

ENSAIOS MICROBIOLÓXICOS NA INDUSTRIA ALIMENTARIA



XULLO 2013

TEMARIO DO CURSO

1. Introducción	1
1.1. Riscos biolóxicos	1
1.2. Normas de seguridade no laboratorio	1
1.3. Preparación do materia	2
1.3.1. Limpeza do material	2
1.3.2. Esterilización do material	3
1.3.2.1.Preparación do material para a esterilización	3
1.4. Medios de cultivo	5
1.4.1. Tipos de medios de cultivo	5
2. Microscopía	6
2.1. Observación microscópica	6
2.2. Observación en vivo-fresco	7
2.3. Tinturas	8
2.3.1. Tintura simple	9
2.3.2. Tintura negativa	10
2.3.3. Tintura de gram	10
2.3.4. Tintura de esporas	12
2.3.5. Tintura de Ziehl-Neelsen	13
3. Cultivo de microorganismos	14
3.1. Turbidimetría: curva de crecemento	14
3.1.1. Realización dunha curva de crecemento	16
3.2. Métodos de inoculación	17
3.3. Técnicas de illamento	17
3.3.1. Dilucións sucesivas	17
3.3.2. Sementeira por esgotamento	18
3.4. Métodos de enumeración	22
3.4.1. Reconto en placa	22
3.4.2. Número mais probable (NMP)	23
4. Relación microorganismos-alimentos	24
4.1. Calidade microbiolóxica dos alimentos	24
4.2. Microorganismos marcadores: Índices e indicadores	24

4.2.1.	Coliformes, coliformes fecais e <i>E. coli</i>	25
4.2.2.	Enterobacterias totais.....	25
4.2.3.	Enterococos	26
4.2.4.	Coltridium sulfito-reductores	26
4.2.5.	Aerobios mesófilos.....	26
4.2.6.	Mofos e leveduras.....	27
4.2.7.	Microorganismos anaerobios	27
4.2.8.	Microorganismos psicrófilos.....	27
4.2.9.	Estafilococos.....	28
4.2.10.	<i>Streptococcus (Mitis-salivarius)</i>	28
5.	Investigación de microorganismos marcadores	28
5.1.	Microbioloxía da auga	28
5.1.1.	Aspectos lexislativos	28
5.1.2.	Filtración sobre membrana	29
5.1.3.	Reconto directo de colonias en medio sólido	30
5.1.4.	Método de reconto indirecto por cálculo estatístico trala distribución do inoculo en medio de cultivo líquido. Técnica do NMP	31
5.2.	Microbioloxía dos alimentos	31
5.2.1.	Determinación da calidade microbiolóxica do leite	31
5.2.2.	Detección e reconto de enterobacterias,enterococos e microorganismos mesófilos en queixos	33
5.2.3.	Investigación de <i>Salmonella</i> en ovo	35
5.2.4.	Investigación de <i>Staphylococcus aureus</i> en crema pasteleira.....	36
5.2.5.	Investigación de <i>Staphylococcus</i> e <i>Streptococcus</i> en superficies e utensilios de traballo da industria alimentaria	36
5.2.6.	Análise de manipuladores	37
5.2.7.	Análise do aire.....	37
5.2.8.	Investigación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
5.2.9.	Reconto de mofos filamentosos e leveduras en alimentos.....	38
6.	Técnicas de exame	39
6.1.	Probas bioquímicas.....	39
6.1.1.	Proba da Catalasa.....	39
6.1.2.	Proba da Citocromooxidasa.....	39
6.1.3.	Pobra do Indol	40
6.1.4.	Licuefacción da xelatinasa	40

6.1.5. Hidrólise do amidón.....	41
6.1.6. Producción de ureasa.....	41
6.1.7. Utilización do citrato.....	42
6.1.8. Reacción Voges-Proskauer.....	42
6.1.9. Reacción de vermello de metilo	43
6.1.10. Fermentación de azucres	43
6.1.11. Metabolismo oxidativo/fermentativo (OF)	44
6.1.12. Hidróxido potásico (KOH)	44
6.1.13. Uso de Ágar Ferro KLIGER e Ágar Ferro Triple Azucre (TSI)	45
6.1.14. Motilidade	45
6.1.15. Proba da Bilis-Esculina	45
6.2. Métodos rápidos para o control microbiolóxico	46
6.2.1. ELISA	46
6.2.2. Medios cromoxénicos	47
6.2.3. APIS.....	47
6.2.4. Antibiogramas	49
I. Táboas número mais probable.....	52
II. Probas bioquímicas.....	1
III. Antibiograma	1

ORGANIGRAMA DO CURSO

➤ LUNS 01-07-13

HORARIO	CONTIDOS
10:00-10:15	Presentación do curso
10:15-12:00	Introdución: riscos biolóxicos, normas de seguridade, estilización, medios de cultivo, métodos de inoculación, técnicas de illamento e turbidimetrías
12:00-14:00	Técnicas de sementeira e inoculación, técnicas de illamento e realización de curva de crecemento
16:00-17:00	Microscopía: observación microscópica, morfoloxía das colonias, tipo de tinturas
17:00-19:00	Observación en vivo ou fresco, tinturas: simple, negativa e tintura de gram, probas bioquímicas: hidrólise do almidón, utilización de citrato, reacción vermello de metilo, fermentación de azúcares, metabolismo O/F e medición da curva de crecemento.

➤ MARTES 02-07-13

HORARIO	CONTIDOS
10:00-12:30	Relación microorganismo-alimentos: calidade microbiolóxica dos alimentos, microorganismos marcadores: índices e indicadores, determinación de microorganismos marcadores
12:30-14:00	Técnicas de análise: métodos rápidos para o control microbiolóxico
16:00-19:00	<u>Probas bioquímicas</u> : proba do indol, liquefacción da xelatinasa, produción de ureasa, reacción Voges-Proskauer, proba do TSI, motilidade, metabolismo O/F. Medición da curva de crecemento. <u>Análise microbiolóxico de auga</u> : filtración sobre membrana, sementeira en medios específicos, NMP e colimetría.

➤ MÉRCORES 03-07-13

HORARIO	CONTIDOS
10:00-12:30	Detección e reconto de enterobacterias, enterococos e microorganismos mesófilos en queixos, investigación de <i>Salmonella</i> en ovo, e investigación de <i>Staphylococcus aureus</i> en crema pasteleira, determinación de <i>Listeria monocytogenes</i> en produtos cárnicos. Tintura de esporas, Ziehl-Neelsen.
12:30-14:00	Métodos de enumeración: reconto de placas e NMP
16:00-17:00	Probas bioquímicas: proba da catalasa, proba da citocromo oxidasa, proba da Bilis-Esculina e metabolismo O/F . Medición da curva de crecemento.
17:00-19:00	Lectura e interpretación de resultados

ENSAIOS MICROBIOLÓXICOS NA INDUSTRIA ALIMENTARIA

➤ XOVES 04-07-13

HORARIO	CONTIDOS
10:00-11:00	Análise de manipuladores, Análise do aire, Investigación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Reconto de mofos filamentosos e levaduras en alimentos
11:00-14:00	Métodos específicos de detección de microorganismos: Antibiogramas, APIS, ELISA, medios cromoxénicos,
14:00-15:00	Lectura e interpretación de resultados

➤ VENRES 05-07-13

HORARIO	CONTIDOS
10:00-11:30	APIS
11:30-12:30	Lectura e interpretación de resultados: análise microbiolóxico de alimentos. Elaboración da curva de crecemento.
12:30-13:00	Clausura do curso

ENSAIOS MICROBIOLÓXICOS NA INDUSTRIA ALIMENTARIA

	LUNS 01/07/13	MARTES 02/07/13	MÉRCORES 03/07/13	XOVES 04/05/13	VENRES 05/05/13
10:00-11:00	<ul style="list-style-type: none"> ▶ PRESENTACIÓN DO CURSO ▶ INTRODUCCIÓN 			<ul style="list-style-type: none"> ▶ ANÁLISE MICROBIOLÓXICO DE ALIMENTOS: DETECCIÓN DE M.O MARCADORES 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ MÉTODOS ESPECÍFICOS IDENTIFICACIÓN DE M.O
11:00-12:00	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CULTIVO DE MICROORGANISMOS ▶ TÉCNICAS DE SEMENTEIRA ▶ REALIZACIÓN CURVA DE CRECEMENTO 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CALIDADE MICROBIOLÓXICA DOS ALIMENTOS ▶ M.O MARCADORES: INDICE E INDICADORES 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ ANÁLISE MICROBIOLÓXICO DE ALIMENTOS: DETECCIÓN DE M.O MARCADORES ▶ TÉCNICAS DE TINCIÓN 		<ul style="list-style-type: none"> ▶ LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
12:00-13:00				<ul style="list-style-type: none"> ▶ MÉTODOS ESPECÍFICOS IDENTIFICACIÓN DE M.O 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CLAUSURA DO CURSO
13:00-14:00		<ul style="list-style-type: none"> ▶ MÉTODOS RÁPIDOS PARA O CONTROL MICROBIOLÓXICO 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ MÉTODOS DE ENUMERACIÓN <ul style="list-style-type: none"> ○ RECONTO EN PLACA ○ NMP 		
14:00-15:00				<ul style="list-style-type: none"> ▶ LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 	
16:00-17:00	<ul style="list-style-type: none"> ▶ MICROSCOPIA 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ PROBAS BIOQUÍMICAS ▶ ANÁLISE MICROBIOLÓXICO DE AUGAS 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ PROBAS BIOQUÍMICAS 		
17:00-18:00	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CURVA DE CRECEMENTO ▶ TÉCNICAS DE TINCIÓN ▶ PROBAS BIOQUÍMICAS 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ CURVA DE CRECEMENTO 	<ul style="list-style-type: none"> ▶ LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS 		
18:00-19:00					

1. Introducción

1.1. Riscos biolóxicos

O laboratorio de Microbioloxía é o lugar destinado ó manexo e estudo dos microorganismos. Ademais de estar exposto a tódolos riscos asociados a calquera ambiente de laboratorio contén un perigo intrínseco debido a manipulación de microorganismos, moitos dos cales son potencialmente perigosos.

Polo tanto, para comezar un traballo no laboratorio débense posuír tanto a información necesaria sobre a conduta que hai que seguir coma os métodos que hai que empregar fronte a situacións que presentan risco.

Debemos coñecer os riscos potenciais dos microorganismos e os métodos de contención para que non cheguen a acceder ás vías polas que poidan penetrar no noso organismo.

Tabla 1: Sistema de Grupo de Risco da OMS

Grupo de Risco I (baixo risco individual e comunitario)	É improbable que se produza unha enfermidade humana ou animal de importancia médica
Grupo de Risco II (risco individual moderado, risco comunitario baixo)	Un patóxeno que pode causar enfermidades, pero que é improbable que sexa un risco grave.
Grupo de Risco III (risco individual alto, risco comunitario baixo)	Un patóxeno que produce enfermidades humanas graves, pero que non se difunde de ordinario dun individuo infectado a outro.
Grupo de Risco IV (elevado risco individual e comunitario)	Un patóxeno que produce xeralmente enfermidades humanas graves e poden transmitirse facilmente dun individuo infectado a outro, directa ou indirectamente.

Os laboratorios de microbioloxía presentan moitos perigos para as persoas desprevidas ou inexpertas, polo que é necesario ter en conta algunhas normas que nos poden axudar á hora de abordar calquera traballo ou experimento e durante o seu desenvolvemento.

1.2. Normas de seguridade no laboratorio

- ✓ Cada persoa ten un lugar fixo dentro de laboratorio, e debe mantelo limpo e ordenado en todo momento. É fundamental que a hixiene de traballo sexa

perfecta en todo momento, tanto para evitar a contaminación do material que estamos utilizando, como de nós mesmos.

- ✓ É obrigatorio o emprego de unha bata branca, que ha de estar sempre limpa e en ningún caso debe de utilizarse fóra do laboratorio.
- ✓ Ó final do día, cada persoa debe deixar limpo e recollido tanto o material utilizado como a zona de traballo. Todo o material de vidro sucio ou con medios, debe ser esterilizado e despois lavado. Os medios sólidos necesitan un trato especial.
- ✓ Débese traballar nas proximidades dun chisqueiro, **PERO SIN QUEIMA-LO PELO!**
- ✓ Os medios inoculados deben colocarse nas cámaras de cultivo coa súa identificación respectiva, número de mesa, nome, natureza do espécime o sustrato do cal se ailla, etc.
- ✓ As pipetas colleranse de forma que sexa o dedo índice o que tape o extremo superior para regular a caída de líquido.
- ✓ As cubetas para o espectrofotómetro, e os cubreobxetos e portaobxetos deben collerse polos bordes para evitar que se engraxen.
- ✓ Os tubos de ensaio que conteñan medios de cultivos ou cultivos de microorganismos, nunca deben abrirse en posición vertical, senón o mais horizontalmente posible (inclinados) e para retirar o tapón manteranse inclinados cunha man e abranse coa outra, que suxeitará a súa vez a asa de platino. Unha vez aberto, flaméxase por algúns segundos o orificio, repetindo dita operación unha vez realizada a sementeira (o tapón nunca debe deixarse sobre a mesa).
- ✓ Antes de utilizar as asas con fíos de platino deben flamexarse a roxo vivo en posición vertical baixo a acción da chama durante 40-45 segundos; tamén debe flamexarse o mango. Antes de efectuar a sementeira deben esperarse algúns segundos a que se arrefríen, podendo arrefrialas tamén no borde da placa de petri que contén o medio de cultivo. Inmediatamente despois de utiliza-las, deben ser flamexadas novamente.
- ✓ Os microorganismos deben manexarse sempre en condicións de esterilidade, arredor da chama, evitando no posible desprazalos, xa que correntes de aire ou movementos descoidados poden provocar contaminacións.

1.3. Preparación do materia

1.3.1. Limpeza do material

Un dos fundamentos do traballo do laboratorio microbiolóxico é a limpeza. Todo o material de vidro que se vai a utilizar no laboratorio ó longo de todo o traballo debe lavarse ben para evitar toda clase de contaminación orgánica e inorgánica. Ademais debe esterilizarse, evitando deixar restos que poidan prexudicial a súa posterior utilización.

No laboratorio, ademais da limpeza do material funxible, é indispensable manter en perfecto estado tódolos aparellos e equipos que se utilizan durante as prácticas, para iso é necesario, unha vez por semana, limpar e desinfectar as estufas, fornos, neveiras, baños, autoclaves, arcas, etc. Andeis e mesas de traballo e, en xeral, tódalas superficies horizontais deben desinfectarse antes e despois do traballo. Ademais, unha vez á semana, deben limparse a fondo, primeiro con auga e xabón e, posteriormente, cunha solución desinfectante.

1.3.2. Esterilización do material

1.3.2.1. Preparación do material para a esterilización

A preparación do material para esterilizar é un dos traballos máis importantes nun laboratorio de microbioloxía. Calquera traza de contaminación que poida aparecer despois da limpeza debe ser suprimida mediante este proceso.

Cada material debe prepararse dunha maneira determinada, para garantir que, despois do proceso de esterilización, siga conservando a esterilidade.

a) *Tubos de ensaio, matraces, vasos de precipitados, frascos, probetas*

Estes deben pecharse cun tapón de algodón hidrófobo ou tapóns especiais, para que, tralo proceso de esterilización, se sigan mantendo estériles.

Ás veces, para garantir aínda máis a esterilidade, pónselle un capuchón de papel de aluminio ou de plástico resistente, ou tapón metálicos xa deseñado para tal fin.

b) *Placas de petri*

Xeralmente utilízanse placas desbotables que veñen en bolsas estériles que permiten usalas directamente. Unha vez usadas, recóllense en bolsas de plástico axeitadas para a esterilización, que unha vez finalizado o tratamento se tiran.

c) *Pipetas*

Poden esterilizarse soas ou dentro de recipientes de vidro ou de metal, cun pouco de algodón no fondo para evitar a rotura das puntas.

Para maior seguridade, débese poñer na boquilla un anaquiño de algodón que actúe como filtro e impida a contaminación pola propia aspiración do propio operador, á vez, que actúa como protector ó evitar a chegada de líquido a boca.

1.3.2.2. Métodos de esterilización

O concepto de esterilización implica a eliminación de todas as formas vivas. Segundo a devandita definición, estéril significa libre de organismos. Outras

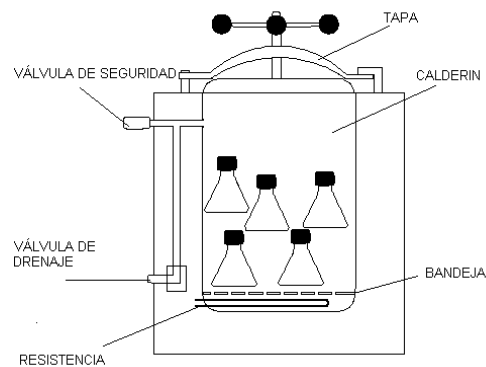
metodoloxías, como desinfección, pasteurización, etc., levan consigo unha eliminación parcial dos microorganismos existentes.

a) Métodos de esterilización:

➤ Axentes físicos

a) Calor

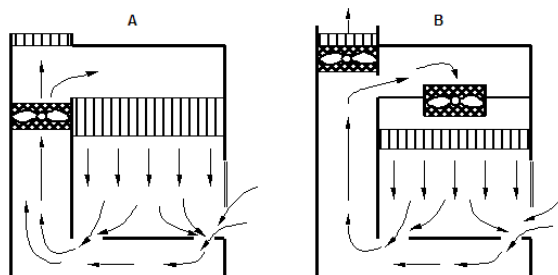
- Calor seca: flamexado, aire quente (forno Pasteur)
- Calor húmido: vapor saturado (AUTOCLAVE). No autoclave a esterilización prodúcese mediante vapor de auga a presión. Acádase unha temperatura de 121°C a unha presión de 1 atmosfera sobre a presión ambiental.



b) Filtración: permite a eliminación dos microorganismos dun medio líquido, sen a destrución destes. Para iso faise pasar a mostra líquida a través dun filtro de membrana con tamaño de poro inferior ó tamaño dos microorganismos (0,2-0,45 micróns). Os microorganismos quedarán retidos no filtro e o fluído obtido tras a filtración estará estéril.

c) Radiacións:

- Raios gamma -. Radiacións ionizantes
- Raios Ultravioleta – de escasa penetración e de utilidade para eliminación de microorganismos de superficies. Como a que se emprega nas cámaras de fluxo laminar



- Axentes químicos: para esterilizar material (xeralmente algúns tipos de plástico) que son termolábiles. Como o óxido de etileno e o glutaldehído.

1.4. Medios de cultivo

Como os demais seres vivos, as bacterias precisan unha serie de nutrientes para poder desenvolverse. No laboratorio, o crecemento conséguese cos chamados “medios de cultivo”.

O desenvolvemento dos medio de cultivo está baseado no estudio do metabolismo e as necesidades nutritivas das bacterias. Existen por tanto numerosos medios de cultivo que poden modificarse en cada caso, segundo a esixencias dos microorganismos estudados.

Un medio que cumpre as esixencias nutritivas das bacterias deberá ter recursos de carbono, nitróxeno, sales inorgánicas, vitaminas e outros compostos. A peptona e o extracto de carne son as sustancias básicas que debe posuír un medio de cultivo, xa que os requirimento de nitróxeno e carbono quedan satisfeitos. O extracto de levadura engadido a un medio de cultivo proporciona varias vitaminas do grupo B, nitróxeno orgánico e compostos de carbono que favorecen o crecemento bacteriano.

A diferenza básica, desde o punto de vista do estado físico, entre os medios de cultivo, é que uns son sólidos (ou semisólidos) e outro son líquidos. A sustancia encargada de solificar os medios de cultivo é o **Ágar**, que é un hidrato de carbono complexo, obtido de algas mariñas (*Gelidium*) e que non constitúe unha fonte de nutrientes para as bacterias, cun punto de fusión entre os 65° e os 90° C, pero que non volve solidificarse ata os 38-40 °C, o que permite o seu emprego para o estudio de bacterias, incluso as termófilas.

Hai que ter en conta, que a condición indispensable que deben cumprir os medios de cultivo é que deben ser estériles.

1.4.1. Tipos de medios de cultivo

- Medios xerais:** son os mais utilizados para o crecemento dos microorganismos con vistas ó seu illamento, mantemento de cepas, antibiogramas, etc. Son medios nutritivos ricos en sales inorgánicas e oligoelementos, que presentan diversas fontes de carbono.
- Medios enriquecidos:** son aqueles medios nos que, á fórmulas normais de medios xerais, se lles engaden certas sustancias como sangue, soro, extracto de tecidos vexetais ou animais, que suministran elementos nutritivos complementarios.
- Medios selectivos:** son aqueles medios xerais ou enriquecidos, ós que se engaden certos produtos capaces de inhibir o crecemento dalgunhas especies.

- d) **Medios diferenciais:** a adición de algúns reactivos ou produtos químicos polo que pode ocasionar modificacións no crecemento, o que permite diferenciar uns tipos de bacterias doutros. Por exemplo: ágar sangue.
- e) **Medios de caracterización:** algúns dos compoñentes destes medios empréganse nos procesos metabólicos bacterianos. Por exemplo: medio Kligler, citrato, indol, etc.

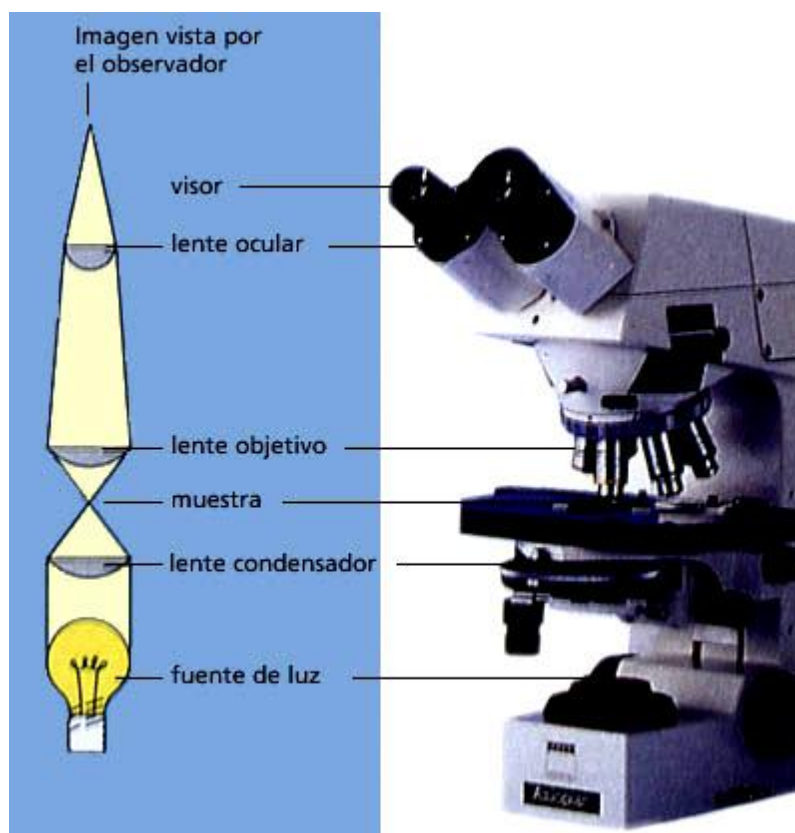
2. Microscopía

2.1. Observación microscópica

O microscopio é un dos instrumentos máis necesarios para un microbiólogo, xa que permite a observación de organismos que non poden ser apreciados en detalle a simple vista, é dicir, os microorganismos. Existe unha gran variedade de microscopios que, segundo a fonte de iluminación utilizada, agrúpanse en:

- Microscopios ópticos: A fonte de iluminación é a luz.
 - De campo claro. Permiten a observación de preparacións, na súa cor natural ou contrastadas mediante tinguiduras, resaltadas sobre un fondo máis brillante.
 - De campo escuro. Permiten a observación de formas celulares que destacan brillantes sobre un fondo escuro.
 - De contraste de fases. Grazas á utilización de diafragmas e obxectivos especiais, que permiten a observación de células vivas, xa que non é necesario realizar ningunha tinguidura destas.
 - De interferencia. Permiten observar células vivas sen tinguir, obténdose unha imaxe en relevo destas.
 - De fluorescencia. A fonte de iluminación proporciona luz ultravioleta que excita certas moléculas presentes nas células (ben de forma natural ou engadidas á preparación) que emiten fluorescencia no espectro visible.
- Microscopios electrónicos: A fonte de iluminación é un chorro de electróns e as lentes son electroimáns.
 - De transmisión. Permiten a observación de mostras tinguidas con substancias que son resistentes ao paso de electróns e cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos. Conséguese entre 10.000 e 100.000 aumentos.
 - De varrido. Permiten a observación de células enteiras, sen necesidade de cortes finos, de modo que aparecen os relevos orixinais e as superficies externas. Alcanzan entre 1.000 e 10.000 aumentos.

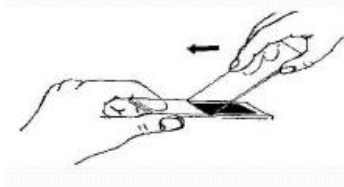
Durante as prácticas empregárase o microscopio óptico de campo claro, formado polos compoñentes fundamentais (mecánicos, de iluminación e ópticos) que se mostran na figura seguinte figura.



Para aumentar o límite de resolución, normalmente utilízase aceite de inmersión. É importante recordar que non todos os obxectivos son impermeables ó aceite. Nos microscopios que se utilizarán nas prácticas, só pode utilizarse o aceite de inmersión co obxectivo de 100 aumentos!!!

2.2. Observación en vivo-fresco

- A partir de cultivos en medio líquido: cargar a asa de platino cunha gota de cultivo no medio líquido, depositala no portaobxectos e cubrir cun cobreobxectos (procurando que non queden burbullas de aire).



- A partir de cultivos en medio sólido: colocar unha gota de auga destilada estéril sobre o portaobxectos con axuda da asa de platino. Cargar a asa (estéril) cunha pequena cantidade de bacterias dunha colonia e resuspendelas na gota de auga.
- Observar bacterias vivas ó microscopio co obxectivo de inmersión (cunha gota de aceite de inmersión), observar motilidade, etc.



Observaches mobilidade? _____

2.3. Tinturas

Son técnicas que permiten observar microorganismos en función da capacidade destes para reter (ou non) determinadas substancias colorantes, o que depende do tipo de célula e do colorante.

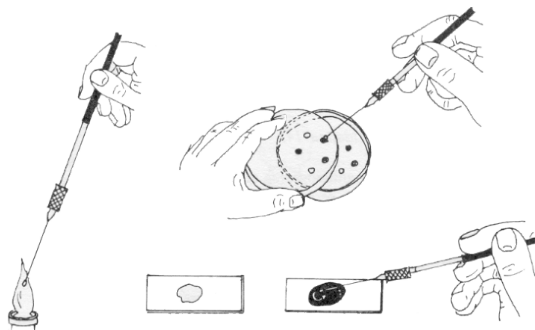
Pódense distinguir varios tipos de tinturas, aínda que nos pasos previos son comúns a todas elas e son os que se indican a continuación.

Pasos previos para unha tintura.

1. *Extensión:* realízase depositando unha gota do material que se vai a examinar no centro dun porta obxectos ben limpo e desengraxado. Se este é de medio sólido, colócase primeiro unha gota de solución salina ou auga destilada estéril no porta na que se dilúe o material.

Coa asa de platino esténdese ata formar unha capa delgada e uniforme, procurando non chegar ós extremos ou bordos do portaobxectos.

É moi importante lembrar que a suspensión debe ser moi diluída, de xeito que só unha débil turbidez sexa visible.



2. *Secado:* a extensión anterior pódese deixar secar espontaneamente ou pasala pola chama uns segundos (a 30-40 cm da mesma).
3. *Fixación:* xeralmente realízase por calor. Neste punto conseguimos adherir os microorganismos ó portaobxectos e que non sexan arrastrados pola auga de lavado ou colorantes na tintura. Conséguese pasando tres veces sobre a chama, coidando que a preparación quede cara arriba. Cando o portaobxectos este o suficientemente quente como para non poder sostelo coa man, a fixación está completa.

2.3.1. Tintura simple

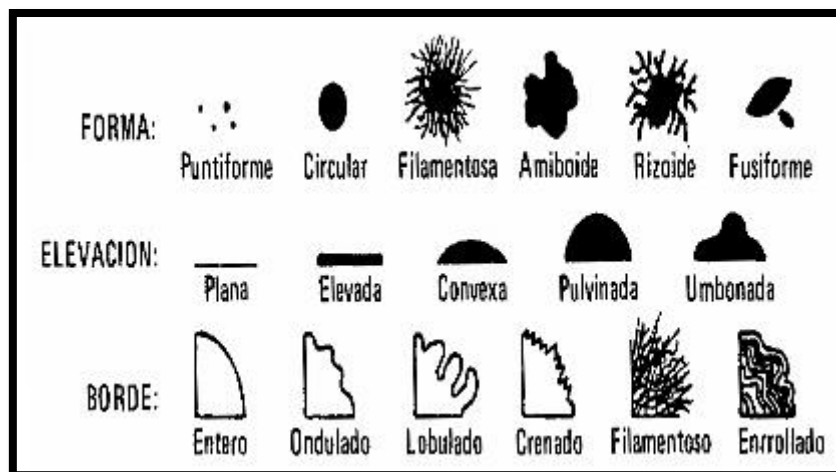
O obxectivo desta técnica é ver o microorganismo enteiro para poder observar a súa morfoloxía e as posibles agrupacións que forman. A unha extensión xa fixada engádeselle un colorante simple, que é unha disolución acuosa ou alcohólica dun colorante básico.

- **Procedemento**

1. Tomamos con coidado unha colonia da placa de medio que xa temos crecida.
2. Extensión.
3. Secado e fixación.
4. Cubrimos con **safranina** durante dous minutos.
5. Escórrese o colorante e lávase o portaobxectos con auga.
6. Déixase secar ó aire.
7. Observación ó microscopio.



Realizaremos varias tincions a partir de microorganismos diferentes observando a súa morfoloxía. Que tipos de morfoloxía observaches?



2.3.2. Tintura negativa

As células que non se tinguen poden visualizarse nun campo escuro. O colorante utilizado é a **nigrosina** ou tinta chinesa, que como ten carga negativa, o mesmo que as células, non as vai tinxir, aparecendo as células nun campo escuro.

- **Procedemento**

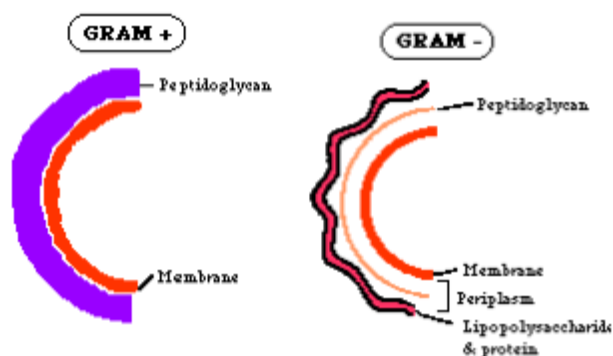
1. Tomamos con coidado unha colonia da placa de medio que temos xa crecida.
2. Extensión.
3. Secado e fixación.
4. Cubrimos con **nigrosina** durante dous minutos.
5. Escórrrese o colorante e lávase o portaobxectos con auga
6. Déixase secar o aire
7. Observación ó microscopio



Observaches algunha célula? Cal é a súa morfoloxía?

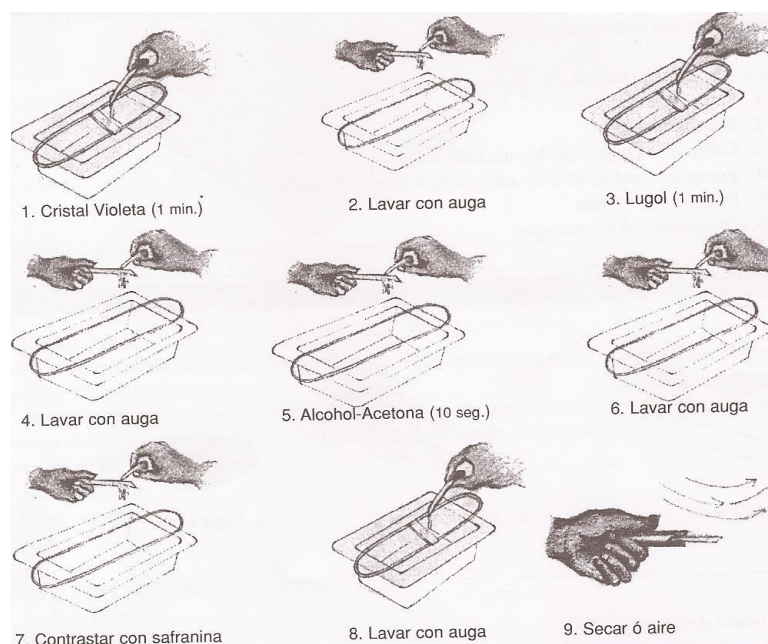
2.3.3. Tintura de gram

É o método de tintura máis empregado en bacterioloxía. Coñécense moitas variantes, aínda que o principio do método empregado é común para todas, é dicir, que as bacterias Gram positivas reteñen o colorante e mostran unha color violeta, mentres que as Gram negativas decoloranse e toman a color do colorante de contraste (vermello).



• **Procedemento**

1. Extensión a partir dun cultivo líquido en fase estacionaria
2. Secado e fixación.
3. Cubrimos coa solución de **crystal violeta** durante tres minutos.
4. Escórrese o colorante e lávase o portaobxectos con auga.
5. Cubrimos con **Lugol** durante un minuto.
6. Lávase con alcohol ata que este saia incoloro.
7. Lávase con auga e déixase cuberto o portaobxectos cunha capa de auga.
8. Engádense unhas gotas de fucsina durante un minuto.
9. Lávase con auga e sécase ó aire.
10. Observación ó microscopio.



Ponse unha gota de aceite de inmersión e obsérvase co obxectivo correspondente, tomando nota da forma e o tipo de coloración dos

microorganismos Gram positivos e Gram negativos, aínda que poden aparecer Gram variables



Cántos microorganismos Gram – e Gram + observaches? Había algunha Gram variable? Que morfoloxías observaches?

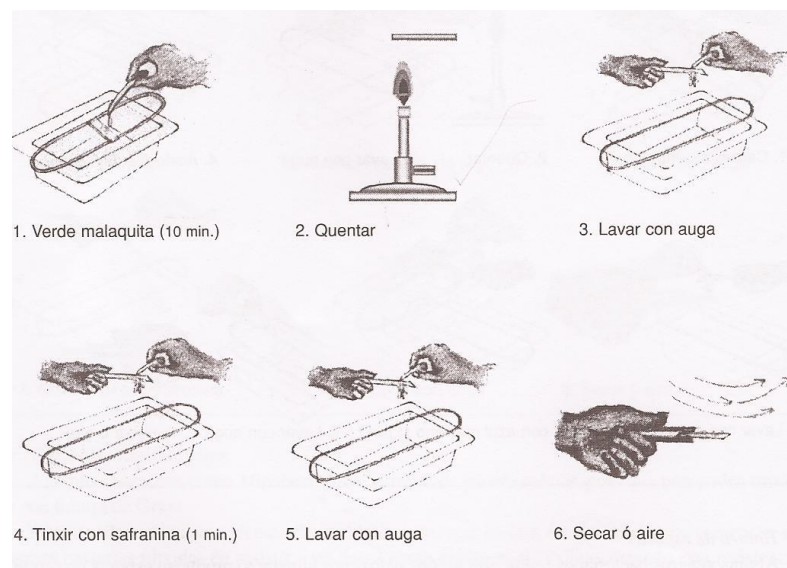
2.3.4. Tintura de esporas

Algúns xéneros bacterianos (entre algúns patóxenos humanos) producen esporas no seu interior. Estas esporas son estruturas de resistencia formadas pola célula bacteriana.

Estes microorganismos, como os do xénero *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporolactobacillus*, *Sporosarcina* ou *Desulfotomaculum*, cando as condicións ambientais non lles son favorables (temperatura extrema, presenza de compostos tóxicos, escaseza de nutrientes, etc.), forman esporas no seu interior (endosporas), podendo permanecer viables durante anos. Estas esporas posúen cubertas exclusivas que as fan resistentes a estas condicións adversas.

- **Procedemento**

1. Extensión a partir dun cultivo en fase estacionaria, onde as bacterias están producindo esporas.
2. Secado e fixación.
3. Cubrimos coa solución de **verde malaquita** durante dez minutos.
4. Durante eses dez minutos, quéntase o portaobxectos á chama ata que comece a saír vapores da preparación. Debemos evitar que o colorante se seque, para iso podemos cubri-lo cunha tira de papel de filtro, engadindo máis cantidade de colorante se é necesario.
5. Despois dos 10 minutos, lávase o colorante con abundante auga.
6. Tinción con **safranina** durante 1 minuto.
7. Lávase con abundante auga.
8. Sécase ó aire ou con calor suave.
9. Observación ó microscopio.



As endosporas coloréanse de verde e as formas vexetativas de vermello.



Observaches algunha endospora? E algunha forma vexetativa?

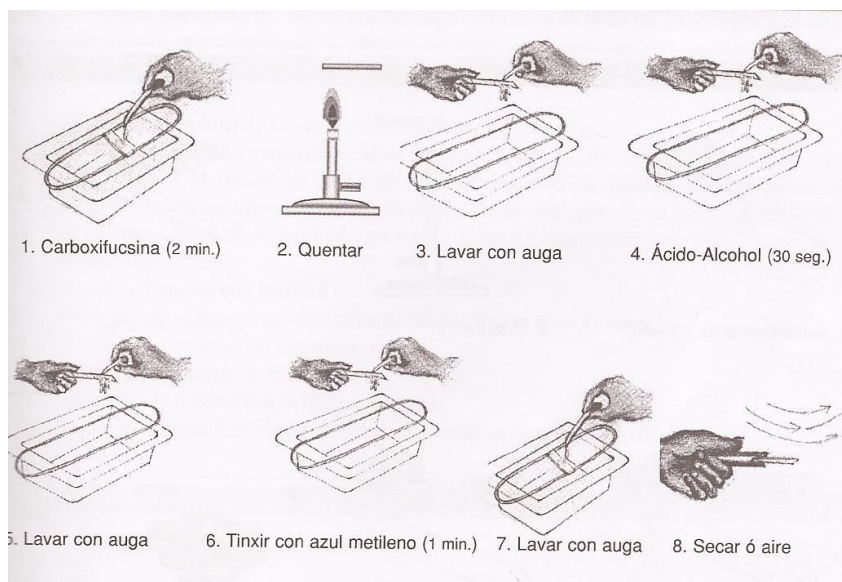
2.3.5. Tintura de Ziehl-Neelsen

Algunhas bacterias como *Micobacterium*, carecen de parede celular, polo que non poden tinguirse coa tintura de Gram.

Para tinguilas utilízase a técnica de Ziehl-Neelsen, que mostra a capacidade que presentan algunhas bacterias tinxidas de resistir un decolorante ácido ou alcohólico, estando esta resistencia directamente relacionada coa presenza dunha alta porcentaxe de lípidos que confiren un ambiente hidrófobo sen envoltura celular.

- **Procedemento**
 1. Tomamos con coidado unha colonia da placa de medio que temos xa crecida.
 2. Extensión.
 3. Secado e fixación.
 4. Cubrimos coa solución de **carboxifucsina** durante dous minutos.
 5. Quéntase o portaobxectos á chama durante 5 minutos, sen retiralo colorante, repoñendo este a medida que se evapora.
 6. Lávase o portaobxectos con abundante auga.

7. Decolórase a extensión coa solución ácido-alcohol durante 30 segundos, ata que a preparación tome unha tonalidade rosada.
8. Cubrimos coa solución **azul de metileno** durante 1 minuto.
9. Lávase o portaobxectos con abundante auga para retirar o exceso de colorante.
10. Sécase ó aire.
11. Observación ó microscopio.



As bacterias ácido alcohol resistentes reteñen a carboxifucsina, resistindo a decoloración, polo que se verán ó microscopio tinxidas de rosa, ó contrario das demais bacterias, que se decoloraran e reterán o azul d metileno.



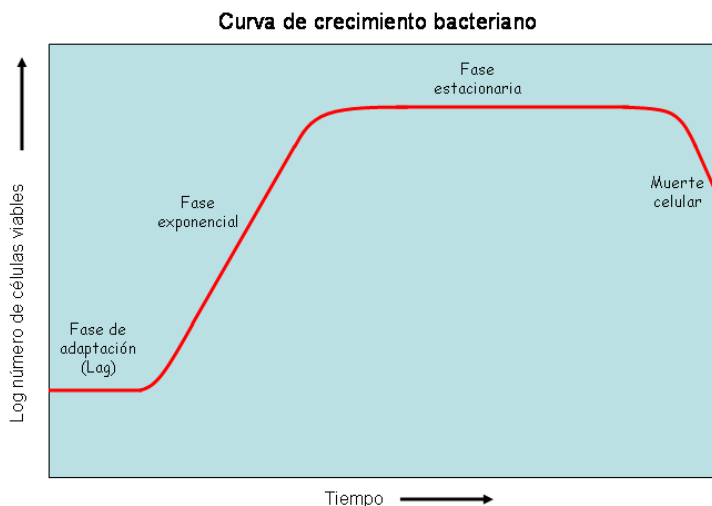
Observaches algunha bacteria de cor rosa?

3. Cultivo de microorganismos

3.1. Turbidimetría: curva de crecemento

A turbidimetría mide a cantidade de luz transmitida a través das suspensións bacterianas. Mediante esta técnica pódese saber o número de bacterias presentes nun cultivo bacteriano, posto que, dentro dun intervalo, a luz absorbida por unha suspensión bacteriana é directamente proporcional ó número de células do cultivo.

A luz transmitida mídese mediante o espectrofotómetro, onde a luz absorbida (absorbancia) é directamente proporcional ó número de bacterias presentes na suspensión. Se medimos a absorbancia dun cultivo a distintos intervalos de tempo, a curva que relaciona estes parámetros representa o crecemento da poboación nas súas catro fases.



I. Fase de latencia ou adaptación

É un período de axuste necesario para o reabastecemento do “pool” celular de metabolito primarios.

As bacterias estanse adaptando ás características do novo medio de cultivo, sintetizando, por exemplo, os enzimas que necesitan para o desenvolvemento do seu metabolismo, polo que non hai divisións celulares e o número de células mantense constante.

II. Fase de crecemento exponencial

Comeza tralo período de latencia e caracterízase pola actividade máxima que alcanzan as divisións celulares. Durante este último estado a masa e o volume das células aumenta polo mesmo factor.

Nesta fase, o número de bacterias crece rapidamente, e dito crecemento non se detén ata que aparece algún factor limitante como os cambios na temperatura ou o pH, a excesiva produción de metabolitos secundarios, ou ben pola falta dalgún nutriente necesario no medio.

III. Fase estacionaria

A acumulación de produtos de refugallo, o esgotamento de nutrientes ou a variación nos outros parámetros, exerce un efecto moi nocivo ou limitador sobre o cultivo, producindo un estancamento no número de individuos.

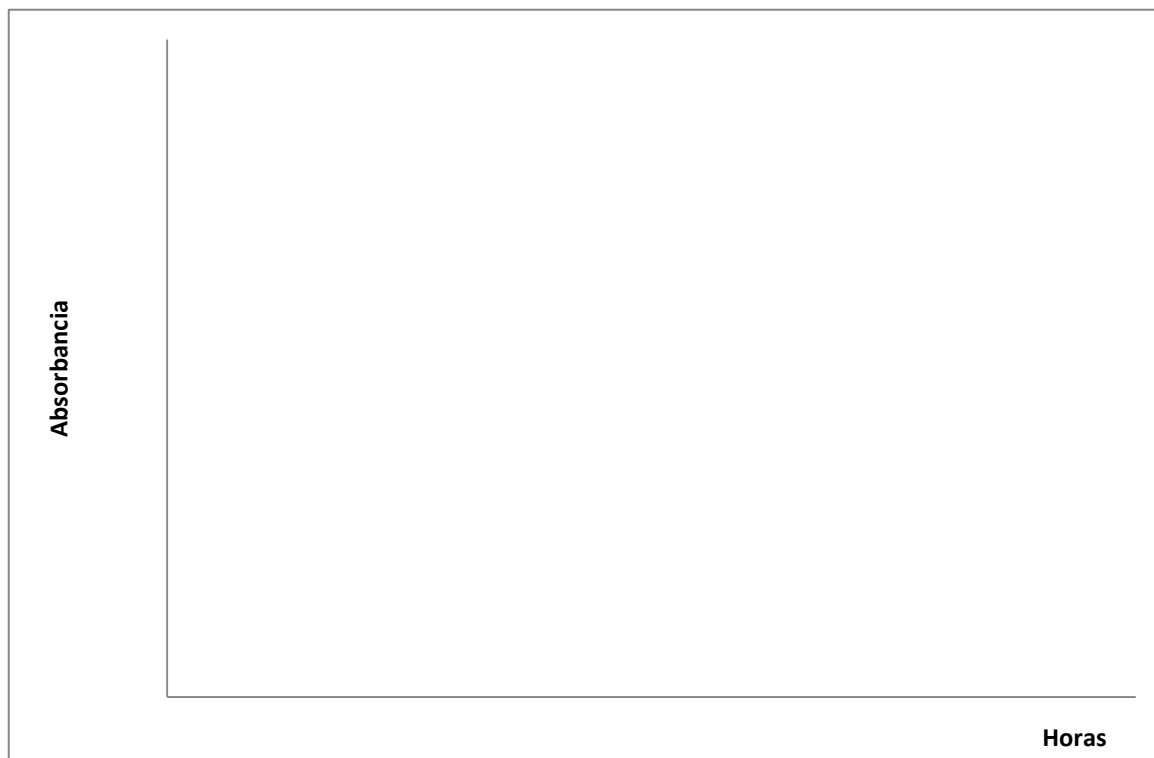
IV. Fase de morte ou de declinación

Durante esta fase, o número de células viables mantense constante, sen embargo, ó cabo de pouco tempo, ó número de células viables da poboación comeza a diminuír por lise celular dando lugar a fase de morte

3.1.1. Realización dunha curva de crecemento

1. Colocar un inóculo de bacterias procedentes dun cultivo fresco en medio sólido nun tubo con 5 mL de solución salina tamponada estéril e axitar ata obter unha turbidez visible
2. Transferir cunha micropipeta 0.5 mL da suspensión bacteriana a un matraz con 50 mL de caldo nutritivo estéril.
3. Incubar o matraz a unha temperatura de 37°C con axitación continua a 200r.p.m pra facilitar o crecemento das bacterias
4. Axustar o espectrofotómetro a 100% de transmitancia cun tubo sen inocular de caldo nutritivo estéril (autozero) e logo a 0 de absorbancia a 610 nm (branco). A continuación realizarase a mediada a esta lonxitude de onda da absorbancia do cultivo do matraz.
5. Realizarase a mesma operación a diferentes períodos de tempo
6. Debuxar unha curva de crecemento colocando no eixe de ordenadas (Y) os datos de absorbancia e no eixe de abcisas (X) os valores do tempo en horas

Horas	Absorbancia



3.2. Métodos de inoculación

Para todas as técnicas de inoculación deben extremarse as precaucións para evitar a contaminación. Existe unha gran variedade de técnicas que se van diferenciar principalmente en función do medio partida (sólido, líquido) e do medio sobre o que se vai a realizar a sementeira (tubo con medio líquido, placa de petri, ágar en plano inclinado)

3.3. Técnicas de illamento

O primeiro paso a seguir na identificación dun microorganismo é proceder á súa obtención en cultivo puro, pois é obvio que as reaccións de cultivos mixtos non poderán ser usadas na identificación. O illamento pode realizarse de varios xeitos.

3.3.1. Dilucións sucesivas

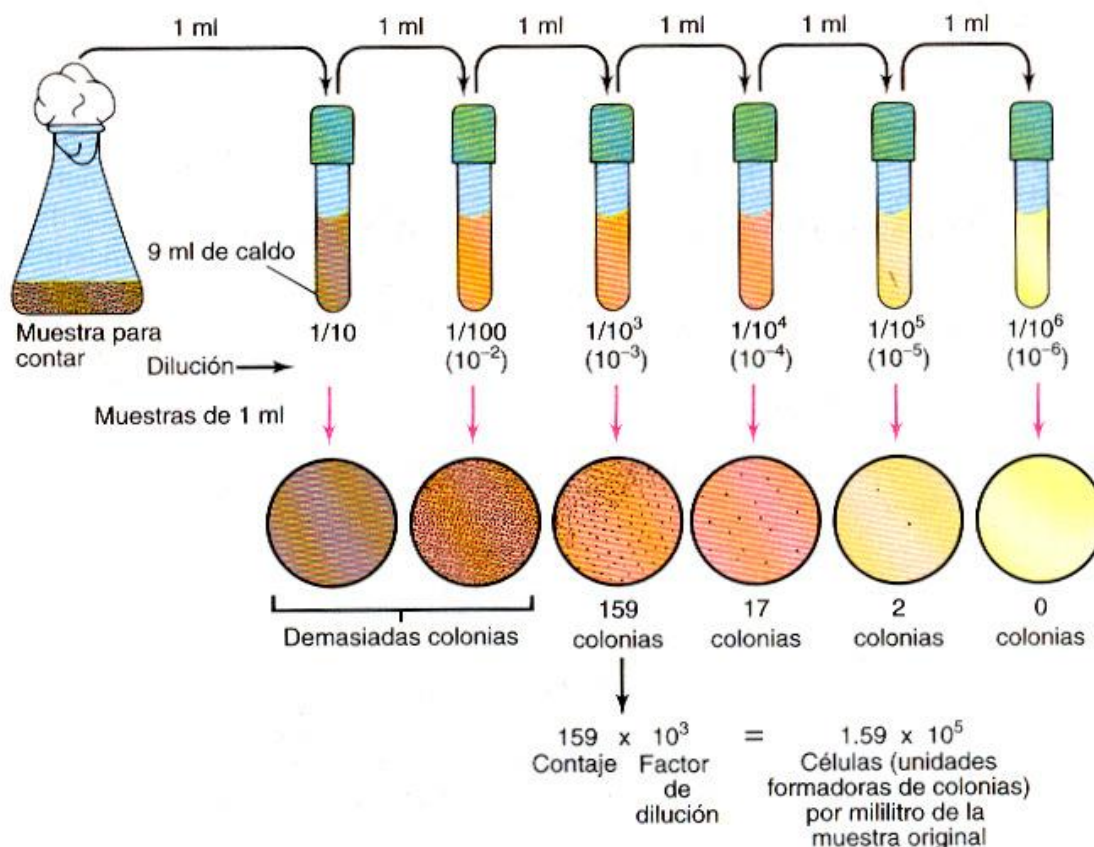
Técnica que consiste en obter unha suspensión da mestura de microorganismos e facer dilucións seriadas que se verten nunha placa de petri ata conseguir colonias illadas.

Débase traballar, como sempre, en condicións estériles, flamexando a boca dos tubos antes e despois de introducir a pipeta, nas proximidades do chama.

Mediante unha pipeta estéril, tomar unha mostra do cultivo mixto, e depositar 1 mL no primeiro tubo con 9 mL de soro fisiolóxico (ou no noso caso: 0,5 mL en 4,5 mL respectivamente) (dilución 10^{-1}).

Axitar ata conseguir unha suspensión homoxénea. Tomar outra pipeta estéril, e transferir desta primeira dilución 1mL ó seguinte tubo con 9 mL de soro fisiolóxico (10^{-2}), e así sucesivamente. A partir do tubo con dilución 10^{-2} e 10^{-4} , cunha pipeta estéril, inocular 0,1 mL en placa ágar nutritivo estendendo a mostra sobre a superficie coa asa de vidro, a cal se debe esterilizar mediante a súa introdución en alcohol e posterior flamexado, polo que se pasa a asa impregnada en alcohol polo chisqueiro e se deixa consumir o alcohol completamente.

Tras incubar poderanse obter colonias illadas. O reconto destas colonias permitirá coñecer o número de células existentes no cultivo orixinal.



3.3.2. Sementeira por esgotamento

O método máis común de obtención dun cultivo puro consiste en tomar unha soa colonia do medio de illamento e proceder á súa sementeira por esgotamento.

O esgotamento pódese realizar utilizando varias técnicas de sementeira diferente, pero todas elas teñen o común o seguinte procedemento:

1. Coller a asa de platino.
2. Flamexar a asa de platino ata que tome cor vermella.
3. Toma de mostra

a) Se partimos dunha **mostra líquida** ou cultivo líquido, debemos axitar o tubo, destapalo sen depositar o tapón na mesa, flamexar os bordos do tubo lixeiramente, introducir a asa no tubo e axitala, Volver flamexar o tubo e poñerlle o tapón

b) Se partimos dun **cultivo sólido**: flamexar a asa de platino como acabamos de ver arrefriar o extremo da asa nunha zona do medio de cultivo onde non, haxa crecemento e tomar unha colonia ben illada.

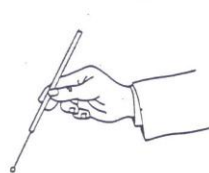


Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3

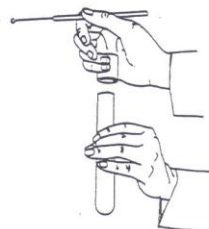


Fig. 4

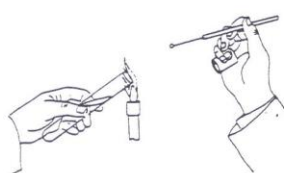


Fig. 5



Fig. 6

4. Sementeira no medio de cultivo.
 - Sementeira en **medio líquido**: Destapar o tubo sen depositar o tapón na mesa, flamexar os bordos do tubo lixeiramente, introducir o extremo da asa, previamente cargada no tubo con medio líquido e

axítase con enerxía para desprender os microorganismos, volver flamexar o tubo e poñerlle o tapón.

- Sementeira en **medio sólido**: Tomar unha placa de medio sólido non utilizada e polo tanto estéril, colocala sobre a mesa de traballo de forma invertida de tal forma que o medio de cultivo se atope na parte superior. Desta forma pódese destapar a placa cunha soa man. Unha vez destapada, apóiase o extremo da asa cargada con microorganismos sobre a superficie e efectúase a sementeira.

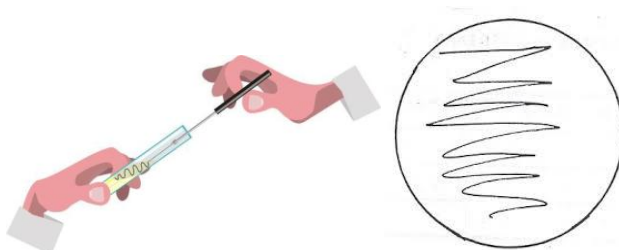
5. Flamexar a asa ata que se poña incandescente.

6. Rotular as placas ou os tubos de forma que se poidan identificar.

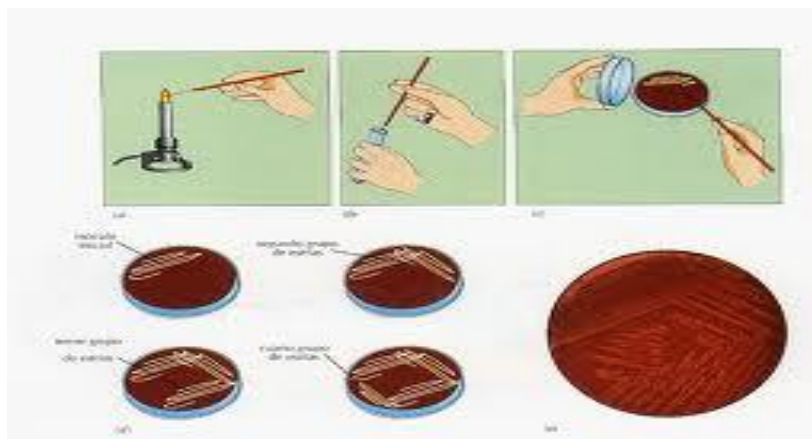
Existen como dixemos diferentes técnicas a hora de obter un illamento

- **A sementeira por esgotamento**: A finalidade desta sementeira é obter colonias illadas do microorganismo ou microorganismos sobre o medio de cultivo sólido. Consiste en desprazar a asa de platino sobre a superficie do medio sólido seguindo calquera dos seguintes procedementos:

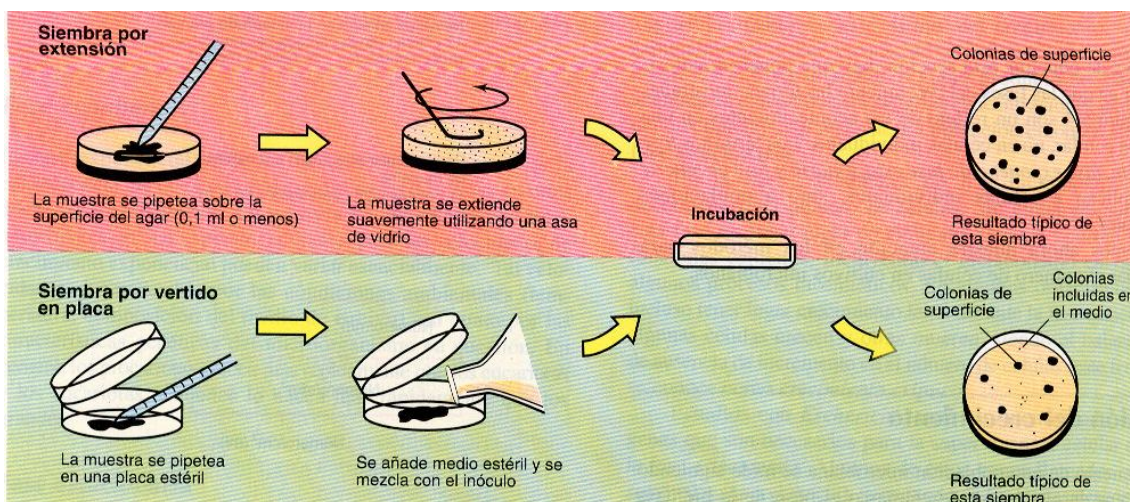
- En zig-zag: consiste en desprazar a asa polo medio facendo un movemento en forma de ceta dende un bordo da placa cara ao oposto. Cando se chega ó centro da placa, levántase a asa e repítese o movemento empezando por o outro extremo desta. Este tipo de sementeira tamén se pode facer en tubo con medio sólido en pico de frauta.



- En estrías: coa asa cargada trázanse dous ou tres liñas tanxenciais nun bordo da placa; flaméxase a asa, arrefríase nunha zona non sementada e de novo trázanse dous ou tres estrías que crucen ás anteriores; este procedemento repítese ata que se completa a superficie da placa



- Sementeira en masa: primeiro engádesse un volume coñecido de suspensión de microorganismos (1 mL) nunha placa estéril; despois engádesse 10-15 mL de medio de cultivo fundido a 45°C, mestúrase o contido da placa con movementos circulares e déixase solidificar.
- Sementeira en superficie ou céspede: sobre unha placa con medio solidificado deposítase unha cantidade medida de suspensión de microorganismos (0,1 mL) e esténdese de forma uniforme cun asa de Drigalski. Este tipo de sementeira tamén se pode realizar empregando un hisopo estéril.



- Sementeira por picadura: utilízase o filamento de platino que se introduce de forma vertical nun tubo con medio sólido



- Sementeira por inundación: sobre unha placa con medio solidificado vértese unha suspensión densa de microorganismos de forma que "se inunde" toda a

placa. Espérase uns 15 minutos para que se absorban os microorganismos e elimínase o líquido restante gardando condicións de esterilidade.



Practicar os tipos de sementeiras

3.4. Métodos de enumeración

Son xeralmente métodos que implican a multiplicación dos microorganismos presentes nos alimentos en medios de cultivo líquidos ou medios solidificados con ágar.

3.4.1. Reconto en placa

No reconto en placa permítese o crecemento dos microorganismos hasta que dan lugar a colonias discretas visibles e facilmente contabilizables. Pódese sementar en masa ou na superficie dos medios.

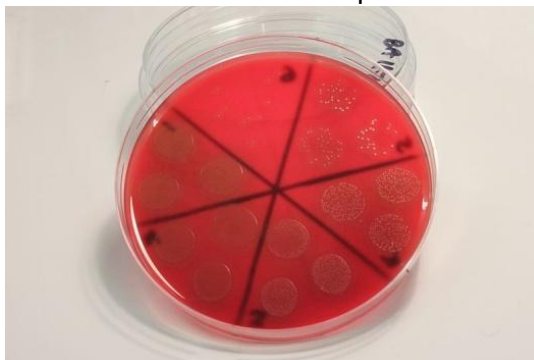
No caso dos microorganismos psicrótrofos poden sufrir un choque térmico que impida o seu crecemento, isto evítase sementando na superficie dos medios de cultivo xa sólidos.

A precisión dos métodos de reconto de colonias depende do número contado. Obtéñense resultados razoablemente precisos contando placas que conteñan entre 30 e 300 colonias.

Para obter colonias discretas normalmente é necesario facer dilucións da mostra (de factor 10) e sementar varias dilucións. As dilucións deben manter a viabilidade dos microorganismos (evitar choque osmótico...). Utilízase frecuentemente auga de peptona ó 0,1% e cloruro sódico ó 0,85 %.

Estes métodos resultan caros en medios e material, problema que se evita con outras dúas técnicas:

- Método do reconto en gotas (método de Miles-Misra) sementando gotas (0,02 mL) de diferentes dilucións na mesma placa.



- Reconto en placas en espiral, no que se utiliza un sistema mecánico consistente en sementar 0,05 mL de mostra líquida en espiral na superficie dunha placa. É un sistema automático que deposita a maior parte da mostra cerca do centro da placa e vai diminuindo o volume según se vai acercando ó bordo, producindo un efecto equivalente a unha dilución da mostra de 10^{-3} nunha única placa. Despois da incubación as colonias cóntanse utilizando unha reixa deseñada especialmente que relaciona a área da placa co volume aplicado.



A sensibilidade limitada destes métodos débese ós pequenos volumes de mostra utilizados, polo que a sensibilidade pode aumentarse aumentando o volume da mostra e o número de réplicas ou placas contadas.

Tamén é posible filtrar un volume de mostra a través dun filtro de membrana e despois depositala nun medio de cultivo.

3.4.2. Número mais probable (NMP)

É unha estratexia eficiente de estimación de densidades poboacionais especialmente cando unha avaliación cuantitativa de células individuais non é factible. A técnica baséase na determinación de presenza ou ausencia (positiva ou negativa) en réplicas de dilucións consecutivas de atributos particulares de microorganismos presentes en mostras de chan ou outros ambientes. Polo tanto, un requisito importante deste método é a necesidade de poder recoñecer un atributo particular da poboación no medio de crecemento a utilizarse. A correlación de densidade poboacional obtense a partir das táboa probabilísticas.

Algunhas das vantaxes do NMP son:

- Determina só organismos vivos e activos metabolicamente.
- Adoita ser máis rápido e igual de fiabilidade que outros métodos tradicionais.

4. Relación microorganismos-alimentos

4.1. Calidade microbiolóxica dos alimentos

O exame rutinario dos alimentos e augas para detectar neles toda unha serie numerosa de microorganismos patóxenos e das súas toxinas é impracticable na maioría dos laboratorios, xa sexa por razóns económicas ou por dificultades técnicas. Por este motivo determinouse a utilización de grupos (ou especies) de microorganismos, na que enumeración ou reconto se realiza con maior facilidade e que a súa presenza en alimentos ou augas, en determinado número, indica a exposición dos alimentos ou augas a condicións que puidesen introducir microorganismos perigosos e/ou permitido a multiplicación de especies infecciosas ou toxicogénicas.

4.2. Microorganismos marcadores: índices e indicadores

Os microorganismos marcadores pódense utilizar como reflexo da calidade microbiolóxica dos alimentos con respecto á súa vida útil ou con respecto á súa inocuidade por non conter microorganismos patóxenos.

O termo **índice** sería aplicable a aqueles microorganismos cuxa presenza en número superior a un límite dado indicaría a posible existencia de patóxenos ecoloxicamente relacionados con el. Por exemplo, a presenza de *E. coli* en auga de bebida indicaría contaminación fecal coa posible presenza de patóxenos de orixe entérica.

O termo **indicador** aplicaríase a aqueles microorganismos cuxa presenza nun número dado significaría un tratamento de seguridade inadecuado. O exemplo clásico é o uso das bacterias do grupo coli-aerogenes para examinar a calidade microbiolóxica do leite pasteurizado e dos xeados.

A utilidade dun microorganismo marcador, xa sexa na súa función de índice ou de indicador, baséase na facilidade e rapidez con que poida ser detectado e na asociación co microorganismo patóxeno co que está relacionado (debe estar presente sempre que o estea o patóxeno e ter unhas características de crecemento e resistencia similares). Un marcador ideal debería cumprir unha serie de características; especificidade (en canto á orixe, debe estar sempre presente no ecosistema ó que representa), sensibilidade de detección (presenza en cantidades significativas no ecosistema que representa), resistencia no medio ou nos alimentos (equivalente ás dos microorganismos que representa), e deben existir técnicas rápidas, fiables e doadas para detectalo.

Un resultado positivo para un microorganismo indicador non apunta necesariamente á presenza de microorganismos patóxenos no mesmo produto, pero a detección dun microorganismo índice proporciona evidencia de que o patóxeno ecoloxicamente relacionado tamén pode estar presente. Un marcador

determinado pode funcionar como índice e como indicador, mesmo no mesmo alimento. Por exemplo, a presenza de números significativos de unidades formadoras de colonia (UFC) de *E. coli* en camaróns conxelados precocidos pode denotar un procesado térmico inadecuado (función de indicador) e a presenza potencial de patóxenos entéricos (función de índice).

4.2.1. Coliformes, coliformes fecais e *E. coli*

E. coli é unha especie bacteriana perfectamente definida e o seu valor como indicador de contaminación fecal non ofrece dúbida xa que é a bacteria de orixe fecal máis característica e a súa presenza en auga ou alimentos sinala un perigo potencial con máis certeza que no caso dos coliformes. Non obstante, o seu valor como índice é máis discutible, xa que por exemplo *Salmonella* é máis resistente, polo que a ausencia de *E. coli* podería ofrecer unha seguridade ficticia. Sen dúbida, é útil como indicador de contaminación fecal en produtos crus e auga non sometida a tratamentos de potabilización e tamén para determinar a efectividade dos métodos de procesado e limpeza na industria alimentaria e nos sistemas de condución de auga.

4.2.2. Enterobacterias totais

Este é un grupo taxonomicamente ben definido, constituído por bacterias membros da familia *Enterobacteriaceae*, entre os que se encontran bacterias fermentadoras de lactosa (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* e *Yersinia*) e non fermentadoras da lactosa (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Klebsiella*), bacterias patóxenas e non patóxenas e bacterias ligadas ó medio entérico (orixe fecal). A súa detección baséase en que fermentan a glicosa a 32-37°C. Son indicadores de contaminación fecal cunha relación sanitaria máis diversa que os coliformes.

A vantaxe das enterobacterias totais como marcador con respecto a *E. coli* baséase na maior resistencia das enterobacterias patóxenas a tratamentos térmicos suaves, á refrixeración, conxelación e desecamento. Soamente en alimentos ácidos é superior o valor de *E. coli* debido a que é máis resistente a pHs baixos que as enterobacterias patóxenas.

Un exemplo representativo da utilidade das *Enterobacteriaceae* totais respecto dos coliformes é o caso dun brote de infección por cepas de *E. coli* enteropatóxenas, acontecido en EEUU, como consecuencia do consumo de queixo francés importado. O microorganismo responsable foi *E. coli* O124, unha cepa que fermenta a lactosa lentamente e que non se detectou nas probas de coliformes realizadas. Non obstante, unha vez illada a cepa comprobouse que fermentaba fortemente a glicosa e, polo tanto, era detectable nas probas de *Enterobacteriaceae* totais. Considerouse significativo, neste caso, que os recontos de coliformes foron de 10^3 /gr, cando *E. coli* O124 estaba presente en número de 10^7 /gr.

O uso das *Enterobacteriaceae* totais como índice de contaminación fecal adquiriu grande aceptación en Europa, empregándose fundamentalmente para examinar a calidade microbiolóxica de alimentos procesados (pasteurizados, cocidos, etc), alimentos infantís e similares. A súa presenza nestes alimentos en niveis altos indica elaboración inadecuada, contaminación posterior ó procesado, ou ambas as dúas e implica un risco sanitario.

4.2.3. Enterococos

Posúen un elevado valor como microorganismos marcadores en certos alimentos, sobre todo conxelados, deshidratados ou desecados.

Así por exemplo, demostrouse que en alimentos cociñados a supervivencia de *Enterococcus* spp. non foi significativamente diferente da de *Listeria monocytogenes*.

No caso de alimentos de orixe animal ou vexetal transformados mediante fermentación, como embutidos, queixos ou chucrut, que conteñen unha alta carga de enterococos como parte da microbiota de fermentación, este grupo non ten ningunha validez como índice.

4.2.4. Coltridium sulfito-reductores

Está constituído por bacterias do xénero *Clostridium* que se caracterizan por reducir o sulfito a sulfuro. Pertencen á familia *Bacillaceae* e forman esporas moi resistentes, a procesos de inactivación que se empregan en tecnoloxía de alimentos, especialmente á calor e ó desecamento.

Pódense usar como indicadores de contaminación fecal en augas de bebida ou alimentos procesados, especialmente en alimentos tratados por calor, como as conservas, alimentos desecados e outros con baixa actividade de auga como o leite condensado, que polas súas características non permiten que xerminen as esporas. Neste tipo de alimentos tamén pode utilizarse como índice da presenza de *Clostridium botulinum*. As esporas deste último non son das máis resistentes polo que se o resultado do reconto non supera $10^2/g$, a probabilidade de que estea presente unha spora de *Cl. botulinum* é inferior a 10^{-4} , o que para alimentos deshidratados, se son reconstituídos de xeito idóneo, proporciona unha marxe de seguridade axeitada.

4.2.5. Aerobios mesófilos

Este marcador tamén aparece referido na bibliografía como "reconto total", "reconto de microorganismos totais" ou "reconto en placa". Inclúe microorganismos aerobios mesófilos, patóxenos ou non, que poden multiplicarse a $31 \pm 1^\circ\text{C}$.

O seu reconto é útil para avaliar a calidade microbiolóxica das materias primas e a eficacia das distintas operacións nos procesos de industrialización dos alimentos, de maneira que a información obtida permite a concentración de esforzos e recursos nos puntos do proceso que presentan problemas.

Non obstante, o seu valor é limitado en certos casos. En alimentos fermentados (embutidos, col ácido, queixos, derivados lácteos) é desexable a multiplicación dos microorganismos para que o alimento teña as características esperadas, polo que, neste caso, o reconto de microorganismos aerobios mesófilos carece de significado. En alimentos tratados por calor, este marcador pode dar moi baixo e non obstante o alimento podía estar moi contaminado inicialmente. O mesmo pode acontecer en alimentos deshidratados ou conxelados.

4.2.6. Mofos e levaduras

Os fermentos e os mofos crecen máis lentamente que as bacterias nos alimentos non ácidos que conservan humidade e, por iso, poucas veces dan lugar a problemas en tales alimentos. Non obstante, en alimentos ácidos e de baixa actividade de auga crecen con maior rapidez dando lugar a perdas importantes por acurtamento da vida útil de froitas frescas e derivados, vexetais, queixos, cereais, salazonados e conservas en vinagre, así como alimentos deshidratados e conxelados. Certos mofos poden producir micotoxinas que representa un perigo para a saúde do consumidor. En xeral, unha carga alta de mofos nestes alimentos fainos inadecuados para o consumo, salvo no caso de certos queixos e embutidos, nos que forman parte da microbiota de maduración. A presenza de cantidades importantes de fermentos neses alimentos non ten significado sanitario, se ben o alimento pode non ser adecuado para o consumo pola alteración das súas características organolépticas.

4.2.7. Microorganismos anaerobios

Estes recontos inclúen non só bacterias anaerobias estrictas, senón tamén bacterias anaerobias facultativas como as enterobacterias, os enterococos ou os estafilococos, a non ser que se utilicen medios de cultivo selectivos.

Presentan algunha vantaxe con respecto ós recontos de microorganismos aerobios, aínda que probablemente nunca os substituirán.

4.2.8. Microorganismos psicrófilos

Microorganismos psicrótrofos son aqueles que poden crecer a temperaturas de refrixeración. O interese da súa detección en alimentos radica en que algúns son patóxenos e outros producen alteracións organolépticas dos alimentos. Este marcador utilízase sobre todo no control de calidade dos produtos refrixerados, fundamentalmente como indicador, co fin de predicir a vida útil destes produtos.

4.2.9. Estafilococos

Sobre todo *Staphylococcus aureus*, cuxa presenza en alimentos se interpreta como indicador de contaminación a partir da pel, boca, fosas nasais, etc. dos manipuladores de alimentos; se ben os equipos e superficies de procesado dos alimentos sucios e as materias primas de orixe animal tamén poden ser fonte de contaminación. Cando se detectan en número alto nun alimento significa o control da temperatura e/ou as prácticas de limpeza e desinfección da industria non foron adecuadas.

4.2.10. *Streptococcus (Mitis-salivarius)*

Ademais de ser útil a súa enumeración en alimentos, tamén pode selo o seu reconto no ambiente dos lugares de procesado dos alimentos. A súa presenza en cuberterías, vaixelas, etc. indica contaminación recente ou remota, pero, en calquera caso, deficientemente eliminada e procedente da cavidade oral e do tracto respiratorio.

5. Investigación de microorganismos marcadores

5.1. Microbioloxía da auga

5.1.1. Aspectos lexislativos

Na auga poden encontrarse unha gran variedade de microorganismos, os cales afectan en maior ou menor medida á potabilidade da auga e ás súas características organolépticas. Ademais da flora normal (*Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.), na auga poden existir microorganismos contaminantes.

Unha das fontes principais de contaminación son as augas residuais que conteñen feces que poden ser vehículo de transmisión de patóxenos. A presenza de indicadores de contaminación fecal (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*) revela a existencia de contaminación fecal, e polo tanto a posibilidade de que se encontren presentes patóxenos de transmisión oral-fecal.

A auga considérase potable se os valores obtidos nos ensaios están dentro dos límites establecidos pola lei.

As normas legais vixentes esixen:

- **Aerobios totais:** Non existe límite legal pero os valores máximos recomendados son, Aerobios a 37° C: 10 /mL. Aerobios a 22° C: 100 por mL.
- **Coliformes:** Coliformes totais: <1 / 100 mL. Coliformes fecais: <1 / 100 mL.
- **Estreptococos fecais:** <1 / 100 mL ou NMP<1

- Clostridios sulfito reductores: <1 / 20 mL.

5.1.2. Filtración sobre membrana

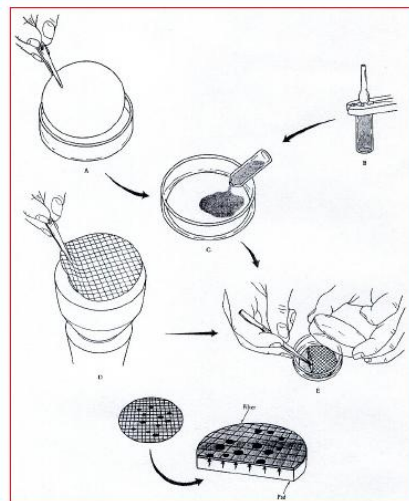
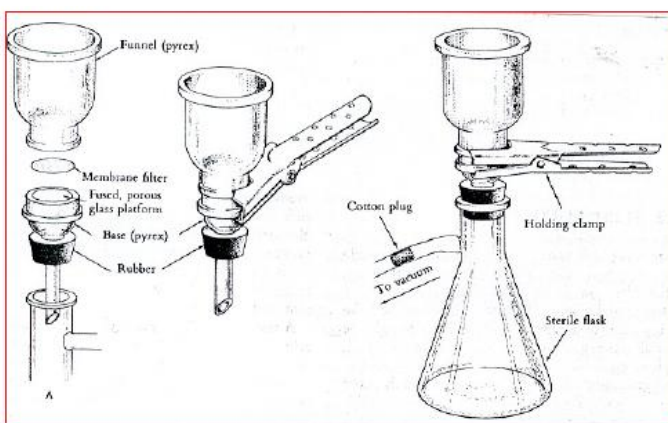
A presenza de bacterias patóxenas na auga destinada ó consumo humano é un risco sempre presente, que se incrementa nas áreas de maior densidade da poboación. A técnica de filtración por membrana (MF) baséase en facer pasar a mostra de auga problema a través dun filtro de membrana microporosa, en cuxa superficie quedan retidos os microorganismos. Utilízanse membranas que teñen un tamaño de poro de 0.45 microns xa que a maioría dos microorganismos teñen un tamaño superior (diámetro).

a) *Materials*

- Sistema de filtración.
- Bomba de baleiro.
- Membranas de filtración de 0,45 microns de diámetro de poro.
- Pinzas de aceiro.
- Placas de petri.
- Ágar nutritivo.
- Ágar MacConkey.

b) *Procedemento*

- Introducir filtro de celulosa esteril de 0,45 mm no sistema de filtración (con pinzas metálicas previamente flamexadas)
- Filtrar 50-100 mL da mostra



- Retirar o filtro con axuda das pinzas e colocalo sobre unha placa de petri (realizar por duplicado) con:
 - Ágar nutritivo, incubar a 37°C durante 24 horas.
 - Ágar MacConkey, incubar a 37°C durante 24 horas.

c) Observacións e Interpretación

- Realizar o recuento das placas. No caso de observarse colonias de color rosado no ágar MacConkey, realizar unha confirmación de *E. Coli* mediante a proba do IMVIC (Indol, Roxo de Metilo, Voges Proskaur, Citrato)
- Resultado: + + - -
- Os resultados exprésanse como n.º de microorganismos por 100 mL de auga.
- No caso de non obter colonia illadas, repetir a sementeira empregando a técnica das dilucións seriadas.

5.1.3. Recuento directo de colonias en medio sólido

Neste tipo de métodos, as bacterias dispersadas nun medio sólido dan lugar a colonias illadas que poden ser directamente contadas.

No caso de augas moi ricas en bacterias, será necesaria a realización de dilucións sucesivas.

a) Materiais

- 10 tubos con 9 mL de auga de peptona.
- Placas de petri.
- Ágar TSA.
- Ágar PSP
- Ágar KAA

b) Procedemento

- Tomamos 1 mL da auga problema e pasámola a un tubo con 9 mL de auga de peptona, e así sucesivamente ata completar as 10 dilucións
- Elixir 5 dilucións e sementalas en masa con TSA
- Elixir 5 dilucións e sementalas segundo o método do recuento en gotas en TSA
- Incubar a 37°C durante 24 horas.

c) Observacións e Interpretación

- Realizar o recuento e expresalo como UFC/mL da auga problema

5.1.4. Método de reconto indirecto por cálculo estatístico trala distribución do inoculo en medio de cultivo líquido. Técnica do NMP

É a técnica mais empregada para a determinación do número de bacterias coliformes e *Streptococcus fecalis* dunha mostra. Sen embargo, o resultado obtido só será unha aproximación estatística.

a) Materiais

- 3 tubos 10 mL de medio Rote e tres de caldo lactosado.
- 3 tubos 9 mL de medio Rote e tres de caldo lactosado.
- 3 tubos 9,9 mL de medio Rote e tres de caldo lactosado.

b) Procedemento

- Tomamos 10 mL da auga problema e pasámola a serie de tubos con 10 mL de caldo, 1 mL nos de 9 e 0,1 mL nos de 9,9 mL de caldo.
- Incubar a 37°C durante 48 horas.

c) Observacións e Interpretación

- Observar a existencia de crecemento e establecer a concentración de coliformes totais (caldo lactosado) e de estreptococos fecais (medio Rothe).



En función das consideracións microbiolóxicas, que calidade presenta a auga problema?

5.2. Microbioloxía dos alimentos

5.2.1. Determinación da calidade microbiolóxica do leite

PROBA DA REDUCCIÓN DE COLORANTES

A maioría dos xermes do leite elaboran reductasas que modifican o potencial de óxido-redución desta. Para demostrar ese fenómeno abonda engadir ó leite unha substancia que se descolore ó pasar da forma oxidada á forma reducida. A rapidez con que cambia de cor está en función da poboación bacteriana e, por iso, pode ser un índice do grao de contaminación do leite.

a) Material

- Tubos de ensaio con tapóns estériles.
- Baño María ou estufa a 37°C.
- Pipetas graduadas.
- Solución de azul de metileno. Preparar unha solución nai diluíndo uns gramos de azul de metileno en alcohol de 96° ata conseguir a saturación. Para preparar a solución de traballo tomar 2.5 mL da solución nai e sumar 97.5 mL de auga destilada estéril.

b) Procedemento

- Axitar o leite e agregar 10 mL de leite a un tubo de ensaio.
- Engadirlle 0.5 mL azul de metileno, evitar o contacto co leite.
- Tapar os tubos e introducilos en baño María a 37°C.
- Realizar dous ensaios simultáneos para cada mostra.
- Ler os resultados ó cabo de 10 minutos e á hora.

c) Observacións e Interpretación

A presenza de microorganismos no leite e pola súa acción reductora, prodúcese unha modificación da cor do azul de metileno, pasando de cor azul intensa a azul claro, podendo desaparecer totalmente de acordo á carga microbiana presente. Un leite cun contido baixo en microorganismos, non modifica a tinguadura azul do colorante ou tarda moito tempo en modificalo. No leite natural fresco o tempo de decoloración do colorante nesta proba debe ser superior ás dúas horas, mentres que no leite tratado debe ser superior ás cinco horas.



PROBA DO ALCOHOL

Cando se engade ao leite certa cantidade de alcohol etílico prodúcese unha deshidratación, parcial ou total, de certos coloides hidrófilos, que pode desembocar na súa desnaturalización, e con el á perda do seu equilibrio e floculación. Este resultado só se alcanza con certo grao alcohólico da mestura final, por debaixo do cal os leites termicamente estables non floculan, mentres que o leite anormal, que é termicamente inestable, flocula.

Baseándose neste principio ideouse un método simple de control ou de selección, que consiste en mesturar de golpe volumes iguais de leite cru e dunha solución acuosa de alcohol etílico de concentración coñecida. A elección desta última varía segundo a modalidade de quentamento (pasteurización, esterilización, etc.) a que ha de someterse o leite.

a) Material

- Pipetas de 2 mL e de 5 mL.
- Tubos de ensaio de 10 mL.
- Alcohol de 68° (prepárase levando 72 mL de alcohol etílico neutralizado de 95° ata 100 mL con auga destilada).
- Alcohol de 72° (prepárase levando 76 mL de alcohol etílico neutralizado de 95° ata 100 mL con auga destilada).

b) Procedemento

- Enchemos 4 tubos de ensaio por cada tipo de leite e engadimos en cada grupo de tubos dous con alcohol de 68° e dous con alcohol de 72°.
- Unha vez pechados inverter varias veces o tubo de ensaio para permitir unha boa homoxenización da mostra.

c) Observacións e Interpretación

Os leites ácidos inestables en presenza de calor, coagúlanse na proba do alcohol.

Aínda que non existe sempre unha correspondencia absoluta entre a inestabilidade térmica e a inestabilidade ó alcohol, esta proba permite descubrir unha gran maioría dos leites que non poderían soportar o quentamento en xeral nin a esterilización en particular, xa que mesmo algunhas mostras de leite fresco, normais en todos os aspectos dan ás veces un resultado positivo.



Cal é o leite esterilizado? E o pasteurizado?

5.2.2. Detección e recuento de enterobacterias, enterococos e microorganismos mesófilos en queixos

En xeral os recontos bacterianos baixos están asociados con alimentos seguros. A maioría dos alimentos industrializados (agás, por exemplo, os

produtos fermentados) deben ser considerados como inadecuados para o consumo cando conteñen un gran número de microorganismos aínda cando estes microorganismos non sexan coñecidos como patóxenos e non alterasen de forma apreciable os caracteres organolépticos do alimento. Algúns microbiólogos estimaron o reconto bacteriano como un dos mellores indicadores do grao de alteración dos alimentos.

Os queixos feitos con leite sen pasteurizar parecen estar asociado con brotes de intoxicacións alimentarias con maior frecuencia que os fabricados a partir de leite pasteurizado.

Nesta práctica imos a realizar o estudio e reconto de enterobacterias, enterococos e microorganismos mesófilos presentes en queixos elaborados con leite pasteurizada e sen pasteurizar.

a) Material

- 1 botella con 90 mL de auga de peptona.
- 4 tubos con 9 mL de auga de peptona.
- Bolsas con filtro estériles
- Medio PCA
- Medio VRBGA
- Caldo lactosado BGBL
- Ágar Levine
- Medio KAA

b) Procedemento

- Homoxenizamos 10 gramos de queixo con 90 mL de auga de peptona durante 2 minutos con axuda do stomaquer.
- Realizamos dilución seriadas a partir da mostra nai introducindo 1 mL en cada tubo con 9mL de auga de peptona.
 - **Mesófilos:** sementamos en superficie as dilucións -1,-2,-3,-4 en PCA e incubamos a 30 °C durante 48 horas.
 - **Coliformes:** sementamos en masa as dilucións 0,-1,-2 en VRBGA (unha vez solidificou o ágar engadimos unha nova capa de medio pra crear condicións de semianaerobiose) e incubamos a 37 °C durante 24 horas. Unha vez temos crecemento para a confirmación de *E. Coli*, tomamos unha colonia ven illada e sementamos superficie en Ágar levine e en 3 tubos de caldo lactosado BGBL e incubamos a 37° C durante 24 horas.
 - **Enterococos:** sementamos en masa en ágar KAA as dilucións -1,-2,-3,-4 e incubamos a 37 °C durante 24 horas.

c) Expresión dos resultados

Realízanse os recontos e exprésanse como unidades formadoras de colonias. Utilizando a táboa do NMP confirmar a presenza de *E. Coli*.



Hai *E. coli* nas mostra de queixo? En que te basas para realizar esta afirmación.

5.2.3. Investigación de *Salmonella* en ovo

Nesta práctica imos a determinar a presenza de *salmoella* nunha mostra de ovo.

a) *Material*

- Caldo nutritivo.
- Ágar BGBL.
- Ágar *Salmonella-Shigella*.
- Medio Kligler.
- Ágar común.
- Caldo triptófano
- Reactvo de Kovacs

b) *Procedemento*

- Sementar 10 mL da mostra en 100 mL de caldo nutritivo para realizar unha fase de enriquecemento e incubar a 37°C durante 24 horas.
- Pasadas as 24 horas sementar en ágar BGBL e Ágar *Salmonella-Shigella*, e incubamos a 37 durante 24 horas.
- Para a confirmación elixir unha colonia sospeitosa (En ágar BGBL colonias roxas e en Ágar *Salmonella-Shigella* colonias transparentes con centro negro) sementar en caldo tripotófano para a proba do indol (-).

c) *Expresión dos resultados*

Expresar os resultados como UFC/g de mostra



Hai *Salmonella* nas mostra de ovo? En que te basas para realizar esta afirmación.

5.2.4. Investigación de *Staphylococcus aureus* en crema pasteleira

Nesta práctica imos a determinar a presenza de *Staphylococcus aureus* nunha mostra de crema pasteleira.

a) **Material**

- Auga de peptona.
- Ágar Braid Parker.
- Peróxido de hidróxeno.
- Ágar semisólido Braid Parker.
- Bolsas estériles con filtro

b) **Procedemento**

- Sementar 25 g da mostra en 100 mL de auga de peptona.
- Sementar en superficie en ágar Braid Parker e incubar a 30°C durante 24-48 horas.
- Para a confirmación elixir unha colonia sospeitosa sementar en ágar semisólido Braid Parker para a proba da motilidade (-) incubar a 30°C durante 24 horas. Realizar tamén a proba da catalasa (+).

c) **Expresión dos resultados**

Expresar os resultados como UFC/g de mostra



Hai *Staphylococcus aureus* mostra de crema pasteleira? En que te basas para realizar esta afirmación.

5.2.5. Investigación de *Staphylococcus* e *Streptococcus* en superficies e utensilios de traballo da industria alimentaria

O obxectivo desta práctica é determina a limpeza das superficies de traballo, despois dunha limpeza con auga e deterxente.

a) Material

- Placas contact slide PCA+TTC+Nuetralizante/ VRBGA+Nuetralizante

b) Procedemento

- Quitar o tapón que conten o laminocultivo. Evitar calquera contacto co ágar.
- Apoiar durante dez segundos contra a superficie, exercendo unha lixeira presión.
- Introducir novamente no tubo e incubar a 37° C durante 24 horas

5.2.6. Análise de manipuladores

O obxectivo desta práctica e observar a limpeza das mans dos manipuladores despois de diferentes formas de limpeza con e sen luvas.

a) Material

- Placas de PCA
- Deterxente e etanol

b) Procedemento

- Coas mans sen lavar tocaremos na metade dunha placa de PCA.
- Lavamos as mans con auga e tocamos a outra metade da placa.
- Lavamos as mans con auga e xabón durante 2 minutos e tocamos a metade doutra placa de PCA.
- Lavamos as mans con auga e xabón e utilizamos un desinfectante (etanol) e tocamos a outra metade da placa.
- Repetimos o procedemento esta vez coas luvas postas
- Incubamos a 30°C durante 48 horas.

5.2.7. Análise do aire

O obxectivo desta práctica e determinar a calidade do aire do laboratorio.

a) Material

- Placas de MSA

b) Procedemento

- Colocaremos unha placa aberta (na zona elixida por cada un) durante 15 minutos.
- Incubamos a 30 °C durante 48 horas.



Que deduces dos resultados obtidos.

5.2.8. Investigación de *Pseudomonas aeruginosa*

Nesta práctica imos a determinar a presenza de *Pseudomonas aeruginosa* nunha mostra de auga.

a) *Material*

- Caldo lactosado con magnesio
- Agar nutritivo

b) *Procedemento.*

- Sementar 100 mL da auga problema 100 mL de caldo lactosado con magnesio para a fase de enriquecemento e incubar a 37°C durante 24 horas.
- Sementar en Agar nutritivo en superficie, e incubar a 42°C durante 24 horas.
- Realización da proba da citocromo-oxidasa as colonias sospeitosas.

c) *Expresión dos resultados*

- Expresar os resultados como UFC/g de mostra

5.2.9. Reconto de mofos filamentosos e levaduras en alimentos

Xeralmente a presenza de mofos e fermentos está aumentada nos alimentos cuxo pH é de 4.5 ou menos, tales como xugo de tomate, maionesa, conservas de froitas, bebidas acidificadas, etc., e outros como xeados, manteiga, leite condensado, queixos, azucre, etc.

a) *Material*

- 100 mL de auga de peptona.
- Ágar OGYE (oxitetraciclina glicosa extracto de levadura).
- Bolas estériles con filtro.

b) *Procedemento.*

- Pesar 25 gramos de mostra e homoxenizalos coa aga de peptona no stomaquer.
- Sementar en masa no ágar OGYE.
- Homoxenizar con movementos xiratorios e en cruz con coidado de non manchar co ágar a tapa da placa de petri. Deixar solidificar.

c) *Expresión dos resultados*

- Incubar a 25°C (temperatura ambiente) durante 5 días realizando lecturas ós 3 días para observar o crecemento das colonias e efectuar o primeiro reconto. A partir do segundo día seleccionar as placas que teñan entre 30 e 300 colonias.
- Expresar os resultados como UFC/g de mostra.

6. Técnicas de exame

6.1. Probas bioquímicas

6.1.1. Proba da Catalasa

a) *Principio*

O peróxido de hidróxeno é un dos produtos oxidativos finais no metabolismo aerobio dos carbohidratos. Se se acumula, o peróxido de hidróxeno é letal para as células bacterianas. A catalasa converte o peróxido de hidróxeno en auga e osíxeno.

b) *Reactivos*

- Peróxido de hidróxeno ó 3% (protexido da luz e a calor)

c) *Procedemento*

Agregar unhas poucas gotas de peróxido de hidróxeno ó 3% (aproximadamente 1 mL) directamente sobre a superficie do ágar.

d) *Interpretación*

A rápida aparición e a sostida produción de burbullas de gas ou efervescencia constitúen un resultado positivo. Como algunhas bacterias poden ter outros enzimas que descompoñen o peróxido de hidróxeno, a produción dunhas poucas burbullas despois de 20 a 30 segundos non se considera resultado positivo.

e) *Controis*

- Exceptuando os estreptococos, a maioría das bacteria aerobias e anaerobias facultativas posúen actividade catalasa.
- Control positivo: *Staphilococcus aureus*.
- Control negativo: *Streptococcus*.

6.1.2. Proba da Citocromooxidasa

a) *Principio*

A proba da oxidase está baseada na presenza na bacteria do enzima citocromo oxidasa.

b) *Reactivos*

- Reactivo de Kovacs

c) *Procedemento*

Agregar unhas poucas gotas de reactivo (3-4) directamente sobre a superficie dunha tira de papel de filtro, e dispersase unha colonia sospeitosa na zona onde botamos o reactivo.

d) Interpretación

As colonias bacterianas que teñen actividade citocromooxidasa desenvolven unha cor azul na zona de inoculación en 10 segundos. Se a aparición de cor se produce pasados 20-60 segundos pode considerarse negativo.

e) Controis

- Control positivo: *Pseudomonas aeruginosa*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

6.1.3. Pobra do Indol

a) Principio

Pola degradación do triptófano libérase indol, ácido pirúvico, amoníaco e enerxía. Ese indol pode ser detectado polo emprego de determinados reactivos que dan unha reacción de cor.

b) Reactivos

- Caldo Triptófano (1%)
- Reactivo de Kovacs

c) Procedemento

Co obxecto de visualizar o indol formado debemos engadir 15 gotas do reactivo de Kovacs, directamente ó tubo xa incubado, a 37°C durante 24 horas, e axítase suavemente.

d) Interpretación

Cando existe indol, este combinase co aldehído que se encontra no reactivo de Kovacs, para dar unha cor vermella na interfase do reactivo e o medio.

e) Controis

- Control positivo: *Escherichia coli*.
- Control negativo: *Klebsiella pneumoniae*.

6.1.4. Licuefacción da xelatinasa

a) Principio

Os microorganismos que hidrolizan a xelatina posúen o enzima xelatinasa.

b) Reactivos

- Medio semisólido de xelatina.

c) Procedemento

Inoculase o medio de xelatina co microorganismo problema e incubamos a temperatura óptima do microorganismo en estudio, durante 24 horas.

d) Interpretación

Se unha vez arrefriado o medio durante un período máximo de 15 minutos, se produce a solidificación da xelatina, a proba considerase negativa, se o medio se mantén líquido considerase positiva.

e) **Controis**

- Control positivo: *Staphylococcus aureus*.
- Control negativo: *Listeria monocytogenes*.

6.1.5. Hidrólise do amidón

a) **Principio**

Os produtos da hidrólise do amidón non racionan co iodo.

b) **Reactivos**

- Ágar amidón (1/100)
- Lugol

c) **Procedemento**

Sementar por estría nunha placa de ágar con amidón e incubar a 37°C durante 48 horas. Se hai crecemento, cubrir a placa con lugol.

d) **Interpretación**

Se unha vez se engadiu o lugol, o medio de cultivo o redor das colonias queda tinxido de cor negra, considérase como proba negativa.

e) **Controis**

- Exceptuando os estreptococos, a maioría das bacteria aerobias e anaerobias facultativas posúen actividade catalasa.
- Control positivo: *Bacillus subtilis*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

6.1.6. Producción de ureasa

a) **Principio**

A urease é unha importante encima microbiana vinculada coa descomposición dos compostos orgánicos. Pola súa acción desdobra a urea, liberando 2 moléculas de amoníaco.

b) **Reactivos**

- Ága urea

c) **Procedemento**

Sementase con asa a partir dun cultivo puro do microorganismo en estudio na superficie do pico de frauta do ágar. Débese utilizar un control negativo, e incúbanse a 35 C durante 24 horas.

d) **Interpretación**

Os microorganismos hidrolizadores urea viran a color vermello o medio, mentres que nos que non son hidrolizadores o medio conserva a súa cor.

a) **Controis**

- Control positivo: *Proteus vulgaris*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

6.1.7. Utilización do citrato

a) Principio

Determinar se un microorganismo é capaz de utilizar citrato como única fonte de carbono para o metabolismo. O medio utilizado inclúe citrato como única fonte de carbono e fosfato amónico como fonte de nitróxeno. As bacterias que metabolicen o citrato, tamén utilizarán o fosfato amónico, coa conseguinte alcalinización do medio.

b) Reactivos

- Ágar Citrato de Simons

c) Procedemento

Tómase unha colonia ben illada da superficie dun medio de illamento primario e inocúlase, primeiramente en picadura e, logo, como unha estría única na superficie do pico de frauta. Incúbense a 35 °C durante 24 horas.

d) Interpretación

A proba considerase positiva cando aparece unha cor azul escura en 24- 48 horas, o que indica que o microorganismo foi capaz de utilizar o citrato. Tamén pode ser positiva se existe un crecemento de colonias visibles ó longo da estría de inoculación.

b) Controis

- Control positivo: *Enterobacter aerogenes*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

6.1.8. Reacción Voges-Proskauer

a) Principio

Esta proba bioquímica permite determinar a presenza de acetilmetilo-carbinol nos cultivos. Este composto é un produto final neutro derivado do metabolismo da glicosa, concretamente dunha fermentación particular, denominada butilenoglicólica, a cal predomina en certas bacterias.

b) Reactivos

- Caldo MR/VP
- Reactivo 1 (α -naftol en alcohol etílico absoluto)
- Reactivo 2 (hidroxido potásico ó 40%)

c) Procedemento

Incúbase un tubo de caldo RM/VP cun cultivo puro do microorganismo de estudo a 37°C durante 24 horas.

Unha vez finalizado o período de incubación e para proceder á lectura da proba bioquímica, extráese unha alícuota de 1 mL engádense os reactivos. En primeiro lugar, 0,6 ml do reactivo 1, e despois engádense 0,2 ml do reactivo 2. A continuación debe axitarse suavemente o tubo, deixándoo repousar durante 10-15 minutos.

d) Interpretación

A proba considerase positiva cando aparece unha cor vermella en 15 minutos, ou máis despois de agregar os reactivos, o que indica a presenza de diacetil. A proba non pode lerse despois dunha hora porque poderán aparecer falsos positivos.

c) Controis

- Control positivo: *Enterobacter aerogenes*.
- Control negativo: *Escherichia coli*.

6.1.9. Reacción de vermello de metilo

a) Principio

Trátase dunha proba para detectar a produción de ácidos fortes (láctico, fórmico e acético) a partir da fermentación "ácido-mixta" da glicosa.

b) Reactivos

- Caldo MR/VP
- Vermello de metilo

c) Procedemento

Tras a inoculación en MR/VP do microorganismo problema, incúbase a 37°C durante 24 horas. Despois da incubación, para levar a cabo a interpretación, engádesse 5 gotas do reactivo Vermello de metilo.

d) Interpretación

Considéranse vermello de metilo positivos só aqueles microorganismos que poidan manter un pH ácido, é dicir, aqueles que manteñen a cor vermella.

e) Controis

- Control positivo: *Escherichia coli*.
- Control negativo: *Enterobacter aerogenes*.

6.1.10. Fermentación de azucres

a) Principio

Determinase se a bacteria é capaz de fermentar un azucre particular (produción de ácidos acompañados ou non de gases). Aplícase a bacterias con metabolismo fermentativo, ensaiándose por separado diferentes azucres).

b) Reactivos

- Medio de fermentación de azucres
- Campá de Durham

c) Procedemento

Suspender o inculo no medio de cultivo, axitar e incubar a 37°C durante 24 horas.

d) Interpretación

Pode apreciarse unicamente cambio de cor no medio e/ou a formación de gas no interior da campá de Durham.

O resultado positivo verifícase grazas a viraxe da cor do medio de vermello a amarelo.

6.1.11. Metabolismo oxidativo/fermentativo (OF)

a) Principio

É unha proba que indica do tipo de metabolismo enerxético: oxidativo (O) ou fermentativo (F).

b) Reactivos

- Parafina estéril.
- Medio de Hugh-Leifson.

c) Procedemento

A bacteria inocúlase por picadura e incúbase en condicións de aerobiose (sen parafina, aberto o aire) e de anaerobiose (con parafina, tubo pechado), simultaneamente.

d) Interpretación

A produción de ácidos detectase pola aparición dunha coloración amarela. Os tubos obsérvanse a diario durante varios días.

e) Controis

- Control positivo (fermentativo): *Escherichia coli*.
- Control negativo (oxidativo): *Pseudomonas aureginosa*.

6.1.12. Hidróxido potásico (KOH)

a) Principio

Con este tratamento rómpese as paredes células Gram negativas que deixan escapar material cromosómico viscoso que transforma a suspensión nunha masa espesa e pegañenta.

b) Reactivos

- Solución de KOH ó 3%

c) Procedemento

Suspendese unha colonia tomada cunha asa procedente dun cultivo puro nunha gota de KOH colocada sobre a superficie dun portaobxectos de vidro. Axítase a suspensión continuamente coa asa durante 60 segundos.

d) Interpretación

A presenza dunha masa viscosa que se queda pegada á asa de sementeira indica que ese microorganismo é gram negativo.

e) Controis

- Control positivo: *Escherichia coli*.
- Control negativo: *Streptococcus spp.*

6.1.13. Uso de Ágar Ferro KLIGER e Ágar Ferro Triple Azucre (TSI)

a) Principio

Os microorganismos que son incapaces de fermentar a glicosa xeralmente detéctanse polas reaccións que producen ó crecer en ágar ferro triple azucre (TSI)

b) Reactivos

- Ágar TSI

c) Procedemento

Inocúlase o tubo de TSI en picadura ata o fondo e logo en estría sobre a superficie do tubo. Incúbase a 37°C durante 24 horas.

d) Interpretación

- Utilización só da glicosa: O pico de frunta é de cor vermella, o que indica que se produciu a degradación aerobia da glicosa.
- Utilización da glicosa e a lactosa: Cor amarela en todo o tubo.
- Utilización da glicosa e a lactosa e produción de SH₂: Cor amarela en todo o tubo e precipitado negro no fondo do tubo.

e) Controis

- Glicosa e lactosa positivo: *Escherichia coli*.
- Glicosa e lactosa negativo: *Shewanella putrefacensis*.
- Glicosa e lactosa positivo e produtor de SH₂: *Citrobacter freundii*.

6.1.14. Motilidade

a) Principio

Determinar se un microorganismo ten mobilidade ou non.

b) Reactivos

- Medio semisólido

c) Procedemento

A inoculación débese facer por picadura no centro do medio de cultivo ata unha profundidade de 1,2 a 1,5 cm. e incubar á temperatura do microorganismo en estudio durante 24 horas.

d) Interpretación

A presenza dunha zona difusa de crecemento que ensancha a partir da liña de inoculación, indica que o microorganismo presenta mobilidade.

e) Controis

- Control positivo: *Aeromonas hydrophila*
- Control negativo: *Staphylococcus aureus*

6.1.15. Proba da Bilis-Esculina

a) Principio

Esta proba baséase na capacidade de certas bacterias de hidrolizar a esculina en presenza de sales biliares.

b) Reactivos

- Medio Bile-Esculina.

c) Procedemento

Inocúlase o tubo/placa de bile- Esculina en zig-zag. Incúbase a 37°C durante 24 horas.

d) Interpretación

Unha proba considerase positiva cando se observa un ennegrecemento difuso no ágar inclinado, ou un halo negro/marrón ó redor das colonias na placa de ágar.

e) Controis

- Control positivo: *Listeria monocytogenes*.
- Control negativo: *Streptococcus, non grupo D*.



Elixir un microorganismo e realizarlle as probas bioquímicas propostas para completar a tabla do anexo.

6.2. Métodos rápidos para el control microbiológico

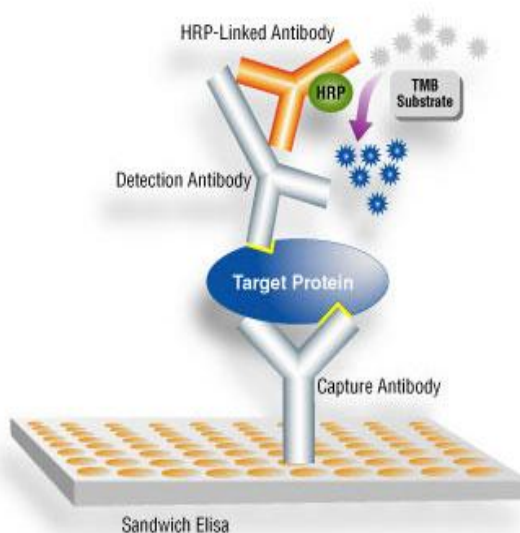
6.2.1. ELISA

Os métodos inmunolóxicos baséanse na especificidade dá reacción antíxeno-anticorpo.

É relativamente doado producir anticorpos fronte a antíxenos superficiais de microorganismos ou fronte a macromoléculas como poden ser a toxina botulínica ou a estafilocócica.

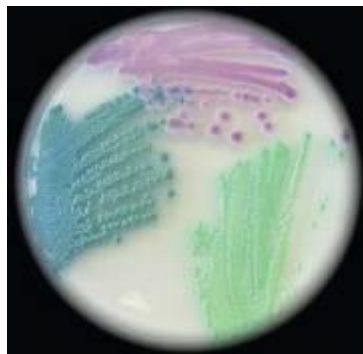
Hai moitos tipos de inmunoensaios, pero a característica principal é a unión antíxeno-anticorpo. O protocolo máis usado é ou sándwich ELISA (ensaio de inmunoabsorción ligada a encimas), que consiste en inmovilizar ou anticorpo de captura nunha superficie sólida (unha placa de microtitulación por exemplo), despois engádesse a mostra que contén o antíxeno a detectar e permítese que se unha ou anticorpo.

O problema destas probas e que o seu nivel de detección está arredor de 10^5 - 10^6 células polo que en mostras que teñan cantidades inferiores hai que facer algún tipo de enriquecemento ou concentración dos microorganismos, polo que aínda que os inmunoensaios son en de por si rápidos a preparación da mostra pode implicar tan largos como os dos procedementos tradicionais.



6.2.2. Medios cromoxénicos

Os medios cromoxénicos son medios de cultivo nos cales se inclúen directamente substratos cromoxénicos que permiten detectar actividades enzimáticas. Isto á súa vez permite reagrupar o illamento e a identificación inmediata.



Sementar unha mostra de candida. Podes identificar algunha especie concreta?

6.2.3. APIS

Os sistemas miniaturizados API® son métodos rápidos que permiten a identificación de microorganismos a través da realización de diferentes probas bioquímicas.

Estes sistemas consisten nun dispositivo de plástico con varios microtubos que conteñen diferentes medios de cultivo deshidratados ou diferentes substratos de encimas de acordo ó tipo de proba que se require montar. Entre algunhas das probas bioquímicas que poden realizarse con estes sistemas están as probas de fermentación de carbohidratos, a determinación da produción de H₂S, a determinación da hidrólise da xelatina, redución de nitratos, entre outras.

No mercado existe unha variedade de galerías para ser utilizadas na identificación de diferentes tipos de microorganismos, por iso aínda que todos estes sistemas teñen o mesmo fundamento, difiren no número e tipo de probas que permiten realizar, xa que a súa selección está directamente relacionada coa actividade metabólica do xénero ó que pertence o microorganismo a identificar.

Entre os sistemas miniaturizados API® que actualmente se encontran dispoñibles no mercado temos IDE 32 STAPH.

Trátase dun sistema de identificación dos xéneros *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Aerococcus* que inclúe test bioquímicas estandarizados e miniaturizados. A galería IDE 32 STAPH está composta por 32 cápsulas das cales 26 se utilizan como cápsulas test, contendo cada unha, un medio deshidratado.

Despois de 24 horas de incubación, as reaccións pódense ler visualmente ou con axuda dun programa informático.

a) Material

- Galería
- Medio de suspensión
- Reactivo VP B e VP A
- Reactivo NIT 1 e NIT 2
- Reactivo FB

b) Procedemento

- Tomamos varias colonias e homoxenizamos con 2 mL de medio de suspensión.
- Distribuimos 55 µL en cada cápsula
- Cubrimos as cápsulas 1.0, 1.1 e 1.2 con dúas gotas de aceite de parafina.
- Incubamos a 37°C durante 24 horas.
- Incubación e expresión dos resultados

c) Lectura dos resultados

Revelar todas as reaccións da fila 0 engadindo unha gota dos seguintes reactivos.

- Test NIT 1 e NIT 2 cápsula 0.0
- Test VP A e VP B cápsula 0.1
- Test FB cápsulas 0.2 a 0.5

PRUEBAS NEGATIVAS



PRUEBAS POSITIVAS



En función dos resultados obtidos cal é a tua especie de *Staphylococcus*

6.2.4. Antibiogramas

Esta proba consiste en enfrontar un microorganismo a diversas substancias antimicrobianas con unha concentración determinada para establecer a sensibilidade ou resistencia do devandito microorganismo a estas.

a) **Material**

- Medio de cultivo: o medio que se utiliza é o Mueller-Hinton. As placas sécanse 30 minutos a 37°C antes do seu emprego.
- Inoculo: a cepa que se estuda cultívase durante 24 horas no medio de cultivo sólido, normalmente á temperatura de 37°C; posteriormente realízase unha suspensión en solución salina estéril, de maneira que obteñamos aproximadamente unha concentración de 10⁶ de bacterias/mL.

- Discos de antibióticos.

b) Procedemento

- Sementeira: realízase unha sementeira por inundación, utilizando 3-5 mL da dilución preparada. Déixase repousar 5 minutos. Posteriormente elimínase o sobrenadante inclinado a placa en varias direccións, para deixar secar a placa durante 10 minutos a 37°C en posición invertida. Tamén se pode realizar unha sementeira en superficie con axuda dun hisopo.
- Aplicación dos discos antibióticos: os discos póñense a uns 15 mm da periferia da placa con axuda do aplicador, apertando lixeiramente os discos que non entrasen totalmente en contacto co medio usando para tal fin a asa de platino esterilizada á chama.
- A continuación déixanse secar as placas de 15 a 30 minutos a temperatura ambiente para que se sequen por completo.
- Incubación das placas a 37°C durante 18-24 horas.

c) Lectura dos resultados

Tras este período observarase o crecemento bacteriano e os halos de inhibición, se os houbera.

- Lectura da zona de inhibición: mídese o diámetro (en milímetros) da zona de inhibición cunha regra ou compás. Cando o bordo non é neto, a lectura realízase na zona que corresponda aproximadamente ó 80% de inhibición. Certos antibióticos producen ás veces extensas colonias periféricas que non hai que ter en conta na medición do diámetro se estas son escasas.
- Interpretación do antibiograma: compáranse os diámetros dos halos de inhibición producidos por cada un dos antibióticos utilizados cos que se detallan na Táboa 1 adxunta. Na se relacionan as zonas de inhibición coa potencia dos discos e a sensibilidade bacteriana, polo que debemos asegurarnos que a potencia dos discos que reflicte a táboa coincide coa usada por nós.



Para o uso clínico clasificáronse as bacterias en tres grandes grupos, segundo a súa sensibilidade antibiótica:

- Cepa sensible: é aquela que pode ser afectada por un tratamento á dose habituais por vía xeral.
- Cepa intermedia: é aquela que pode ser afectada por un tratamento local, mediante un aumento das doses por vía xeral, ou por unha concentración fisiolóxica particular (ouriños, bile, etc.).
- Cepa resistente: é aquela que probablemente non será afectada coas doses habituais, sexa cal sexa o tipo de tratamento.

CONSEJOS PARA LA REALIZACION DE UN ANTIBIOGRAMA

1. Non se debe realizar o antibiograma sobre unha poboación mixta de microorganismos, debendo procederse previamente ó illamento e cultivo en pureza dos distintos microorganismos encontrados na mostra clínica, para, posteriormente, realizar un antibiograma para cada un dos distintos tipos de microorganismos de significación clínica achados.
2. Non deben incluírse un número moi elevado de antibióticos.
3. Débese limitar o estudo da sensibilidade ós antibióticos a aqueles que presumiblemente sexan activos sobre o microorganismo implicado no proceso infeccioso.



A que antibióticos é mais sensibles?

Anexos

I. Táboas número mais probable

Lectura (1)	Indice NMP por 100ml	Limite de confianza (2)		Lectura (1)	Indice NMP por 100ml	Limite de confianza (2)	
		Inferior	Superior			Inferior	Superior
000	< 0			412	26	9	78
001	2	< 0.5	7	420	22	7	67
010	2	< 0.5	7	421	26	9	78
020	4	< 0.5	11	430	27	9	80
				431	33	11	93
100	2	< 0.5	7	440	34	12	93
101	4	< 0.5	11				
110	4	< 0.5	11	500	23	7	70
111	6	< 0.5	15	501	31	11	89
120	6	< 0.5	15	502	43	15	110
				510	33	11	93
200	5	< 0.5	13	511	46	16	120
201	7	1	17	512	63	21	150
210	7	1	17	520	49	17	130
211	9	2	21	521	70	23	170
220	9	2	21	522	94	28	220
230	12	3	28	530	79	25	190
				531	110	31	250
300	8	1	19	532	140	37	340
301	11	2	25	533	180	44	500
310	11	2	25	540	130	35	300
311	14	4	34	541	170	43	490
320	14	4	34	542	220	57	700
321	7	5	46	543	280	90	850
				444	350	120	1000
400	13	3	31	550	240	68	750
401	17	5	46	551	350	120	1000
410	17	5	46	552	540	180	1400
411	21	7	63	553	920	300	3200
				554	1600	640	5800
				555	> 2400	-	-

II. Probas bioquímicas

	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Mycobacterium phlei</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Cryptococcus luteolus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Staphylococcus equorum</i>
Catalasa															
Oxidasa															
Indol															
Xelatinasa															
Almidón															
Citrato															
V/P															
Roxo de Metilo															
Fermentación azúcares															
Motilidad															
O/F															
KOH															
TSI															
Bilis-esculina															

III. Antibiograma

Tabla 2. Antibióticos y Diámetros Críticos para Staphylococcus spp.

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina	10 unidades	€ 28	-	≥29
Oxacilina (S. Aureus)	1 µg	€ 10	11-12	≥13
(Estafilococos coagulasa negativos)	1 µg	€ 17	-	≥18
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	≥15
Teicoplanina	30 µg	€ 10	11-13	≥14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	€ 12	13-14	≥15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacin	10 µg	€ 12	13-16	≥17
Ciprofloxacina	5 µg	€ 15	16-20	≥21
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	€ 14	15-18	≥19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	€13	14-22	≥23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	€ 14	15-20	≥21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	€ 12	13-17	≥18
Rifampicina	5 µg	€ 16	17-19	≥20
Nitrofurantoina	300 µg	€ 14	15-16	≥17
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75µg	€ 10	11-15	≥16