. Con la mano izquierda sostener el tubo del cual se va a extraer el inoculo, destaparlo, flamearlo, mantenerlo inclinado e introducir la pipeta, aspirar el volumen deseado, flamear el tubo, taparlo y dejarlo en la gradilla. Con la mano izquierda, tomar el tubo con el medio de cultivo que se va a sembrar, destaparlo, flamearlo e introducir la pipeta hasta el líquido, sembrar el inóculo (gotas, ml. etc.). Flamear la boca del tubo taparlo. La pipeta descartarla en recipientes que contienen mezcla sulfocrómica o solución desinfectante. Una vez sembrado el tubo rotular e incubar.

- **AISLAMIENTO**

MEDIOS DE AISLAMIENTO

Son medios sólidos se clasifican en:

a) **Medios no selectivo**: No llevan sustancias inhibidoras, en ellos se desarrollan todos los gérmenes que pueden subsistir a partir de los nutrientes que poseen.

b) **Medios selectivos**: Además de los componentes comunes de todos los medios de cultivos llevan por lo general un indicador de pH, sustancias inhibidoras y en el caso de enterobacterias, lactosa para diferenciar los gérmenes fermentadores de los que no lo son, los inhibidores comúnmente empleados son:

Cristal Violeta: inhibe gérmenes Gram(+)

azul de metileno: inhibe gérmenes Gram (+)

sales biliares: Son sustancias tensioactivas que se encuentra en la bilis inhiben a los gérmenes Gram (+). Los bacilos entericos se ven expuestos a ellos, por lo tanto son bastante resistente a su acción.

Citrato no se conoce exactamente el mecanismo de acción inhibidora. Podría ser, que actuara como quelante fijando cationes bivalentes esenciales. *Salmonella y Shigella* son

menos sensibles que los organismos COLIFORMES como *Escherichia* a la acción del citrato, pero algunas cepas *de Shigella* puede ser inhibidas.

Verde Brillante: Es bacteriostatico inhibe gérmenes COLIFORMES y Pseudomonas. Debe tenerse en cuenta que la inhibición depende de la concentración del agente.

Dentro de los indicadores de pH, los más usados son:

ROJO NEUTRO: en medio alcalino es amarillo

en medio ácido es rojo

ROJO FENOL: en medio alcalino es rojo

en medio ácido es amarillo.

Dentro de los medios selectivos, se puede establecer una clasificación en:

- Poco selectivos

- Moderamente selectivo

- Muy selectivos

- MEDIOS POCO SELECTIVOS

A estos se le agregan sustancias que inhiben el desarrollo de algunos gérmenes, generalmente se ven inhibidos la mayoría de los microorganismos Gram(+).

Permiten el crecimiento de todas las enterobacterias.

En estos medios se deben sembrar poco inoculo

Medio Eosina Azul de Metileno(EMB)

Este medio es relativamente estable. Los gérmenes fermentadores de lactosa y/o sacarosa dan colonias oscuras o bien en centro oscuro y periferia, traslúcida.

Escherichia coli suele presentar un brillo metálico característico pero hay otros gérmenes del género enterobacter que ocasionalmente lo presentan.

El color de las colonias se deben a:

1- Reacción de la Eosina (colorante ácido) con el azul de metileno (colorante básico), formando un colorante de compuesto neutro Eosinato de azul de metileno

2- La producción por parte de las colonias fermentadoras de un pH suficientemente bajo en el cual las colonias absorben el colorante.

Las no fermentadoras no se tiñen y permanecen incoloras por no tomar el colorante en medio alcalino.

- MEDIOS MODERADAMENTE SELECTIVOS

Llevan sustancias inhibidoras de la flora grampositivas, además inhiben en parte a la flora coliforme.

En Enterobacterias se usa generalmente para la búsqueda de *Salmonellla y Shigella.*

Eso no significa que no puede desarrollar otros gérmenes resistentes a estas sustancias inhibidos.

MEDIO SALMONELLA- SHIGELLA AGAR SS

El medio es de color rosado no se debe autoclavar, ni se debe sobrecalentar, pues pierde selectividad. Por tratarse de un medio selectivo, se puede sembrar abundante inoculo.

Los gérmenes Gram(+) son inhibidos, como así también algunos COLIFORMES debido a la presencia de verde brillante.

Los gérmenes no fementadores de lactosa dan colonias incoloras; alguna bacteria fermentadora resistente que pudiera desarrollar lo hará dando colonias de color rojizo.

- **TECNICAS DE AISLAMIENTO**

Se pueden clasificar de acuerdo :

- **AISLAMIENTO DE BACTERIAS AEROBIAS**

PLACA VERTIDA

POR AGOTAMIENTO EN TUBOS, EN CAJAS

POR DILUCION

- **AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBIAS**
- **AISLAMIENTO DE BACTERIAS ESPORULADAS**

Unicamente se brindará información sobre el tema aislamiento de bacterias aerobias.

PLACA VERTIDA

Material necesario

- Tubos de agar derecho necesario
- Pipetas Pasteur o pipetas graduadas estériles.
- Cajas de Petri estériles

Procedimiento

Fundir los tubos de agar derecho en Baño María. Enfriar a 45- 50°C. rotular los tubos y las cajas de Petri.

Sembrar con pipeta Pasteur estéril (gotas), el primer tubo correspondiente con el inoculo a analizar . Para mezclar se inclina el tubo de modo tal de no mojar el tapón de algodón y volverlo a la posición vertical, repetir 5- 6 veces esta operación con rapidez. Rotar el tubo entre las palmas de las manos en posición vertical. Inclinar suavemente. Colocar inmediatamente en el baño a 45- 50 °C. Con otra pipeta estéril extraer unas gotas de agar del primer tubo. Sembrar el siguiente tubo. Mezclar de manera habitual al punto anterior. Colocar en baño a 45 - 50°C.

Destapar el tubo, flamearlo. Destapar ligeramente la caja de Petri, verter el contenido dentro de la misma. Taparla rápidamente. Rotarla en varios sentidos.

Proceder con rapidez para evitar que el medio solidifique, y las contaminaciones ambientales. Dejar solidificar el agar. Incubar.

AGOTAMIENTO EN TUBOS

Material necesario

Tubos en pico de flauta, rotular según corresponda.

Procedimiento

Tomar con el ansa estéril el inóculo que se va aislar

Sembrar por estrías la superficie del tubo 1 por ejemplo comenzando a partir del fondo del mismo. Sin Cargar (si se trata del mismo inóculo), proceder idénticamente en el tubo 2.

Llevar a estufa a incubar a la temperatura correspondiente. Observar las características del cultivo.

AGOTAMIENTO EN CAJAS

Material necesario

Agar derecho

Cajas de Petri estériles

Procedimiento

Preparar las cajas con Agar nutritivo de acuerdo al capitulo IV de Siembra proceder de la misma manera.

En caso de una sola caja de Petri dividir la superficie del agar (con un lápiz marcador del lado externo de la caja) en 3 o 4 sectores. Rotular. Sembrar por estrías respetando el orden en cada uno de ellos.

En el caso de 3-4 cajas proceder ídem al capitulo IV de siembra. Sembrar por estrías en la caja 1, sin cargar se pasa a la 2 y así sucesivamente.

Después de sembrar, incubar las cajas de Petri en posición invertidas.

Transcurrido el tiempo de incubación observar y identificar las colonias.

DILUCION

Material necesario:

Tubos de agar inclinado con agua de condensación, en caso de no poseerla, agregar a cada tubo 0,5 ml de agua destilada o caldo estéril. Rotular los tubos.

Procedimiento

Tomar con el ansa estéril el material a aislar.

Introducir el ansa en el agua de condensación del tubo correspondiente, descargar, introducir el ansa, sin cargar nuevamente, en el agua de condensación del tubo siguiente y así sucesivamente.

Inclinar todos los tubos de manera que el moje toda la superficie de los mismos, diseminar así las bacterias.

Incubar en estufa de cultivo a la temperatura correspondiente.

Proceder a la identificación de las colonias.

AGOTAMIENTO POR TUBOS MULTIPLES – CALDO MAC CONKEY

Procedimiento:

Tomar la pipeta estéril pasarla ligeramente sobre la llama. Con la mano izquierda tomar el erlenmeyer o frasco que contiene la muestra de leche perfectamente homogeneizada, de la cual vamos a extraer el inoculo, con el meñique de la palma de la mano derecha destapar, flamear, mantenerlo inclinados, introducir la pipeta, aspirar el volumen deseado, flamear el tubo, tapar y dejar en la gradilla con la mano izquierda, tomamos el tubo con el medio de cultivo que vamos a sembrar, con el meñique y la palma de la mano derecha destapar, flamear e introducir la pipeta sin llegar hasta el liquido, sembrar el volumen deseado flamear la boca del tubo, tapar y la pipeta colocarla en un recipiente que contiene sulfocrómica o solución de desinfectantes. Rotular e incubar.

Método de G.S. WILSON

Para la determinación de Bacterias Coliformes se aplica el método de G.S. WILSON, es un método rápido y de mayor exactitud.

En la técnica de Wilson se determina la concentración de bacterias coliformes en leche, sobre la base del número de porciones que sembradas en Caldo Mac Conkey, acusan resultado positivo(presencia de ácido y de gas) dentro de las 48 Hs. de incubación a 37°C; pero, esta es la principal ventaja del método, se establece luego la distribución de los tipos de bacterias coliformes originariamente presente en dicha muestra de leche. Ambas series de cultivos se realizan a partir de los positivos en caldo Mac Conkey.

Siembras

Sembrar en cada uno de los tubos que contendrán caldo Mac Conkey de doble concentración 10ml de la muestra y además en dos tubos con el mismo medio, pero de concentración simple 1ml, 0,1ml, respectivamente de la misma de la muestra.

Las porciones así sembradas se incuban a 37 °C, efectuar la lectura a las 24 y a las 48hs.respectivamente.

Interpretación

Positivo:

Formación de gas y ácido.

Negativo:

No hay formación de gas ni ácido.

♣ CAPITULO V

❖ ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

En el trabajo de laboratorio de microbiología e incluso en la higiene y saneamiento diario de locales, personas, alimentos etc.

Los procedimientos, técnicas y productos que suprimen o disminuyen la vitalidad de los microorganismos patógenos tienen una importante aplicación.

Se entiende por **ESTERILIZACION** a la eliminación de la totalidad de los microorganismos viables (formas vegetativas y esporas) presentes en un determinado material utilizando agentes físicos y químicos.

DESINFECCION: Es el empleo de agentes físicos o químicos con la finalidad de destruir la infectividad potencial de un determinado material (se destruye forma vegetativas pero no sus esporas).

HIGIENIZACION : Procedimientos usados para rebajar el contenido bacteriano de los utensilios.

ANTISEPSIA: Indica la aplicación tópica de sustancias químicas a una superficie del cuerpo para matar o inhibir los microorganismos patógenos.

- **MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN**

Se pueden clasificar en: - FÍSICOS y QUIMICOS

1- METODOS FÍSICOS

A)CALOR

CALOR SECO	CALOR HUMEDO
LLAMA DIRECTA	APARATO DE ARNOLD
AIRE CALIENTE	AUTOCLAVE A
TYNDALIZACION	PRESION

B) FILTRACION Y RADIACIONES

FILTRACION	RADIACIONES
BUJÍAS FILTRANTES	ULTRAVIOLETA
FILTROSDE MEMBRANA	RAYOS X, RAYOS IONIZANTES, ETC

2- METODOS QUIMICOS

Dentro del mismo podemos citar:

OXIDO DE ETILENO, FORMOL, BETAPROPIONOLACTONA

- **MÉTODO FÍSICOS**

CALOR

Es el método preferido para esterilizar todos los medios, excepto aquellos que sufren daño por el calor, por su termosensibilidad. El proceso es rápido, todos los microorganismos son sensibles y el calor llega a lugares que podrían estar protegidos para agentes químicos.

La esterilización por calor implica, desnaturalización proteica aún cuando la fusión de los lípidos puede ser notable. Ambos procesos requieren una temperatura más alta cuando el material está completamente desecado o la actividad acuosa del medio se reduce por la presencia de una alta concentración de una sustancia neutra como glicerol o glucosa.

Los hongos, la mayoría de los virus y las células vegetativas de todas las bacterias patógenas se eliminan en pocos minutos entre 60-70 °C y las esporas de varios agentes patógenos a 100°C.

- **CALOR SECO**

Es de aplicación reducida porque se requieren temperaturas elevadas(+de160°C) además porque pocos materiales resisten la acción oxidante del calor a esa temperatura en presencia del agua.

Se puede aplicar por **Acción Directa a la llama** llevando el material al rojo manteniéndolo 5-10 segundos, o pasando el material por la llama repetidas veces 2 ó 3 minutos. Así se pueden esterilizar ansas, agujas, portaobjeto, tijeras.

Con más frecuencia se utiliza el calor seco calentando el aire en el interior de la estufa diseñada especialmente para asegurar una distribución homogénea de la temperatura.

La única ventaja de este método es en que permite mantener el producto estéril completamente seco: material de vidrio, metal, esterilización de vaselina, soluciones salinas, agua, etc.

- **ESTUFA DE ESTERILIZACION**

La estufa de esterilización es de construcción simple: consta de una caja metálica con una puerta frontal y estanterías. Con ingreso de aire caliente o de los gases de combustión en la parte inferior, y con salida regulable, en la parte superior. La calefacción puede ser a gas o eléctrica y la temperatura se regula con un termostato. La pared metálica puede ser doble con una cámara de aire entre ellas. La cámara puede estar rellena de material aislante o mejor aún la pared externa esta recubierta por material aislante.

El sistema de calefacción puede estar colocado en la parte lateral entre las dos paredes, con una separación que facilite y oriente la convección del aire caliente.

Con un circulador de aire que oriente la convección forzada, aumente la homogeneidad y la velocidad de calentamiento.

- **CALOR HUMEDO**

Sobre las bacterias tiene un efecto mayor y más rápido que el calor seco, porque el agua es un buen conductor, y el calor penetra mejor y se distribuye más uniformemente. El calor húmedo se puede aplicar en forma de agua caliente o como vapor de agua.

El vapor de agua se puede aplicar sobre las bacterias como vapor fluente a 100°C, o como vapor a presión, con lo que se alcanzan mayores temperaturas.

El vapor de agua a presión es una técnica de destrucción de bacterias muy usada y efectiva (autoclave). El vapor de agua se aplica en una cámara cerrada en la que existe un generador de vapor; cuando esto se produce, desplaza el aire, que sale por la estípa que se cierra en el momento en que ya sale vapor (se evidencia por la salida de un chorro continuo de vapor). Se consiguen temperaturas de 121°C en el interior del aparato; ésta, aplicada durante15-20 minutos o 134°C durante 7 minutos destruye todas las formas vegetativas y esporuladas.

El método standard para esterilizar por calor húmedo es al autoclavado a 121°C se logra con vapor de agua a 1atm. de presión sobre la presión atmosférica. Los objetos fríos son rápidamente calentado por la condensación sobre su superficie y produce la desnaturalización de las proteínas y disolución de lípidos de las estructuras esenciales de los microorganismos.

El uso del autoclave es uno de los métodos más importante de esterilización en el laboratorio de microbiología; se utiliza para material de vidrio, quirúrgico, medios de cultivo, soluciones, material contaminado, etc. El material a esterilizar debe estar convenientemente envuelto en papel; el empaquetamiento debe efectuarse en forma tal de asegurar una transmisión efectiva del calor y vapor, la protección contra la oxidación, la corrosión y pérdida de filo de los instrumentos cortantes en caso que se esterilicen por este método.

- **DESCRIPCION DEL AUTOCLAVE**

El autoclave es un aparato que consta de paredes dobles y un doble fondo donde se coloca el agua, se cierra herméticamente con una tapa que contiene charnelas, en la parte superior de dicha tapa, posee una espita para el escape de vapor, un manómetro para medir la presión y una válvula de seguridad; en la parte inferior un quemador a gas para la calefacción.

- **MANEJO DEL AUTOCLAVE**

Medidas por tener en cuenta:

- **CONTROLAR QUE EL AGUA DEL FONDO SEA SUFICIENTE.**
- **EL MATERIAL A ESTERILIZAR NO DEBE ESTAR CERRADO HERMETICAMENTE; SE USA PARA ELLO CAJAS O CILINDROS METALICOS CON ORIFICIOS LOS QUE**

SE CIERRAN POSTERIORMENTE AL EXTRAERLOS DEL AUTOCLAVE; O BIEN SE ENVUELVE EL MATERIAL EN FORMA ADECUADA.

- **EL VOLUMEN CONTENIDO EN LOS RECIPIENTES A ESTERILIZAR NO DEBE EXCEDER 1/2 o 2/3 DEL VOLUMEN TOTAL DEL MISMO PARA EVITAR PROYECCIONES Y PERMITIR QUE EL LIQUIDO ENTRE EN EBULLICION LIBREMENTE SIN MOJAR LOS TAPONES.**

Una vez colocado el material, distribuirlo convenientemente, cerrar la tapa ajustando las charnelas enfrentadas para asegurar un cierre hermético, encender los mecheros, abrir la espita para eliminar todo el aire que queda en el interior (lo que se determina cuando sale flujo continuo de vapor de agua por la espita). Esta operación es importante, porque si queda una mezcla de vapor y aire en el interior del autoclave, por ser el aire menos conductor del calor, se logran temperaturas insuficientes para una buena esterilización.

Luego se cierra la espita, el manómetro comienza a marcar el aumento de presión hasta 1 atmósfera que corresponde a 121°C. A esa temperatura se deja 15-20 minutos; se apagan los mecheros y se abren la espita muy lentamente para evitar que por diferencia de presión salten los tapones, en casos que haya material como tubos o frascos con tapón de algodón. Abrir el autoclave. Si el material es de vidrio o metal se secan en la estufa.

Si son medios de cultivos hacer control de esterilidad y guardar en la heladera.

El tiempo de esterilización depende del volumen y la masa del material a esterilizar.

VENTAJAS

- **MENOR TIEMPO DE ESTERILIZACION**
- **MENOR TEMPERATURA**
- **SE PUEDE ESTERILIZAR MEDIOS DE CULTIVOS**
- **MAYOR PENETRABILIDAD.**

♦ **TYNDALIZACION**

Vapor fluente (olla presión o autoclave espita abierta)

Aparato Arnold

Baño María a Ebullición

Es un método de esterilización por calor húmedo en más de una etapa. Consiste en calentar a 100 °C durante 20 minutos tres veces a intervalos de 24hs. El primer calentamiento destruye todas las formas vegetativas de los gérmenes que pudieran estar presentes, luego se incuba 24 Hs. y si el medio es adecuado (suficientemente rico) para permitir la germinación de las esporas que estuviesen presentes germinaran y pasaran a la forma vegetativa, al aplicar el segundo calentamiento se eliminan. Se vuelve a incubar 24 Hs. si alguna espora no germinó durante la primera incubación, lo hace ahora, y al calentar por tercera vez las formas vegetativas serán destruidas. Este proceso, en la industria se suele repetir 5 veces o más.

Se puede Tyndalizar hidratos de carbono, leche, en general medio que no resisten 121°C del autoclave.

No se pueden Tyndalizar medios pobres en nutrientes como buffer, solución fisiológica, agua destilada, etc.

Se puede también Tyndalizar el suero, se realiza por tres calentamiento a 56°C durante 20 minutos a intervalos de 24 Hs.

- **FILTRACION**

Se pueden obtener líquidos libres de bacterias usando filtros de distintas características, y de tamaño de poro no inferior 0,2μ . Estos procedimientos se usan para soluciones que no puedan tolerar la esterilización por calor, como por ejemplo: suero, medios con proteínas o metabolitos termolábiles, soluciones de glucosa concentrada.

El mecanismo de esterilización se basa en la separación de bacterias del material a esterilizar y depende fundamentalmente del tamaño del poro del filtro.

Existen distintos modelos de filtros, todos se esterilizan previamente a ser utilizados o son descartables.

Se conocen bujías filtrantes y filtros de membrana

1- bujías filtrantes

Estos filtros no solo tiene un efecto tamiz, sino que también, existe intercambio de iones, por ejemplo los filtros de Seitz aportan iones calcio que pueden causar la aglutinación del plasma citratado e iones de Hierro.

Tienen el inconveniente de cambiar los caracteres organolépticos de los líquidos filtrados y pueden ensuciar con restos de filtro estos líquidos. Se esterilizan en muflas y deben restituirse para usarlos nuevamente.

Por los inconvenientes que presentan han caído en desuso.

2- Los filtros de membranas de ésteres de celulosa

Son los más modernos, tienen una serie de ventaja filtran más rápido, por efecto tamiz únicamente por lo que no se alteran los caracteres organolépticos, se desechan una vez utilizados.

- **CONTROLES**

Concluido el proceso de esterilización, se dispone de diversas formas para comprobar la eficiencia del mismo. Independientemente del método empleado es necesario realizar un control que asegure que el tratamiento ha sido adecuado. Hay dos tipos de controles:

a) Control de Esterilización: Es el que se realiza para comprobar si se cumplieron las condiciones del método empleado.

b) Control de Esterilidad: Es el que se realiza sobre las muestras o alícuota del material esterilizado con el objeto de comprobar la ausencia total de microorganismos en el mismo.

- **CONTROL DE ESTERILIZACION**

Cualquiera sea el método de esterilización es importante introducir indicadores que permitan el control del sistema de esterilización. Existen tres tipos de indicadores:

1-Fisicos : Son termómetros y manómetros con registros gráficos de manera que el operador pueda controlar el ciclo completo de la esterilización.

2- Químicos: Se emplean tiras de papel impregnadas con sustancias químicas que cambian de color al alcanzarse determinadas temperaturas o bien ampollas conteniendo una sustancia química que cambia también de color (Ej. ácido Benzoico).

3- Biológicos: Se utilizan ampollas o tiras de papel impregnadas con esporas de microorganismos que resistan altas temperaturas, luego se siembran estas esporas en medios adecuados y se comprueba su viabilidad.

- **CONTROL DE ESTERILIDAD**

Consiste en tomar muestras representativas de los objetos o materiales esterilizados, realizar controles con el fin de asegurar la no presencia de microorganismos.

Si se trata de un medio de cultivo rico, fraccionado en tubos, se toma de la zona central de la cesta que los contiene, donde se supone que se alcanza más difícilmente la temperatura y se incuban directamente.

Si se trata de alguna sustancia termolábil esterilizada por filtración, se toma una alícuota y se la coloca asépticamente en un medio de cultivo adecuado.

Se debe verificar la esterilidad de cada lote de medio de cultivo como así también, su capacidad para proveer el desarrollo microbiano usando dos o más microorganismos que sean exigentes en sus requerimientos nutricionales. Se emplean bacterias aerobias y anaerobias para ello, cada partida nueva de medio debe ser analizada con microorganismos patrones en las condiciones del ensayo.

En el control de esterilidad se investigan bacterias anaerobias y hongos. Hasta el momento no se investigan virus, ni se utilizan otras temperaturas más que las indicadas.

Es importante conocer si el producto a analizar no contiene sustancias o agentes conservadores que inhiban la reproducción de los microorganismos, si los tuviera, hay que utilizar técnicas que permitan la eliminación de los mismos, ya sea por dilución de la muestra o por agregado de sustancias inactivas.

CAPITULO VI

❖ PROCEDIMIENTOS DE RUTINA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

Después de recepcionar la muestra para cultivo en el laboratorio de microbiología deben tomarse las siguientes decisiones para recuperar e identificar los microorganismos que pueden estar presentes:

A) Se eligen los medios de cultivos primarios apropiados para la muestra de leche o de otros productos lácteos.

B) Se determina la temperatura y atmósfera de incubación para recuperar todos los microorganismos de significado potencial.

C) Se determina cual de los aislamientos recuperados en medios primarios requiere una mayor caracterización.

La descripción de las técnicas y métodos bacteriológicos se presentan de acuerdo a las siguientes etapas:

1-Esterilización del material de vidrio y medios de cultivos

2- Técnicas de siembra y aislamiento en los medios correspondientes.

3- Pruebas bioquímicas

4- Identificación de las bacterias

5- Coloración y métodos de coloración

6- Examen Microscópico

1- Esterilización de medios de cultivos

Para la implementación de la PRIMERA ETAPA remitirse al capitulo II respetando las pautas del bloque A y B, además para el manejo del autoclave tener en cuenta el capitulo V.

2-Técnicas de siembra y aislamiento en los medios correspondientes

Un análisis cotidiano de microbiología comienza de la siguiente manera:

Primer día

Tan pronto llega la muestra al laboratorio se procede a sembrar para realizar:

- **RECUENTO DE BACTERIAS HETEROTROFICAS EN PLACA**

Es un procedimiento para estimar el número de bacterias heterotróficas presentes y viables en la muestra.

♣ **RECUENTO EN PLACA**

Procedimiento placa vertida remitirse al capitulo IV punto 3

Los medios de cultivo utilizado son:

- **Agar Triptona - Glucosa- extracto de levadura -**
- **Agar- leche desnatada- Plate Count-**
- **DILUCIONES 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10.000; 1/100.000; 1/100.000,** se harán las diluciones necesarias para obtener un recuento entre 30 y 300 colonias/ml

Dilucion 1/10 de la muestra se lleva a cabo en Erlenmeyer estéril según cuadro1

Cuadro 1

Agua estéril	90ml
Muestra	10ml

Recomendaciones:

Para las diluciones utilizar tubos de ensayos o Erlenmeyer con 9 o 90ml de agua destilada estéril. Agregar en condiciones de asepsia 1ml o 10 ml de muestra.

En el caso de la dilución de la muestra usar Erlenmeyer con 90ml de agua destilada estéril . Agregar 10ml de muestra.

PROCEDIMIENTO

- Tomar 10 ml de muestra con una pipeta graduada estéril a partir de la dilución en 1/10 contenida en el Erlenmeyer.
- Trasvasar al Erlenmeyer 1 que contiene 90ml de agua destilada estéril. Homogeinizar muy bien.
- Tomar 10ml del inoculo y trasvasar al Erlenmeyer 2 y 1ml a la caja de Petri correspondiente y así sucesivamente. Ver cuadro 2
- Invertir las placas e Incubar 48 horas a 37°C.

Secuencia de diluciones

Cuadro 2

Diluciones	1/100	1/1000	1/10.000	1/100.000	1/1000.000
Erlenmeyer	1	2	3	4	5
Agua destilada estéril	90ml	90 ml	90ml	90 ml	90ml
Cantidad de muestra	10ml ⇒	10 ml ⇒	10ml ⇒	10 ml ⇒	10ml
Caja de Petri con	1ml	1 ml	1ml	1 ml	1ml
Agar nutritivo					

- **Recuento**

El recuento se hará con muy buena luz y empleando una buena lupa.

Pautas

- Considerar para el recuento aquellas cajas que contienen entre 30 y 300 colonias.
- Computar recuento bacteriano por mililitros al multiplicar promedio de colonias en dos cajas si se trabajó por duplicado por la recíproca de la dilución usada.
- Informar UFC/ml (unidades formadoras de colonias por ml).
- Incluir en el protocolo del informe el método usado, temperatura, tiempo de incubación y el medio de cultivo

- **INVESTIGACION DE BACTERIAS COLIFORMES**

Determinación del N.M.P(número más probable)

Método de Wilson

Procedimiento tubos múltiples de fermentación

Medio de cultivo caldo Mac Conkey doble concentración y simple

Metodología

- Inocular una serie de 5 grupos de 6 tubos de caldo Mac Conkey (D-S-S) con diluciones 1/10; 1/100; 1/1000; 1/10.000; 1/100.000 de la muestra.
- Sembrar 5 ml de la muestra del Erlenmeyer 1, al tubo que contiene 10ml de caldo Mac Conkey doble concentración, además en dos tubos con el mismo medio, pero de concentración simple descargar 1ml, 0,1ml, respectivamente de la misma muestra.
- Homogeinizar la muestra y las diluciones se mezcla por aspiración
- Incubar a 37°C durante 48 hs efectuar la primera lectura a las 24 y a las 48hs.respectivamente.
- Primera lectura a las 24 ± 2 h para observar la producción de gas o desarrollo con producción de acidez. Esto constituye una reacción presuntiva positiva.
- Si es negativo, reincubar y reexaminar al final de 48±3h.

Interpretación

Positivo:

Formación de gas y de ácido (mas del diez por ciento del volumen del tubo de fermentación). Nos indica la presencia de Coliforme Totales. Constituye un test presuntivo positivo. Continuar con fase Confirmativa.

El número más probable (N.M.P.) de bacterias coliformes contenidas en 100ml de muestra se calcula utilizando las tablas de doble entrada de Hoskins.

Solo formación de ácido nos permite decir la presencia de Coliforme, sin existencia de E. coli.

Negativo:

Sin formación de gas ni ácido.

- **METODO DE PLACA VERTIDA**

Medios utilizados

- EMB (Agar -Eosina- Azul de metileno- lactosa- Sacarosa)
- Agar - Manitol- Rojo fenol
- Agar SS
- medio KF

Técnica

- Trasvasar con la misma pipeta estéril en condiciones asépticas(de acuerdo al capitulo II y IV) inoculo de 1ml a partir de las diluciones 1/10 ; 1/100 ; 1/1000 (ver cuadro 1 y cuadro 2 del tema recuento de bacterias) en placas de Petri estériles. Realizar por duplicado.
- Verter aproximadamente 12 ml de los medios EMB (Agar -Eosina- Azul de metileno- lactosa- Sacarosa); Agar - Manitol- Rojo fenol ; Agar SS ; medio KF Sabouraud; fundido y enfriado después en un baño de agua hasta unos 47°C.
- Mezclar con cuidado inoculo y medio, rotar las placas tres o cuatro veces en el sentido de las agujas del reloj y otras tantas en sentido contrario. Una vez solidificado el medio, incubar durante 24 a 48Hs. a 37 °C, colocando las placas en la estufa de cultivo en posición invertida.
- Realizar el recuento de colonias eligiendo para ello, si es posible, las placas con 30 a 300 colonias. Calcular él numero UFC por g/ml multiplicando el numero medio de colonias por el factor de dilución correspondiente a las placas elegidas para el recuento.

Segundo día FASE CONFIRMATIVA

A partir de los cultivos en caldo Mac Conkey que de resultado positivo a las 24 ó a las 48hs. de incubación a 37 °C se procede de la siguiente manera:

Lo primero que debemos hacer es diferenciar entre coliformes totales y coliformes fecales.

- De cada tubo con caldo Mac Conkey positivo sembrar una ansada en caldo bilis lactosa verde brillante para confirmar coliformes totales.
- Calcular NMP de coliformes totales /100ml de muestra. Calcular utilizando las tablas de Hoskins de doble entrada.
- Además de cada tubo con Caldo Mac Conkey positivo sembrar un inoculo en una placa de Agar EMB en superficie por estría. Incubar 24hs. a 37 °C

Tercer día

- A partir del Agar EMB, los colorantes incluidos en la formula inhiben muchos gérmenes positivos. Las colonias de E. Coli, por fermentar lactosa, se observa un color oscuro con brillo verde metálico.
- Sembrar en Agar Kliger (agar- hierro- dos azúcares) en pico de flauta por punción. El cultivo puro es sometido a investigación por estría en la superficie inclinada.
- Incubar 24 a 48 Hs. a 37 °C.

Cuarto día

De los tubos positivos de Kliger se procede ha llevar a cabo

- el IMViC,
- coloración de Gram (remitirse al manual de Sanidad)
- Pruebas bioquímicas (BLOQUE B)

BLOQUE A

❖ COMPOSICION Y PROCESAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

Para la conservación de las bacterias en el laboratorio se emplea los medios específicos para estudiar el metabolismo de las diversas especies microbianas y identificar la bacteria especifica presente en la muestra en este caso leche, los medios de cultivos utilizados son los siguientes:

- **Agar Triptona - Glucosa- extracto de levadura** -, el cual provee de nutrientes suficientes para el desarrollo de todos los gérmenes cuya óptima de crecimiento está en rango de 37°C (mesófilos).
- **Agar- leche desnatada- Plate Count-** este medio nos permite cuantificar los microorganismos presentes de leche y productos lácteos.

- **Agar extracto de levadura**

Es un medio para el cultivo de levaduras y mohos procedentes de materiales diversos, especialmente de leche y productos lácteos.

Composición

Componentes	cantidades
Extracto de levadura	5,0 g.
Glucosa	10,0 g.
Agar- Agar	20,0 g.
Agua destilada	1000ml.

pH = 6,5 ± 0,2

Preparación

Disolver 35g/l esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.

Empleo e interpretación

El medio de cultivo se siembra por el procedimiento de vertido en placa, explicado en el capitulo de metodologías de siembras.

- **Agar leche desnatada- Plate Count**

Este medio es aplicado para la determinación del recuento de gérmenes en leche y productos lácteos.

Fundamento

Merced a la adición de leche desnatada, este medio de cultivo goza de una base nutritiva de alto valor que se ajusta de manera óptima a las condiciones de vida naturales de los microorganismos presentes en la leche.

En comparación con otros medios de cultivo previstos para el mismo fin de utilización, éste medio cubre un espectro más amplio de microorganismos y muestra mayor número de colonias.

Composición

Componentes	cantidad
Peptona de caseína	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
Leche desnatada en polvo	1,0 g.

Glucosa	1,0 g.
Agar- Agar	10,0 g.
Ag. destilada	1000ml

Preparación

Suspender 20g/l de medio de cultivo dejar en reposo durante15 minutos, aproximadamente, calentar en un baño de agua, agitando frecuentemente hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121±C

pH = 7,1 ±0,1

El medio de cultivo preparado es más o menos opalescente.

Empleo e interpretación

Este medio se siembra por el procedimiento de placa vertida. Remitirse al capitulo de metodologías de siembras.

- **Caldo Mac Conkey**

Es un medio de cultivo selectivo para el ensayo previo orientativo de E. coli o gérmenes Coliforme y para la determinación del titulo de *coli* o coliformes en leche.

Es de interés demostrar la ausencia de contaminación de origen fecal en leche.

La investigación de ciertos microorganismos llamados indicadores de contaminación fecal, induce a pensar, en caso de tener resultados positivos, que otras bacterias potencialmente más patógenas, podrían estar presentes en leche(*Pseudomonas, Salmonella, otras, etc.*)

Los microorganismos más investigados son: Coliformes (*Enterobacter, Escherichia Coli, enterococos* etc.)

Como es de nuestro conocimiento el grupo de Coliforme comprende bacterias en forma de bacilo, no formadoras de esporas, Gram negativas, anaerobias facultativas, que fermentan lactosa con formación de ácido y gas en 24 y 48 Hs. El medio de cultivo mas adecuado para ponerlo en evidencia será:

Un caldo de enriquecimiento con una composición química desfavorable para bacterias que no nos interesa, pero lo suficientemente adecuado para el desarrollo de coliformes que podrá ser:

Caldo Mac Conkey contiene lactosa cuya degradación a ácido se visualiza por el viraje del indicador púrpura de bromocresol (violeta-amarillo) y por la presencia de gas en campanita de Durhan. Esta etapa constituye una fase presuntiva.

Fundamento

Este caldo contiene lactosa, cuya degradación a ácido y formación de gas señalan, por definición, la presencia de E. Coli. El gas formado se puede visualizar en las campanitas de Durhan, comprobando el ácido formado mediante el viraje a amarillo del indicador púrpura de bromocresol. La bilis de buey favorece el crecimiento de algunas bacterias intestinales e inhibe a los microorganismos no intestinales.

Composición

Componentes	cantidad
Peptona de caseína	20,0 g
Lactosa	10,0 g
Bilis de buey desecado	5,0g
Púrpura de Bromocresol	0,01g
Agua destilada	1000ml

pH 7,1±0,1

Preparación

Disolver 35 g/l del caldo Mac Conkey de acuerdo a las normas especificadas en el capitulo II bloque A de preparación de medio de cultivos, trasvasar 10ml de caldo en cada uno de los tubos de ensayo provistos eventualmente de campanitas de Durhan y esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El caldo distribuido es claro y de color violeta.

Empleo interpretación

Positivo

Formación de gas y ácido

Sospecha de presencia de E. Coli, eventualmente junto con Coliforme.

Sólo formación de ácido

Sospecha de presencia de Coliforme, sin existencia de E. Coli.

Negativo

Sin formación de gas ni ácido.

- **AGAR EMB (AGAR- EOSINA- AZUL DE METILENO- LACTOSA- SACAROSA)**

Es un medio diferencial para el aislamiento y detección de Enterobacteriaceae o bacilos coliformes relacionados a partir de muestras con bacterias mixtas.

Fundamento

Los colorantes anilina (Eosina - Azul de metileno) inhiben a bacterias grampositivas y gramnegativas exigentes. También se combinan para formar un precipitado con pH ácido, sirviendo como indicadores de la producción de ácidos.

El contenido de lactosa y sacarosa hacen posible la distinción de Salmonella y de Shigella lactosa negativa y sacarosa negativa, frente a la flora acompañante lactosa negativa pero sacarosa positiva (Por Ej. Pr. *Vulgaris, Citrobacter, Aeromonas hydrophila*).

Composición

Componentes	**cantidad**
Peptona	10,0 g
Hidrogenofosfato dipotásico	2,0 g
Lactosa	5,0 g
Sacarosa	5,0 g
Eosina	0,4 g
Azul de metileno	0,07g
Agar-agar	13,5g
Agua destilada	1000 ml

pH = 7,2 ± 0,1

Preparación

Pesar 36 g en una balanza Analítica, trasvasar a un Erlenmeyer de 1000 ml

Agregar agua destilada lentamente, disolver agitando suavemente, seguir agregando agua hasta completar el volumen deseado. Calentar a baño María hasta disolución total. Recordar las recomendaciones del capitulo II en la preparación de medios de cultivos. Ajustar a pH = 7,2 ±0,1

Empleo e interpretación

Las cajas de Petri se siembran cuidadosamente en superficie, por estría.

Incubación: 24horas a 37°C

Resultados

Colonias	microorganismos
Verdes - Negras con brillo metálico	Escherichia coli
Transparentes	Salmonella y Shigella
Púrpuras	Enterobacter - Klebsiella

- **AGAR MANITOL SALADO ROJO FENOL**

Es selectivo para la demostración de Estafilococos patógenos en alimentos y en productos lácteos.

Fundamento

Debido a la alta concentración de cloruro de sodio permite solamente el crecimiento de microorganismos tolerantes a ella, entre los que se encuentran, entre otros, los del género

Sthaphyloccus. La degradación del manitol, con formación de ácido, está notablemente correlacionada con la patogenicidad del germen en cuestión y sirve, por lo tanto, como indicativo de la presencia de *Staphyloccus aureus.*

Composición

Componentes	cantidad
Peptona	10,00 g
Extracto de carne	1,0 g
Cloruro sódico	75,0 g
D(-) manitol	10,0 g
Rojo fenol	0,0025 g
Agar- Agar	12,00 g
Agua destilada	1000ml

pH = 7,4±0,1

Preparación

Disolver 108 g del medio de cultivo, en un erlenmeyer perfectamente limpio, agregando agua destilada, agitar. Calentar a baño María hasta la disolución total. Trasvasar 12 ml a cada uno de los tubos de ensayos con una pipeta graduada perfectamente limpia. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121°C. El medio es claro de color rojo.

Empleo e interpretación

La siembra se realiza en superficie por estría. Debido al potente efecto inhibidor de este medio, debe sembrarse masivamente.

Incubar hasta 48horas a 37 °C en una estufa de cultivo.

Resultados

Colonias	**microorganismos**
Con halo amarillo, Crecimiento intenso	manitol positivo: Staphylococcus aureus
Sin cambio de color; Crecimiento débil	manitol negativo: Staphylococcus epid

- **Agar YGC (Agar- extracto de levadura- glucosa- Cloramfenicol)**

Agar selectivo para la cuantificación y aislamiento de levaduras en leches y productos lácteos.

Fundamento

Este medio de cultivo contiene Cloramfenicol para la inhibición de la flora acompañante. En contraste con otros medios de cultivo comparables que contienen antibióticos, este medio presenta la ventaja de ser totalmente esterilizable en autoclave.

Una vez realizada su preparación, se conserva durante un largo periodo de tiempo aproximadamente 4 meses.

Composición

Componentes	cantidad
Extracto de levadura	5,0 g
D (+) Glucosa	20,0 g
Cloramfenicol	0,1 g
Agar- agar	14,9g

Ag. destilada	1000ml

pH= 6,6 ±0,2

Preparación

Pesar 40,00 g del medio de cultivo, disolver en 1000ml de agua destilada seguir las recomendaciones de acuerdo al capitulo II. Ajustar el pH = 6,6 ±0,2. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121° C.

El medio de cultivo presenta una tonalidad clara y parduscas.

Empleo e interpretación

Este medio de cultivo se siembra por el procedimiento de vertido en placas y se incuba unos 4 días a 25°C.

Después se realiza la cuantificación de las colonias de levaduras en la respectiva caja de Petri.

- **Medio Agar- Salmonella- Shigella**

Fundamento

Es un medio altamente selectivo formulado para inhibir el crecimiento de varios Microorganismos coliformes y permite el crecimiento de especies *Salmonella y Shigella.*

La alta concentraciones de sales biliares y el citrato de sodio inhiben todas las bacterias grampositivas y muchos microorganismos gramnegativos incluyendo coliformes.

La lactosa es el único hidrato de carbono y el rojo neutro es el indicador para la detección de ácidos.

El tiosulfato de sodio es una fuente de azufre. Cualquier bacteria que produce H_2S se detecta por el precipitado negro formado con citrato férrico.

La alta selectividad del agar SS permite usar gran cantidad de inoculo grande.

Composición

Componentes	cantidad
Extracto de carne	5,00 g.
Peptona	5,00g
Lactosa	10,00g
Sales biliares	8,50 g
Citrato de sodio	8,50 g
Tiosulfato de sodio	8,50 g
Citrato férrico	1,00g
Agar	12,5g
Rojo neutro	0,0025g
Verde brillante	0,033g
Agua destilada	1000ml

Ajustar el pH = 7,0 ± 0,1

Preparación

Pesar 60 gramos del medio de cultivo y disolver en 1000ml de agua destilada siguiendo las indicaciones del capitulo II del bloque A.

Empleo

Sembrar, por estrías, la superficie del medio de cultivo con una ansada de microorganismos.

Incubar 18 - 24h a 37 °C.

Las colonias de gérmenes lactosa negativos son incoloras, y los microorganismos lactosa positivas son rosadas hasta rojas.

Las colonias de microorganismos formadores de H_2S presentan un centro negro.

Interpretación	microorganismos
Colonias Incoloras, transparentes	Shigella, Salmonella
Transparentes con centro negro	Proteus
Rosadas hasta roja	Escherichia coli
Mayor diámetro cremosas blanquecina	Enterobacter aerogenes

- **Agar KF para Estreptococos**

Para cuantificación de Enterococos en agua, alimentos.

Fundamento:

La maltosa y lactosa se utilizan para la mayoría de los Enterococos, con formación de ácidos, y por lo tanto favorecen su crecimiento, en tanto que las especies indeseables de

gérmenes resultan ampliamente inhibidas por la azida sódica. La formación de ácido se pone de manifiesto por el viraje a amarillo del indicador Púrpura de bromocresol.

Composición

Componentes	cantidades
Proteosa- peptona	10,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Cloruro sódico	5,0 g
Glicerofosfato sódico	10,0 g
Maltosa	20,0 g
Lactosa	1,0g
Azida sódica	0,4 g
Púrpura de bromocresol	0,015 g
Agar- Agar	15,00 g
Agua destilada	1000ml

Aditivo : 2,3,5 – trifeniltetrazolio cloruro (TTC) 0,1g

pH = 7,2 ± 0,2

Preparación

Disolver 71,5 g e en 1000ml de agua destilada. Esterilizar cuidadosamente en autoclave durante 10 minutos a 121°C.

Dejar enfriar hasta 50 °C. aproximadamente, incorporar 10ml de una solución al 1% de TTC (2,3,5 – trifeniltetrazolio cloruro) y verter en placa.

Las placas con medio de cultivo son claras y de color violeta.

Empleo e interpretación

Se aplica el recuento en Placa.

Incubar: 37 °C durante 48 hs.

Resultados

Colonias	**microorganismos**
Siempre de buen crecimiento colonias ***rojas halo amarillo)***	Enterococos(*Str.Faecalis Str. Bovinus Str. Equinus)*
Crecimiento escaso, sin Viraje de color	*Lact.Plantarum, Pediococcus*

- **Agar – Glucosa 2% Sabouraud**

Es recomendado para el cultivo de dermatofitos. Además para el ensayo de sensibilidad de hongos.

Composición

Componentes	cantidad
Peptonas	10,00 g
D(+) glucosa	20,00g
Agar agar	17,00g
Agua destilada	1000g

Preparación

Disolver 30 g en 1000ml de agua destilada. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos a 121 °C. pH 5,6 ± 0,1

Las placas con medio de cultivo son claras e incoloras.

Empleo e interpretación

L a colonias de hongos crecidas evaluar macro y microscópicamente.

- **PRUEBA CON AGAR TRIPLE AZUCAR (TSI) y AGAR DE HIERRO DE KLIGER**

El Principio de esta prueba es determinar la capacidad de un microorganismo de atacar un hidrato de carbono (que se encuentra incluido en el medio de cultivo) , la producción o no de gases y de H_2S.

La producción de H_2S y/o las diversas formas de fermentación de características de los grupos, géneros o especies bacterianas, sobre todo entre la familia enterobacteriaceae, ayudan además a determinar la especie en el género Yersinia.

AGAR HIERRO KLIGER

Composición

Componente	cantidad
Peptona caseína	15,00
Peptona de carne	5,00g
extracto de carne	3,00g
Extracto de levadura	3,00 g
Cloruro sódico	5,00g
Lactosa.	10,0g
Amonio e hierro (III).citrato	0,5g
tiosulfato sódico	0,5g
Rojo de fenol	0,024g
agar-agar	12,00g
agua destilada	1000ml

pH del medio de cultivo preparado es de 7,4 ±0,1

Preparación

Disolver 55 g en 1litro de agua recientemente desmineralizada o destilada, envasar a razón de 5 ml por tubo y esterilizar en autoclave a 120(C durante 15 minutos. Después dejar de solidificar como agar inclinado. El medio de cultivo preparado es claro y de color rojizo- pardusco.

Modo de siembra:

Se siembra por punción con ansa recta y luego sin cargar en superficie por estrías. Incubar a 35°C y leer entre 18 y 24h.

- **PRUEBA DE LA CATALASA**

FUNDAMENTO

La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua. Desde el punto de vista químico, es una hemoproteína similar en estructura a la hemoglobina. Salvo los *Streptococos,* la mayor parte de bacterias aerobias y anaerobias facultativas poseen actividad catalasa. La mayoría de las bacterias anaerobias que descomponen el peróxido de hidrógeno lo hacen mediante enzimas peroxidasas.

La prueba de la catalasa, realizada por los métodos del portaobjeto o en tubo, por lo común para diferenciar los *Estreptococos* (negativos) de los E*stafilococos* (positivos) o para diferenciar bacilos grampositivos de las micobacterias.

Reactivo:

Peróxido de hidrógeno al 3%, almacenado en frasco marrón refrigerado. Una placa de agar de 18 a 24 horas o un agar inclinado conteniendo un cultivo puro de los microorganismos a estudiar.

Procedimiento

Prueba en portaobjeto

Transferir células desde el centro de una colonia bien aislada a superficie de un portaobjeto de vidrio con un ansa.

Agregar una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Se recomienda que el microorganismo no sea agregado al reactivo (no revirtir el orden), en especial si se usan ansas con contenido de hierro, porque puede haber resultados falso- positivos.

Método en tubo o placa de agar

Agregar unas gotas pocas gotas alrededor de 1ml de reactivo de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre la superficie de agar en placa o en pico de flauta.

Interpretación

La rápida aparición y sostenida producción de burbujas de gas o efervescencia constituye un resultado positivo.

- **Prueba de la Coagulasa**

Fundamento

La coagulasa es una proteína de composición química desconocida, con actividad semejante a la protrombina, capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. En el laboratorio la prueba de coagulasa se emplea con mayor frecuencia para diferenciar Staphyloccus aureus (coagulasa positiva) de los *estafilococos* y *micrococos.*

La coagulasa está presente en dos formas, libre y ligada, cada una con diferentes propiedades que requiere la aplicación de pruebas separadas.

Procedimiento

Prueba de portaobjeto

Se coloca una gota de agua destilada estéril o solución salina fisiológica sobre un portaobjeto de vidrio.

Con cuidado, emulsionar una suspensión de microorganismos en la gota de agua usando un ansa.

Se coloca una gota del plasma coagulasa al lado de la gota de suspensión bacteriana. Se mezcla.

Se mueve el portaobjeto hacia delante y atrás, observando la inmediata formación de un precipitado granular blancos.

BLOQUE B

❖ **PRUEBAS BIOQUIMICAS**

Una vez obtenido el cultivo puro, el paso siguiente para la identificación del microorganismo es la realización de una serie de pruebas de caracterización entre las que se incluyen:

Forma y disposición celular tipo de metabolismo, propiedades tintoriales, etc.

♦ **PRUEBA DEL INDOL**

FUNDAMENTO

Determina la capacidad de un microorganismo para desdoblar al triptófano produciendo Indol.

El Triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol e indol acético. Diversas enzimas intracelulares intervienen en este proceso formando un sistema completo vinculado con la producción de indol y recibe el nombre de triptofanasa.

Para la realización de la prueba se utilizan medios basándose en peptona, dentro de cuyos aminoácidos se encuentra el triptófano; en caso de ser éste hidrolizado el indol puede ser detectado por un reactivo que produzca una combinación química con desarrollo de color.

MEDIO UTILIZADO- AGUA PEPTONADA-

COMPOSICION

Componente	cantidad
PEPTONA	1,00g
NaCl	0,50g
Agua destilada	100ml

Ajustar a pH = 7,0- 7,2

Se siembra con poco inoculo e incuba a 37°C durante 24 - 48hs. Transcurrido ese tiempo se adiciona alguno de los siguientes reactivos:

Reactivo de Kovacs

Composición	cantidad
Alcohol amilico	150ml
p-dimetilbenzaldehido	2,00g
HCl concentrado	50,00ml

A una alícuota del cultivo se adiciona 5 gotas del reactivo y agitar suavemente Se lee.

Reactivo de Erlich

Composición	cantidad
Alcohol etílico 95 °C	190ml
p- dimetilaminobenzaldehído	2,00g
HCl concentrado	40ml

Se adiciona 1ml de éter para extraer el indol y luego 0,5 ml del reactivo por las paredes del tubo. Se lee.

Interpretación

1- Positivo

Anillo rojo en la superficie del medio, en la capa alcohólica.

2- Negativo

Toma el color del reactivo (amarillo).

Reacción de color

Fundamento

La estructura primicia del indol reacciona con el p-dimetilaminobenzaldehido presente en cualquiera de ambos reactivos formando una estructura quinoide de color rojo violáceo. Este complejo es extraído y concentrado por el alcohol amilico del reactivos de Kovacs o por el éter previamente agregado del reactivo de Ehrlich.

- **Prueba de Voges- Proskauer**

Fundamento:

Determinar la capacidad de algunos microorganismos de producir un producto neutro el acetil metil carbinol (acetoína) intermediario de la producción de 2,3 butanodiol a partir de la fermentación de glucosa.

Los fermentadores ácido- mixto pueden dividirse en dos grandes grupos:

1) Los que producen ácidos pero no 2,3 butanodiol (o 2,3 butilenglicol), como E. coli da V.P (-)

2) Los que producen 2,3 butanodiol como principal producto teminal. Ejemplo los grupos Klebsiella- Enterobacter VP(+)

Composición

Para la realización de estas pruebas se utiliza el medio de Clark y Lubs, que es una Solución buffer de peptona glucosada.

Componentes	cantidades
k2HPO4	5g
Peptona	5g
Glucosa	5g
a.d.c.s.p	1000ml

Ajustar a pH 7-7,2. Esterilizar la glucosa por separado, sembrar. Incubar a 37 °C durante 48hs.

Reacción Color

Fundamento

En presencia del oxigeno atmosférico y álcalis, los productos finales neutros acetoína y 2,3-butanodiol son oxidados a diacetilo, que es el reactante para el color producido en la reacción de Voges- Proskauer. El diacetilo en presencia de los núcleos guanidina (que se encuentran en la peptona), el alfa- naftol y la creatinina producen compuestos de color rojo.

Reactivo

Componentes cantidad

a)

alfa naftol	5,00g
alcohol de 95°C	1000ml

b)

Hidróxido de Potasio	40,00 g.
Creatinina	0,30g.

A.D	100ml

A una alícuota de cultivo adicionar 0,2ml de solución de alfa- naftol, añadir a continuación 0,1-0,2 ml KOH al 40%. Agitar .

Resultados

A) Reacción V.P. Positiva: color rojizo oscuro en la superficie del medio indica la presencia de acetoína.

B) Reacción V.P. Negativa: Color amarillo en la superficie del medio (el mismo del color del reactivo). Puede formarse un color cobrizo, pero aún así la reacción es negativa.

Precauciones:

1) En caso de reacción negativa se debe calentar suavemente.

2) El período de incubación de cultivo no debe exceder los 3 días

3) Respetar el orden de agregado de los reactivos: primero el alfa naftol y segundo el KOH no debe exceder los 0,2 ml. El exceso puede ocultar una reacción VP débilmente positiva.

- **PRUEBA ROJO DE METILO**

FUNDAMENTO

A) Comprobar la capacidad de un organismo de producir y mantener estables los productos terminales ácidos de la fermentación de la glucosa y vencer la capacidad amortiguadora del sistema.

B) Es una prueba cualitativa de la producción de ácidos.

Reacción de color

La prueba de Rojo de Metilo se basa en el empleo de un indicador de pH, rojo de metilo para determinar la concentración de iones de hidrógeno(pH) presente cuando un organismo fermenta la glucosa.

El rojo de metilo es un indicador ácido, que indica los cambios en el grado de acidez por reacciones de color

pH 4,4 o menor, el reactivo se mantiene rojo

pH =5 a 5,8 se producen diferentes tonalidades de anaranjado

pH =6 color amarillo

Reactivo rojo de metilo

Componente	cantidad
Rojo de metilo	0,1g
Alcohol	300ml
A.D	200ml

A la otra alícuota del cultivo agregar 2-3 gotas de la solución de rojo metilo.

Interpretación

RM POSITIVO: COLOR ROJO DEFINIDO (pH=4,4)

RM NEGATIVO: COLOR AMARILLO (pH =6)

Reacción retardada; COLOR ANARANJADO. CONTINUAR LA INCUBACION HASTA 4DIAS Y REPETIR LA PRUEBA.

- **PRUEBA DE CITRATO**

Fundamento

Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar citrato como única fuente de carbono para el metabolismo, provocando alcalinidad.

Algunas bacterias pueden suministrar energía en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico, usando el citrato como única fuente de carbono, también utiliza las sales de Amonio(NH_4) como única fuente de nitrógeno, desdoblando estas a NH_2 con producción de la consiguiente ALCALINIDAD.

MEDIOS UTILIZADO

MEDIO CITRATO DE SIMMONS

Composición

Componente	cantidad
$MgSO_4$	0,20g
NaCl	5,00g
NH_4H_2PO	1,00g
Citrato de sodio	2,00g
Azul de bromo Timol	3,00ml
Agar	15,0g
Agua destilada	1000ml c.s.p

Ajustar a pH=6,8- 7,0,

color del medio: verde

Se inocula por estrías únicamente sobre la porción inclinada del medio en pico de flauta.

Incubación: 37°C durante 24- 48 Hs.

Interpretación

POSITIVO

Crecimiento con viraje de color azul intenso en el pico de flauta (a veces todo el medio).

NEGATIVO

No se observa crecimiento ni cambio de color del medio (permanece verde)

- **REDUCCION DE NITRATOS**

Fundamento:

Determinar la capacidad de un organismo de reducir el nitrato en Nitritos, amoniaco o nitrógeno libre. Esta reducción tiene lugar generalmente en condiciones anaerobias, ya que

la enzima que interviene, la nitrosa es sensible al oxigeno. En estas condiciones el microorganismo obtiene el oxigeno del nitrato, siendo este proceso de oxidación una respiración anaerobia.

Composición del medio

Composición	cantidad
Extracto de carne	3,00 g
Peptona	5,00g
kNO3	1,00g.
Ad. C.P	1000ml

Ajustar el pH = 7-7,2

Envasar en tubos con campanitas de Durhan. Sembrar. Incubar a 37 °C 24-48 horas.

Este medio se puede preparar como medio sólido con 4,5% de agar; o semisólido con 0,2 -0,4% de agar.

Se puede investigar:

a)Nitrógeno: Se evidencia por la presencia de gas en la campanita.

b) Nitrito: A una alícuota del cultivo adicionar 2gotas de cada uno de los reactivos de Islova Van Islovay

Reactivos

Composición

Componente	cantidad
a) ácido Sulfanilico	8,00g.
ácido acético 5N	1000ml
b) alfa Naftilamina	5,00g.
ácido acético 5N	1000ml

Reacción de color

Fundamento: Los dos reactivo ácido Sulfanilico y alfa naftilamina reaccionan con el grupo nitrito formado. La reacción de color resultante se debe a la formación de un compuesto diazoico para- sulfobenceno- azo-alfa- naftilamina.

Interpretación

Prueba positiva : color rosado o rojo intenso

Prueba negativo: no se desarrolla color

c) **Amoniaco**: Se pone de manifiesto por el agregado de unas gotas de reactivo de Nessler a la alícuota restante del cultivo.

Reactivo:

Componentes	Cantidad
Hg_2Cl	13,55g.
KI	36,00g
agua destilada c.s.p	1000 ml
NaOH AL 40%	300ml

Nota: Preparar el reactivo añadiendo las drogas en el orden indicado.

INTERPRETACION

PRUEBA POSITIVA: COLOR ROJO LADRILLO

PRUEBA NEGATIVA: NO SE DESARROLLA COLOR.

- **PRUEBA DE FENILALANINA**

Fundamento e interpretación

La desaminación oxidativa de la fenilalanina por parte de ciertos microorganismos se puede poner de manifiesto por adición de unas gotas de FeCl3 al 10% al cultivo; en caso positivo, se observa aparición de color verde como consecuencia de la formación de compuestos coloreados, debido a la presencia de ácido fenilpirúvico producido durante la desaminación.

COMPOSICION

Componente	cantidad
Extracto de levadura	3,00g
L -Fenilalanina	1,00g
Na_2HPO_4	1,00g
NaCl	5,00g

Agar	12,00g
agua destilada c.s.p	1000ml

Ajustar a pH = 7,0- 7,2

Fraccionar en tubos a razón de 3ml en cada uno. Esterilizar durante 15 minutos a 121° C . Después inclinar en pico de flauta. Sembrar por estrías e incubar 24hs

- AGAR LISINA HIERRO

Para identificación de Enterobacteriáceas.

Fundamento

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD- positivos, que los transforma en amina Cadaverina.

Esto produce un viraje al violeta del indicador púrpura de bromo cresol. Puesto que la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido, por fermentación de la glucosa.

Los microorganismos LD negativos, pero fermentadores de la glucosa producen un viraje al amarillo a la totalidad del medio.

La incubación prolongada puede ocasionar una alcalinización en la zona superficial del medio de cultivo, y en consecuencia produce a un viraje a violeta. La formación de H_2S produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

COMPOSICION

Componentes	cantidad
Peptona de carne	5,0g
Extracto de levadura	3,0g
D(+)-glucosa	1,0g
L-LIsina monoclohidrato	10,0g
Sodio tiosulfato	0,04g
amonio y hierro(III) citrato	0,5g
Púrpura de bromo Cresol	0,02g
agar-agar	12,5g
agua destilada	1000ml

pH del medio de cultivo preparado es 6,7 ± 0,1

Las enterobacterias pueden descarboxilar, desaminar o no descarboxilar la lisina, produciendo gas o no produciendo o no H_2S.

PREPARACION:

Se pesan 32 g del medio de cultivo se suspenden en 1litro de agua recientemente destilada, se humedecen durante 15 minutos y se calientan en baño María hasta disolución total.

Después, se envasan 5ml por tubo, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15minutos. Dejar enfriar en posición inclinada. pH = 6,7 ± 0,1

El medio de cultivo es claro de color violeta.

Empleo interpretación

Este medio se siembra por punción o bien por estrías sobre la superficie inclinada.

Incubar : 16- 18 horas a 37 ° C.

Resultados

Microorganismos	columna vertical	superficie inclinada	SH_2
Salmonella	violeta	violeta	+
Proteus	amarillo	pardo rojizo	+
Escherichia	amarillo o	violeta	-
Shigella	amarillo	violeta	-
Klebsiella	violeta	violeta	-

TINCION PARA CELULAS SOMATICAS

a) PREPARACION DEL AZUL DE METILENO (COLORANTE)

1) Pesar 0,6 gramos de azul de metileno

2) Disolver en 30 mililitros de alcohol 96 °C

3) Agregar 64 mililitros de ácido acético glacial

4) Dejar de madurar 5 días a temperatura ambiente

5) Filtrar con papel de whatman Nro.4

Tinción de los extendidos

1) **Fijación**: Pasar el portaobjeto por alcohol 96° y secar en estufas (44- 46 C) durante 10 minutos.

2) **Desengrase**: Sumergir el portaobjeto en la solución de azul de metileno durante 3 minutos.

3) **Tinción**: Su el portaobjeto en la solución de azul de metileno durante 3 minutos.

4) **Lavado**: lavar con agua de canilla tibia hasta eliminar todos los excedentes de colorante y secar en estufa durante 30 minutos.

CAPITULO VII

❖ ALTERACIONES PRODUCIDAS POR LOS MICROORGANISMOS

En la leche son muchisimas las alteraciones de origen microbiano que puede sufrir las leches. Consideramos:

El agriado: La leche recién ordeñada es solo ligeramente ácida por la caseína y los fosfatos que naturalmente contiene. Su acidez se va intensificando por acción de los microbios formadores de ácido láctico.

Descomposición gaseosa: Se forma CO_2 debido a la proliferación de colibacilos, bacterias butíricas y levaduras. Las levaduras Torula cremoris, t. spherica y T. lactosa atacan la lactosa en verano especialmente cuando la leche esta algo agria.

Los colibacilos pueden, además de producir gas, provocar la formación de coágulo, observándose emulsionamiento de suero hacia la superficie.

Los clostridios butiricos requieren anaerobiosis y por eso se multiplica mejor en conservas lácticas de las que ha sido desalojado el aire.

Alteración viscosa: La leche se pone mucilaginosa, pegajosa, con aparición de filamentos superficiales, que se estiran formando cordones de varios metros: se torna incomestible. Los gérmenes de esta alteración provienen del aire ambiente o del agua; a veces de los utensilios o de las ubres.

Coagulación dulce: Es provocada por la quimosina de los gérmenes, sin producción de ácido láctico. Pueden provocarla: bacilos esporulados Aerobios y también bacilos no esporulados, que forman cuajada blanda, que luego proteolizan , sin previa acidificación.

Proteolisis : Se inician con la digestión de la caseína y termina con la putrefacción. El Strep. liquefaviens sería el agente principal.

Lipolisis: Provocada por microorganismos que descomponen la grasa en glicerina y ácidos grasos. Son también proteoliticos, como por ejemplo, la Pseudomonas fragi y la Ps. fluorescens y el Achromobacter lipidis.

Gustos y olores desagradables: Se producen por acción de diversos microorganismos, por alimentación de los animales o por enfermedad del animal.

Amargo aparece en la leche por proliferación de microorganismos de las mamas: M lactis, M amari, Strep. liquefaciens y Torula amara; por consumo de forrajes como nabos y altramucos; por trastornos fisiológicos del animal.

Olor a establo: generalmente lo adquiere la leche por contacto con un ambiente sucio y mal ventilado.

Olor a vegetales: Se debe usualmente a los forrajes o el ambiente donde se guardan

Otras veces puede ser origen microbiano provocado por Ps. graveolens y la Ps. mucidolens.

Olor a frutas se debe a la proliferación de Ps. fragariae; olor aromático alcohólico al M.caseolvticus; olor malteado a la proliferación de algunos microcosmos, al B. subtilis y al Strep. lactis .

Olor a rancio, a tocino : Se produce en leche frescas que se ha dejado al principio a una temperatura de 27°C, por acción de luz solar.

Olor y gusto a pescado: Se debe a la acción de bacterias que infectan las mamas, especialmente el B. Ichthyosmius (hay acción sobre la lecitina que cede colina y ésta trimetilamina, responsable del olor y del gusto).

Leche jabonosa: Presenta gusto a jabón, a veces amargo, otras dulzón; forma espuma al ser agitada. Se produce por acción del B. lactis saponacei o de la Ps. foetida, cuando se almacena a temperatura próxima a 0°C.

Coloraciones anormales: Son a veces muy notables y se originan por acción de distintas bacterias.

Roja: Se debe a los pigmentos de la Serratia marcescens y otras bacterias.

Azul: provocada por desarrollo de la Ps. cyanogenes, B. syncyaneum, proveniente de infección de las ubres o llevadas por las moscas a la leche.

Amarilla : Se aprecia en la capa cremosa y se produce por desarrollo del B. synzanthus.

Leche mohosa : Cuando la leche está algo ácida y se la guarda en la heladera se puede desarrollar mohos, especialmente el Oospora lactis, que forma una película superficial coloreada que torna repugnante.

Leche rancia o aceitosa: La rancidez hidrolitica es provocada por hidrólisis de la grasa debida a acción bacteriológica. Se encontró responsable a la Ps. fragi

❖ CALIDAD HIGIENICO- SANITARIA DE LECHE CAPRINA

La calidad de la leche continua siendo uno de los puntos más débiles, dentro del conjunto de factores que determinan la calidad de los quesos, especialmente en los países en desarrollo, de tradición lechera caprina ovina.

La leche destinada a la transformación quesera debe ser evaluada en sus características químicas, microbiológicas y sanitarias.

Los parámetros más importante son :

Composición de la leche (grasa, proteína, lactosa ,sales minerales)

Leche anormal (ácida, mastítica)

Calidad microbiológica (Recuento total de bacterias, levadura, recuento de Células Somáticas)

Presencia de residuos, adulterantes (antibióticos, desinfectantes, aguado)

Leche mastítica

La mastitis es una infección de la glándula mamaria que puede ser causada por diversos microorganismos patógenos.

Cuando la misma este presente en nuestro rodeo, comprobara lo siguiente:

- Disminución de la producción de la leche proveniente de animales infectados.
- Alteración de su composición físico- química, especialmente las fracciones proteicas.
- Disminución notable de los niveles de caseína, de lactosa, y de materia grasa.
- Incremento del pH y disminuye la acidez titulable.
- Aumenta significativamente el tenor de cloruros.
- Disminuye la cantidad de calcio y potasio.

También hay que tener en cuenta que las leches con estas propiedades están muy cargadas de lipasas favoreciendo los procesos de oxidación y rancidez, y proteasas que actúan sobre las caseínas modificando notablemente la aptitud de la leche a coagular frente al cuajo y la de ser acidificadas por las bacterias lácticas.

Con relación a la fabricación de quesos, la leche mastítica puede provocar una serie de problemas.

Las principales alteraciones son:

- Prolongación del tiempo de coagulación (debido a la modificación de pH).
- Obtención de cuajada menos firme.
- Al corte, mayor perdidas de caseína y grasa a en suero, con la consecuente reducción del rendimiento de la producción.
- Disminución de la calidad final del queso.

No es difícil detectar leche mastítica en el establecimiento o en la recepción, basta aplicar test rápidos como el CMT(California Mastitis Test) o realizar el Recuento de Células Somáticas.

En nuestro país no están legislados valores normales de recuento de células somáticas para leche de pequeños rumiantes, los datos existente son de bibliografía internacional.

En general , se considera Leche de cabra mastítica aquella que posee CMT > a 1 y/o RCS > a 1millon de células/ml, y la leche4 de oveja mastítica posee RCS>a 500mil células /ml .-

Leche ácida

La leche ácida (Acidez normal leche de cabra : entre 14 y 17 °D, Acidez normal entre leche de oveja es entre 18 y 22 °D. Es un problema muy frecuente y común en nuestra provincia por el clima y además esta relacionado con las condiciones higiénicas de producción recolección y transporte de la leche a la fabrica.

La acidificación es el resultado sobre todo de la contaminación en la producción y exposición de la leche a temperatura ambiente, que favorece el crecimiento de microorganismos contaminantes generalmente pertenecientes a la flora mesófila.

Diversos factores pueden influir en la acidificaron de la leche, entre los cuales se puede mencionar:

- Higiene del local de ordeño, de la ubre del animal, del ordeñador, de los utensilios utilizados en el ordeño (como eventualmente paños que se usan para colar la leche) y de los contenedores donde la leche es almacenada y luego transportada.
- Exposición de la leche a temperatura ambiente por un periodo prolongado.
- Demora en el transporte a la usan, cuando este no es refrigerado.

❖ CALIDAD MICROBIOLOGICA

La contaminación a través de los pezones se ve sensiblemente incrementado por el hecho de que para obtener la misma cantidad de leche con ovejas y cabras que con vacas hace falta ordeñar de 10 a 15 veces más animales.

Este problema esta aún mas acentuado en la leche de cabra por su fácil acidificación.

Por lo tanto es lógico deducir que el desarrollo microbiano es mas rápido en al leche de cabra por su falta de substancias inhibidos naturales como la aglutinan.

El problema de calidad microbiológica que con frecuencia afecta a la industria quesera es:

LECHE CON ALTOS RECUENTOS MICROBIANOS

La leche es un excelente medio de cultivo para los microorganismos, es fácilmente alterable.

Adulteraciones

a- PRESENCIA DE INHIBIDORES

Los inhibidores puede encontrarse en la leche por introducción voluntaria fraudulenta (agregado por el productor interesado en prolongar la durabilidad de la leche ej. Agua oxigenada) o por vía indirecta, originada en el tratamiento terapéutico con antibióticos de las cabras u ovejas que padecen algún tipo de infección, especialmente de mastitis.

Como la presencia de antibióticos en la leche genera graves problemas de inhibición de la fermentación láctica, la leche de animales tratados debe ser separada por lo menos por 3 - 5 idas después de la aplicación.

Nunca se puede esperar un buen producto partiendo de leche con inhibidores.

Los problemas generados por los mismos se pueden manifestar de diversas formas:

- La leche usada para fermentar no coagula aunque haya sido hervida por una hora y repicada con cultivo en plena actividad.
- El queso no fermenta adecuadamente y por lo tanto su acidez no desciende a los niveles deseados.
- Aumenta el riesgo de formación de gas por bacteria Coliforme ya que estas son mucho más resistentes a los antibióticos que las bacterias lácticas y encontraran en el queso un alto tenor de lactosa que no fue fermentada.
- El queso no madura adecuadamente, fenómeno conocido como queso muerto (queso de textura gomosa y de sabor, aroma muy débiles).

Este problema es tan grave que todos los establecimientos elaborados de quesos de cabra u oveja que reciben leches de terceros debería realizar control periódico de la

presencia de inhibidos, especialmente de antibióticos en al leche, promoviendo una actividad constante de instrucción al productor para separar la leche de animales tratados.

Los exámenes de antibióticos son una necesidad en la industria de quesos y leches fermentadas y forman parte no solamente de la selección de la leche, sino también de cualquier programa de pago de leche por calidad.

b- Aguado

El agregado de agua a la leche origina mayores gastos de producción como vapor y frío, pero la incidencia más importante es en la coagulación de la leche donde al bajar la concentración de la caseína da lugar a cuajadas más blandas e inconsistentes que ocasionan mayores perdidas de grasa en el suero.

El agregado adicional de cuajo, aparte de ser un gasto extra, mejora en parte la velocidad de coagulación pero no substancialmente la consistencia final de la cuajada.

La detección de este tipo de fraude se basa en la medición del punto Crioscopico o punto de Congelación por Crioscopía en la leche frescas no acidificadas.

Generalmente, cuando se obtiene en valor absoluto inferiores a -0,570 para leche de cabra y ovejas se puede sospechar la adición de agua.

CAPITULO VIII

❖ EL RECUENTO DE LAS CELULAS SOMATICAS Y LA CALIDAD DE LA LECHE

El recuento de células somáticas (RCS) es comúnmente usado como una medida de la calidad de la leche. Las células somáticas son simplemente células del cuerpo animal presentes en bajos niveles en una leche normal. Altos niveles de estas células indican una calidad de la leche anormalmente reducida, causada por una infección bacteriana intramamaria (mastitis).

La mayoría de las células en un recuento de células somática son leucocitos y solo algunas células provienen del tejido secretor de la ubre (células epiteliales). Las células epiteliales son parte de la función corporal normal y se descaman y renuevan en los procesos corporales normales. Los glóbulos blancos actúan en mecanismo de defensa que combate esa enfermedad(infección) y ayudan en la reparación de los tejidos dañados.

El recuento rutinario de las células somáticas de las leches del mercado nos ayuda a conocer la cálida del producto. Los RCS son monitoreados para asegurar él cumplimento con los estándares federales y estatales de calidad de leche. Hoy, el mercado premia a las leches con bajo RCS considerándolas como leche de excelente calidad.

Una leche con elevado RCS sufre un aumento en las proteínas del suero y una disminución de la caseína, resultando un considerable descenso en la producción de quesos. Además, la disminución de la duración y el sabor desagradable son los resultados

más comunes de un elevado resultado del RCS. Un elevado RCS aumenta los componentes indeseables y disminuye los componentes deseados en la leche.

El desarrollo de equipos contadores electrónicos de células somáticas y la tecnología del sistema de red computarizada ha facilitado el recuento de células somáticas, haciéndolo utilizable para el control de casi todos los productos de lechería.

El recuento de células somáticas se basa en el numero de células por militro de leche (1ml equivale aproximadamente 10 gotas).

❖ CAUSAS DE UN RECUENTO ELEVADO DE CELULAS SOMATICAS

Estos elevados niveles de RCS pueden ser el resultado de varios factores:

La glándula mamaria esta infectada por organismos causantes de mastitis.

Los microorganismos más comunes que infectan la glándula productora de leche se clasifican en dos grupos: a) Patógenos contagiosos b) patógenos oportunistas. El contagio por patógeno (Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae y otros) produce un aumento muy grande del RCS. Una infección por un patógeno oportunista (Corynebacterium bovis y Sthaphylococcus coagulasa negativa), usualmente produce incrementos mas leve.

2- Periodo de lactación y Vacas viejas

Generalmente la observación indica que el RCS aumenta con la edad de la vaca y con el perro de lactación.

3-Estrés y estación de año.

4- Causas indirectas.

PRUEBA DE LA MASTITIS DE CALIFORNIA (CMT)

La prueba de la mastitis de California (CMT) es una rápida y exacta prueba que ayuda a determinar la concentración de células somáticas en leche. Es una prueba sensible, rápida y económica, primariamente desarrollada para muestrear cuartos vacunos, pero también puede ser usada sobre el contenido de un balde o del tanque colector de leche, determinado así el rango de RCS de todo el volumen de leche.

Resumen

El factor predominante que afecta el nivel RCS del rebaño o de una vaca individual es la infección intramamaria. Las causas de estas infecciones son muchas y el método de transmisión puede ser un factor virtual simple o una combinación de varios factores. El análisis de estos factores, combinado con la historia del rebaño, el medio ambiente del animal y la cultura bacteriológica, proveen información importante para tomar decisiones para prevenir los problemas y reducir los cambios en el recuento de las células somáticas.

BIBLIOGRAFIA

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS TOMO I Y II - F.M LUQUET EDITORIAL ACRIBIA. S.A.

MICROBIOLOGIA LACTOLOGICA TOMOI Y II R.K.ROBISNSON EDITORIAL ACRIBIA S.A.

AOAC OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS (1995)