

T
664.941
RIV



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS**

Programa de Tecnología en Alimentos

**INFORME DE PRACTICAS
PROFESIONALES**

**Previa a la Obtención del Título de:
TECNOLOGO EN ALIMENTOS**

**Realizado en :
EMPACADORA NACIONAL C.A. (ENACA)**


A U T O R A

Ruth Marjorie [Rivera Torres



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

PROFESOR GUIA:


Tecnlg Gina Solorzano

SEGUNDA REVISION:


Tecnlg. Ma. Fernanda Rosales

AÑO LECTIVO

1998 - 1999

Guayaquil - Ecuador

ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL
INSTITUTO DE TECNOLOGIAS

PROGRAMA DE TECNOLOGIA EN ALIMENTOS

INFORME DE PRACTICAS PROFESIONALES

PREVIO A LA OBTENCION DEL TITULO DE
TECNOLOGO EN ALIMENTOS



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

REALIZADO EN: EMPACADORA NACIONAL C.A.
(ENACA)

AUTOR: RUTH MARJORIE RIVERA TORRES

PROFESOR GUIA :

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gina Solorzano", written over a horizontal dashed line.

Tecnlg. Gina Solorzano

SEGUNDA REVISION:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Ma. Fernanda Rosales", written over a horizontal dashed line.

Tecnlg. Ma. Fernanda Rosales

AÑO LECTIVO

1998 1999

GUAYAQUIL - ECUADOR

Guayaquil , 18 de Enero de 1999.

MSc. María Fernanda Morales R.

Coordinadora del Programa de Tecnología en Alimentos

Yo, Ruth Marjorie Rivera Torres, egresada del Programa de Tecnología en Alimentos (PROTAL). Pongo a vuestra consideración el presente informe de prácticas Profesionales, realizadas en La Empacadora Nacional (ENACA C.A.) durante el periodo comprendido entre el 19 de Octubre de 1998 al 19 de Enero del presente año.

En espera de una acogida favorable me suscribo de usted.

Atentamente,



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS



RUTH RIVERA TORRES

C.I. 0912975968



CERTIFICACION

Certifico que la Srta. RUTH MARJORIE RIVERA TORRES con cédula de identidad número 091297596-8, realizó prácticas en el laboratorio de microbiología desde el 19 de Octubre de 1998 hasta el 19 de Enero de 1999. Mostrando en todo momento ser una persona responsable, honesta y capaz de realizar las tareas a ella encomendadas.

La Srta. RUTH RIVERA está en libertad de hacer uso de éste certificado de la mejor manera que a ella le pareciere.

ATENTAMENTE

Q.F. Mónica Arévalo R.
Jefe de Microbiología



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

DEDICATORIAS:

A MIS PADRES:

Que con amor y sacrificio supieron motivarme moral y materialmente para culminar mis estudios universitarios, obtener un título y así asegurarme una vida digna y clara en el futuro.

A MIS MAESTROS:

Mi sincero agradecimiento y admiración para mis maestros, quienes con nobleza y entusiasmo depositaron en mí, sus vastos conocimientos.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

INDICE

	Pags. #
Resumen	4
Introducción.....	5
Detalle del trabajo realizado.....	6
Descripción del proceso de producción de Camarón.....	7
Descripción del proceso de producción de Tilapia.....	9
Diagrama de flujo de camarón.....	11
Puntos de control.....	12
Determinaciones realizadas en el laboratorio:	
Recuento total de aeróbios	13
Coliformes totales.....	15
Coliformes fecales.....	17
Confirmación de Escherichia coli.....	19
Pruebas bioquímicas :	
Prueba de Indol.....	21
Prueba de Rojo de Metilo.....	23
Prueba de Vogues Proskaver.....	24
Prueba citrato sódico.....	25
Determinación de Salmonella.....	27
Pruebas bioquímicas para Salmonella:	
Prueba Urea.....	39
Prueba de Oxidasa.....	41
Prueba ONPG.....	41
Prueba Indol.....	42
Determinación de Vibrio cholerae.....	44
Pruebas bioquímicas para Vibrio cholerae:	
Prueba Agar triple azúcar hierro (TSI).....	48
Prueba Agar hierro dos azúcares.....	48
Prueba de la oxidasa.....	48
Prueba fermentación de carbohidratos.....	49
Determinación de staphylococos áureos.....	51
Análisis de agua :	
Coliformes totales.....	56
Coliforme fecales.....	57
Escherichia coli.....	57
Toma de muestras (SWABS) :	
Toma de muestras en superficies.....	58
Toma de muestras en cuchillos, bandejas y gavetas.....	58
Toma de muestras en manos del personal.....	58
Determinación de Aerobios totales (agua).....	59
Conclusiones y recomendaciones	60
Bibliografía	61
Anexos.....	62



RESUMEN

BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

Empacadora Nacional (ENACA C.A.), es una de las empresas líderes en la producción de camarón, peces y otros crustáceos.

La amplia experiencia, la incansable búsqueda de la excelencia en la calidad del producto y el servicio a los clientes, nos ha ubicado entre los cinco principales exportadores del Ecuador.

La empresa cuenta con 2 plantas: camarón y tilapia, cuyos procesos de producción se detallan brevemente más adelante.

El departamento de control de calidad es el encargado en controlar parámetros específicos como son textura, presencia de melanosis, etc.

ENACA, cuenta con un laboratorio de Microbiología donde desarrollé mis prácticas profesionales, éste laboratorio está equipado con los mejores materiales y equipos, necesarios para realizar todos los análisis correspondientes. Los análisis que se le realiza al producto son: Salmonella, Coliformes totales, Coliformes fecales, Staphylococos áureos, Vibrio cholerae, Aerobios totales.

Todos estos análisis se lo detalla ampliamente en el presente informe, también constan las labores realizadas en el laboratorio.

El laboratorio de Microbiología realiza un control en el producto terminado, así como también realiza un control de los materiales y equipos con los que se trabaja, de las superficies, del agua, y del hielo. El procedimiento para la toma de muestras y el análisis se lo detalla minuciosamente en este informe.

Finalmente se da a conocer las conclusiones y recomendaciones.

INTRODUCCION

Empacadora Nacional se inició en 1962 únicamente exportando camarón de mar, con el paso del tiempo fue cambiando su línea y ahora el 10% de las exportaciones corresponden al camarón de mar.

ENACA exporta sus productos (camarón y tilapia) a distintas partes del mundo entre las cuales están :

Japón, Estados Unidos y la Comunidad Europea.

Debido que los clientes son muy exigentes en cuanto a la calidad del producto, el laboratorio de Microbiología ocupa un lugar primordial dentro de la empresa, ya que estos países exigen rangos microbiológicos muy bajos según el análisis correspondiente.

El laboratorio de Microbiología realiza un estricto control en el producto terminado (después de congelado), también realiza el control de los materiales y equipos con los que se trabaja, de las superficies, del agua y del hielo.



1.0 DETALLE DEL TRABAJO REALIZADO

Durante los 3 meses de prácticas profesionales en el laboratorio de Microbiología, mi horario de ingreso era a las 8:30 y la hora de salida era las 17:00, durante todo este tiempo mis funciones fueron las siguientes:

1. preparación de los medios de cultivo (agares y caldos) utilizados para los diferentes análisis y su respectiva esterilización. Esterilización del material sucio.
2. Toma de muestras al producto terminado antes de la congelación o ya congelado. Esta fase consiste en la toma de 15 submuestras, cada una de 15 gramos aproximadamente por cada lote procesado.
3. Trituración y homogenización de las muestras para su posterior análisis .
4. Toma de muestras de agua de beber, hielo.
5. Análisis de agua y hielo: Aerobios totales, Coliformes totales, y Coliformes fecales, Escherichia coli.
6. Análisis : Aerobios totales, Coliformes totales, Coliformes fecales, E. coli, Vibrio cholerae, Staphylococos áureos y Salmonella, al producto (camarón y tilapia).
7. Toma de muestras en las áreas de trabajo (swabs = frotar) a los materiales y equipos como son: tablas, cuchillos, gavetas, cámara de congelación, etc. tanto en la planta de camarón, como en la planta de tilapia.

2.0 DESCRIPCION DEL PROCESO DE PRODUCCION.

2.1 PLANTA DE CAMARON.

2.1.1 RECEPCION DE CAMARON CRUDO.

El producto que entra a la planta puede ser de la pesca proveniente de cultivos marinos en camarones un 90% o de mar por barcos un 10%.

Generalmente el camarón de mar llega a la planta descabezado y el de camarones llega entero con cabeza. el producto al llegar a la planta es inspeccionado y las muestras de camarón son tomadas para las pruebas de control de calidad. Producto que no cumple con los estándares de aceptación es rechazado.

Los estándares de aceptación son los siguientes:

- * La temperatura máxima en el centro de gavetas es 5°C.
- * Descomposición no es aceptable.
- * Melanosis que llegan hasta la carne de la cola no es aceptable.
- * Producto sin hielo no es aceptable.
- * Producto transportado al descubierto no es aceptado.
- * Producto que contenga materias extrañas que no sea normal de una piscina de camarón será, rechazado.
- * Producto que ha sido tratado con químicos que ayudan a retener el agua o productos de limpieza serán rechazados.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

2.1.2. RECEPCION

Todo producto que entra a la planta es recibido en Cuarto de recepción y pasado a las tinas de recepción con agua y hielo para mantener la temperatura máxima permitida de 5°C.

Las aguas de las piscinas son cambiadas cada 4 horas, se revisa y se aumenta hielo cada 30 minutos. Los camarones que salen de la tina de recepción son pasados sobre la banda de inspección para remover cualquier material extraño. El producto es cogido en gavetas con huecos, que permiten drenar el producto antes de ser pesados.

El camarón con cabeza una vez pesado se lleva a las mesas de descabezado (si no son para empacar camarón con cabeza para Europa) y el producto descabezado pasa directamente a las clasificadoras.

2.1.3. CLASIFICACION Y EMPAQUE

El camarón que pasa a la clasificadora , llega primero por la tolva de recepción de la clasificadora, que esta a 5°C.

El camarón de mar, es separado por el color en las líneas de clasificación cuando sea necesario.

El camarón de cultivo es separado por especies y por color dentro de una misma variedad de acuerdo a las especificaciones comerciales y requerimientos del procesamiento.

Una vez clasificados, el camarón se empaqueta directamente en sus cajetas (5 lb., 2 Kg. etc.) con glaseado (agua helada) a una temperatura no mayor de 5°C.

El camarón que no puede ser clasificado en máquinas, es pasado a las mesas de clasificación manual, donde son clasificados en sus respectivos tamaños y puestos en sus cajetas. Y se les adiciona el glaseado.

2.1.4. CONGELACION Y ALMACENAMIENTO

Las cajetas son inmediatamente colocadas en congeladores de placas y/o túnel de congelación, donde se les congela a una temperatura de -18°C. o menor.

La congelación a -18°C se logra en 4 horas aproximadamente y luego el producto es empacado en los cartones en la pre - cámara, donde se mantiene la temperatura permitida de 5°C, luego son almacenadas en las cámaras de mantenimiento a -15° a -17°C.

2.1.5. PROCEDIMIENTOS ESPECIALES PARA EL CAMARON CON CABEZA

El camarón por su empaque con cabeza llega a la planta con un mínimo de metabisulfito de sodio (antioxidante) de 40 ppm. Durante su procesamiento el metabisulfito se mantiene a 80 ppm en las tinajas de recepción y en las tolvas de las clasificadoras.

El camarón con cabeza será empacado de acuerdo a las especificaciones en las etiquetas de los clientes europeos o será empacado en cajetas con sus etiquetas apropiadas para metabisulfito de sodio si es para el mercado norteamericano.

No se utiliza el agua de glaseado para el camarón con cabeza.

La temperatura de congelación es de -20°C y el almacenamiento es a -17°C .

2.1.6. PROCEDIMIENTOS ESPECIALES PARA EL CAMARÓN PELADO

El producto pelado, o cortes mariposas, es llevado directamente en carros con hielo y entregado a las mesas especiales de las máquinas clasificadoras, y el camarón se mantiene en agua helada que no exceda los 5°C .

El producto pelado es transportado con hielo a la máquina de IQF. Y también se lo glasea.

2.2 PLANTA DE TILAPIA

2.2.1. RECEPCION

El producto que entra a la planta puede ser proveniente de la tilapia pescada en los lagos o represas, o de los cultivos realizados en las piscinas. Físicamente la tilapia puede llegar de dos maneras:

1. Vivas
2. Muertas

Peces vivos se van para filetes frescos.

Peces muertos sin rigor mortis para IQF y con rigor mortis para la venta local.

Los estándares de aceptación para muertos son:

- * Temperatura máxima interna de la tilapia es 5°C .
- * Descomposición no es aceptable
- * Producto sin hielo no es aceptable.
- * Producto que contenga materia extraña que no sea normal de una piscina de tilapias, será rechazado.
- * Producto que haya sido tratado con químicos será rechazado.

Los estándares de aceptación para vivos (vivos, sanos y activos) son:

Todo pescado entero que entra a la planta es desinfectado con cloro a 500 ppm en una tina que contiene agua y hielo.

El producto es recibido al área de pesado por una ventana, donde es recibido en gavetas limpias. Después del pesado :

- a) Filetes: las tilapias entran a la tolva descamadora.
- b) Entero: las tilapias en gavetas con hielo pasan a ser desvicerado.

El pescado ya descamado pasa a las mesas de fileteo, en donde se separa el espinazo y queda el filete con piel, luego el filete es llevado al despellejado. El despellejado se lo realiza con una máquina. El filete sin piel es puesto en gavetas. Cada gaveta lleva de 10 a 15 lb. de filete y hielo. Luego son pasadas al área de maquillaje por una ventana.

2.2.2. AREA DE MAQUILLAJE

En esta parte se procede al retiro de la grasa de los costados. El producto ya maquillado es colocado en canastas pequeñas con hielo que son pasadas a las mesas de clasificación y empaque.

2.2.3. AREA DE CLASIFICACION

Los filetes son clasificados individualmente de acuerdo a su peso y puestos en canastas. Las canastas de filete clasificado deberán pesar no más de 15 lb. cada una. Los filetes son enjuagados en una gaveta con agua helada a 50 ppm de cloro para ayudar a desengrasar.

PESCADO FRESCO

Una vez clasificado, se le lleva en gavetas a una tina con agua y hielo a una temperatura no mayor de 5°C. con una solución de cloro para una desinfección antes del empaque.

El producto fresco se guarda en doble funda plástica en un cartón. En cada cartón master hay 50 lb. de producto. Los cartones pasan a la cámara de mantenimiento a -15°C temporalmente hasta ser enviados a su destino final.

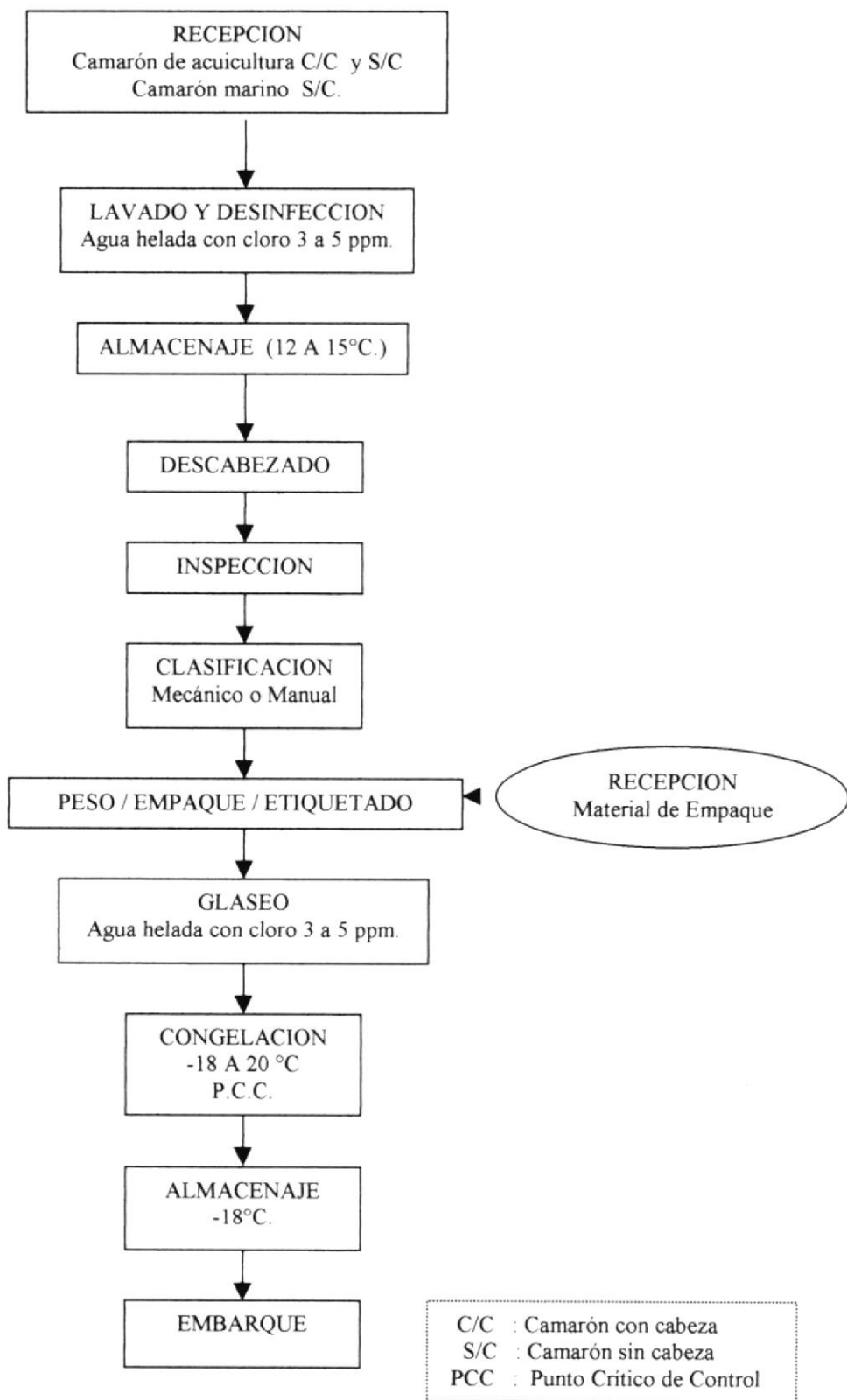
2.2.4. EMBARQUE DE CONTENEDORES

Los contenedores refrigerados se colocan directamente fuera de la cámara de mantenimiento y los cartones “master” son transferidos directamente al contenedor.



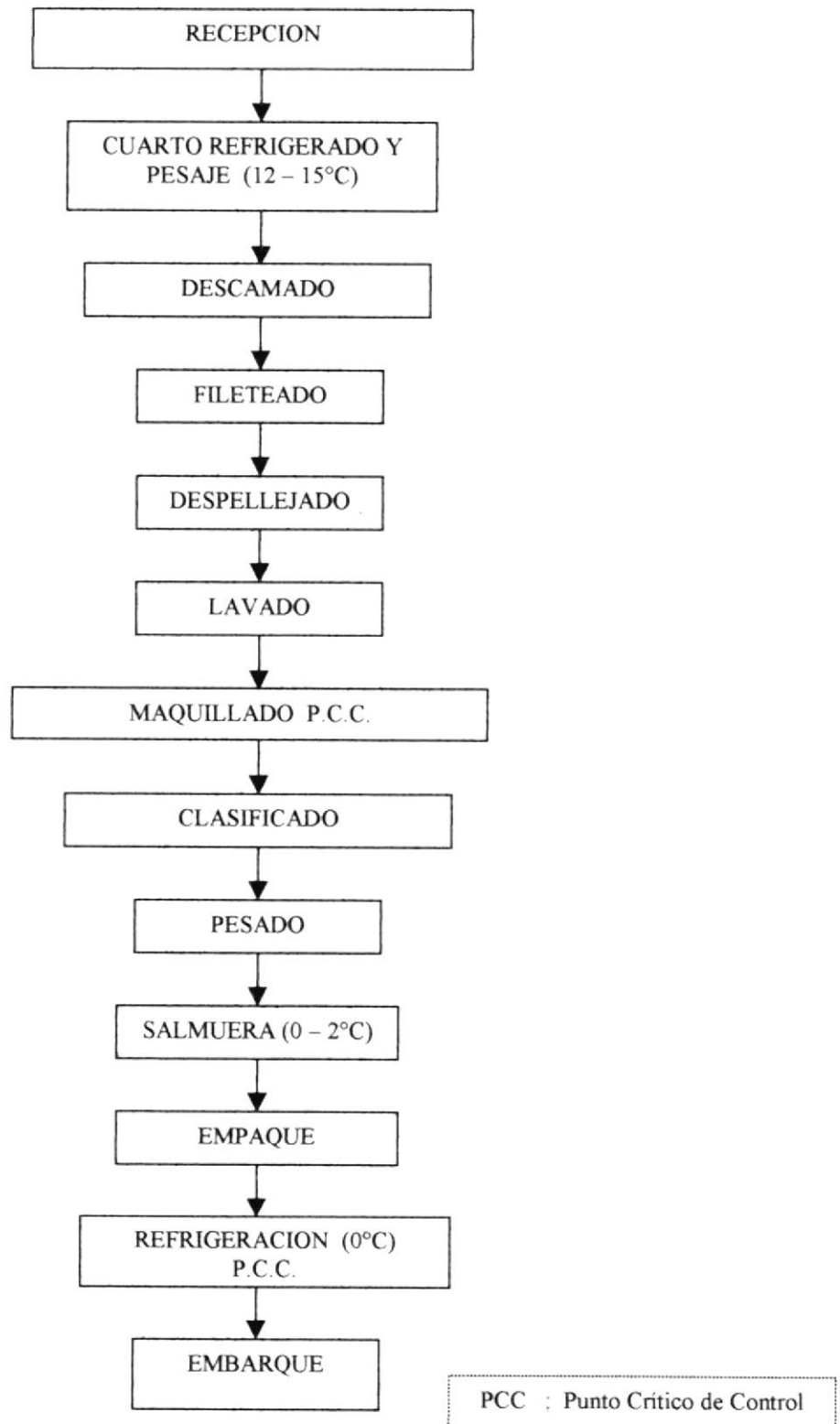
3.0 DIAGRAMA DE FLUJO.

Camarón Crudo Congelado Block



3.0 DIAGRAMA DE FLUJO.

Tilapia – Filete Refrigerado



4.0. PUNTOS DE CONTROL

El punto en el que el Laboratorio de Microbiología realiza el control es en el producto terminado o en IQF (después de congelación).

También realiza el control de los materiales y equipos con los que se trabaja, de las superficies, del agua y del hielo.

Se hace la recolección continua y representativa de muestras y monitores para:

- a) *Salmonella*, *Vibrio* cólera, *Escherichia coli*, *Stafilococcus aureus* coagulasa positivo, conteo total de aerobios en producto crudo.
- b) Bacterias Coliformes en el agua potable y glaseado.
Las muestras se recogen en las diferentes tomas de agua y de glaseado del área del empaque y del IQF.
- c) Recuento total de aeróbicos en máquinas, equipos y superficies.

Recuento total de aerobios para Swabs:

Los puntos donde se toman las muestras para Swabs y la frecuencia de la recolección de muestras de los equipos de procedimiento son los siguientes:

Muestras semanales:

- * La banda de selección del tanque de recepción.
- * Gavetas recibiendo el camarón de la banda de selección.
- * Gavetas recibiendo el camarón de las mesas de descabezado
- * Gavetas recibiendo el camarón de las máquinas clasificadoras
- * Las mesas de pelado.
- * Las mesas de descabezado.
- * Todos los equipos de clasificación
- * Las mesas de empaque individual
- * La línea de IQF
- * Pisos y superficies
- * Cajetas y fundas plástico en lugar de uso
- * Fundas plásticas para IQF.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

Personal de planta :

Se realizan swabs de las manos de los empleados, a intervalos semanales. El monitoreo es para recuento total de aeróbicos.

4.1. ESTANDARÉS MICROBIOLÓGICOS

Producto terminado:

- 1 Escherichia coli : < 3,6 NMP/gr.
- 2 Estafilococos áureos : < 10.000 UFC/gr.
- 3 Salmonella : ausencia /25gr.
- 4 Vibrio cholerae : ausencia /25gr.

5.0. DETERMINACIONES REALIZADAS EN EL LABORATORIO

5.1. RECUENTO TOTAL DE AEROBIOS

Esta determinación permite obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos y resulta adecuada cuando se desea poner de manifiesto el origen de la contaminación durante el proceso de elaboración de los alimentos.

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Pipetas estériles
- Cajas petri
- Baño de María
- Mechero
- Incubadora
- Stomacher
- Fundas Stomacher
- Balanza.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Pesar 25 gramos de muestra en fundas Stomacher, adicionar 25 ml. de agua tamponada y homogenizar en el equipo Stomacher por 2 minutos (dilución 1/10).

Prácticas Profesionales

- 2) Prepare una serie de diluciones en un tubo que contiene 18 ml. de agua tamponada, adicionar 2 ml. de la dilución 1/10 y así obtenemos la dilución 1/100 (10^2).
- 3) De la dilución 1/100 (10^2), adicionar 2 ml. a otro tubo que contiene 18 ml de agua tamponada y así obtenemos la dilución 1/1000 (10^3).
- 4) De la dilución 1/100 (10^2), pipetear 1 ml y colocarlos a las cajas petri (10^2). Lo mismo hago con la dilución 1/1000.
- 5) Verter sobre las placas de 10-15 ml de medio de cultivo PCA (Plate – Count – Agar) enfriado a una temperatura de 47°C.
- 6) Mezclar suavemente moviendo la placa varias veces en un sentido y otras tantas veces en el sentido contrario.
- 7) Dejar solidificar y llevar las placas a incubar en posición invertida.
- 8) Incubar por 48 horas a 35°C.
- 9) Contar el número de colonias que hayan crecido en el medio, solamente en aquellas placas que contengan de 25 – 250 colonias.
- 10) El recuento de colonias por gramo de alimento se calcula multiplicando el número de colonias contadas por el factor de dilución de la placa. (UFC/g).

MEDIOS DE CULTIVO

AGUA TAMPONADA (butterfields phosphate - buffered dilution water)

Para el enriquecimiento previo no selectivo de bacterias, a partir de alimentos y otros materiales.

FORMA DE ACTUACION

El agua tamponada provoca alta cuota de sobrevivencia de bacterias. El tampón de fosfato ha sido previsto con el fin de evitar una alteración del pH que pudiere perjudicar a las bacterias.

COMPOSICION :

- $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 30 gramos
- Agua destilada 1000 ml.

Esterilizar por 15 minutos a 121°C. Consérvese en refrigeración.

PREPARACION :

Disolver 34 gramos en 1000 ml. de agua destilada.

PLATE – COUNT – AGAR (PCA)

Medio de cultivo exento de sustancias inhibitoras y de indicadores, concebido predominantemente para la determinación del número total de gérmenes en productos alimenticios, aguas y otros materiales.

COMPOSICION (g/lt.) :

-	Triptona o peptona	5
-	Extracto de levadura	2,5
-	Glucosa	1,0
-	Agar – agar	12,0

PREPARACION :

Disolver 22,5 gramos por litro de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C. por 15 minutos. Enfriar a 45 – 47 °C.

EJEMPLO :

MUESTRA : **Camarón pelado.**

$$2 \times 10^2 = 200 \text{ UFC/g.}$$

UFC = unidades formadoras de colonias.

5.2. COLIFORMES TOTALES. (Técnica del Número más Probable. “NMP”)

Esta denominación se la da a los microorganismos en forma de bastones Gram – negativos, móviles e inmóviles, aeróbicos y anaerobios facultativos no esporulados que fermentan la lactosa en presencia de sales biliares con formación de ácido y gas.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Pipetas estéril
- Mechero
- Incubadora
- Stomacher
- Balanza
- Fundas Stomacher
- Gradillas.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Pesar 25 gramos de muestra, adicionar 225 ml de agua tamponada y homogenizada por 2 minutos en el equipo Stomacher. (dilución 1/10).
- 2) De la dilución 1/10 (10^1) pipetear 1 ml. y adicionar a los tres primeros tubos que contienen 10 ml de caldo laurilsulfato. (10^1).
- 3) De la dilución (1/10) pipetear 2 ml y pasar a un tubo que contiene 18 ml de agua tamponada y así obtenemos la dilución 1/100 (10^2). De ésta nueva dilución pipetear 1 ml y adicionar a la segunda serie de 3 tubos que contengan el caldo lauril – sulfato.
- 4) De la dilución 1/100 (10^2) pipetear 2 ml. y adicionar a un tubo que contenga 18 ml de agua tamponada y así obtenemos la dilución 1/1000 (10^3). De ésta nueva dilución pipetear 1 ml. y adicionar a la tercera serie de 3 tubos que contengan el caldo lauril – sulfato.
- 5) Incubar los tubos a 35°C. por 48 horas.
- 6) Pasadas las 24 horas, anotar los tubos que muestren producción de gas.
- 7) Pasadas las 48 horas anotar los tubos que muestren producción de gas y ver los resultados en la tabla del número más probable (NMP).

MEDIO DE CULTIVO

CALDO : LAURIL – SULFATO

Medio de cultivo selecto para el ensayo previo orientativo de coliformes y para el enriquecimiento selectivo de los mismos, en la investigación de aguas, productos lácteos y alimentos.

FORMA DE ACTUACION

Debido a su elevada calidad nutritiva y al tampón de fosfatos que contiene este medio de cultivo se, garantiza el rápido crecimiento y la intensa formación de gas incluso en el caso de coliformes que fermenten lentamente la lactosa. La formación de gas puede detectarse con campanas de fermentación. El contenido en lauril – sulfato inhibe notablemente el crecimiento de la flora acompañante indeseable.

COMPOSICION (g/lt.) :

- Triptosa	20,0
- Lactosa	5,0
- Cloruro sódico	5,0
- Lauril-sulfato sal sódica	0,1



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

Prácticas Profesionales

- Hidrogenofosfato dipotásico 2,75
- Hidrogenofosfato potásico 2,75

PREPARACION :

Disolver 35,5 g/lt. , distribuir en tubos de ensayo provistos de campanas DURHAM y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C).

EMPLEO E INTERPRETACIÓN :

Formación de gas en las campanas DURHAM, son positivos.

NOTA : Si no hay formación, son negativos y estos tubos se descartan.

EJEMPLO :

MUESTRA : **Camarón sin cabeza.**

TUBOS QUE PRESENTAN FORMACION DE GAS Y ENTURBIAMIENTO			
DILUCION	10 ¹	10 ²	10 ³
SERIE DE 3 TUBOS DE CADA DILUCION	3	1	0

Con éste dato (3,1,0) busco en al tabla del Número más Probable y observamos que el resultado es 43 NMP.(ver tabla en anexo #2).

5.3. COLIFORMES FECALES

Este análisis tiene como objeto diferenciar los coliformes de origen fecal (procedentes del intestino de los animales de sangre caliente) de los coliformes de otros orígenes.

MEDIO DE CULTIVO UTILIZADO: (E.C.)

PROCEDIMIENTO :

- 1) Tomar los tubos de caldo lauril sulfato triptosa gas positivos, procedentes del método de coliformes totales.

Prácticas Profesionales

- 2) Inocular con una azada de caldo de cada uno de los cultivos seleccionados en tubos de caldo E.C.
- 3) Incubar los tubos de caldo E.C. a 44,5°C. y ver si son positivos de formación de gas a las 24 y a las 48 horas.
- 4) Los tubos de caldo E.C. que presentan gas, son positivos de organismos coliformes de origen fecal.
- 5) Anotar los tubos positivos y buscar en la tabla del número más probable (NMP).

CALDO E.C.

Para la demostración selectiva de coliformes y de *Escherichia coli* en aguas, alimentos y otros materiales.

Con el caldo E.C. se han realizado experiencias positivas en la investigación de agua de mar y crustáceos y en la investigación de alimentos congelados.

FORMA DE ACTUACION

En tanto que el contenido en lactosa, favorece a las bacterias lactosa – positivos, especialmente coliformes y *E. coli* las sales biliares, inhiben notablemente el crecimiento de gérmenes Gram – positivos o de especies microbianas no adaptadas al medio ambiente intestinal. Los gérmenes lactosa – positivos consumen lactosa, con producción de gas.

COMPOSICION (g/lit.) :

- Peptona de caseína	20,0
- Lactosa	5,0
- Mezcla de sales biliares	1,5
- Cloruro sódico	5,0
- Hidrogenofosfato dipotásico	4,0
- Dehidrogenofosfato potásico	1,5

PREPARACION :

Disolver 37 g/lit. o bien 74 g/lit., distribuir en tubos provistos de campanas DURHAM y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

El caldo preparado y distribuido es claro y amarillento.

EMPLEO E INTERPRETACION:

Formación de gas a 45,5 °C.(y a 37°C)	Escherichia coli, eventualmente junto con coliformes.
Formación de gas solo a 37°C.	Coliformes sin presencia de E. coli.

EJEMPLO :

MUESTRA : Camarón sin cabeza

TUBOS QUE PRESENTAN FORMACION DE GAS Y ENTURBIAMIENTO			
DILUCION	10 ¹	10 ²	10 ³
SERIE DE 3 TUBOS DE CADA DILUCION	0	0	1

Con este dato (0,0,1), se busca en la tabla del número más probable (NMP) y se observa que el resultado es 3,0 NMP. (ver anexo #2).

5.4. CONFIRMACION DE ESCHERICHIA COLI.

De todos los coliformes, el más representativo importante es Escherichia coli. La E. coli pertenece a la familia de las Enterobactereaceas, puede ser móvil con flagelo periférico o inmóvil.

La glucosa, lactosa y otros carbohidratos son fermentados con la formación de piruvato al cual más adelante es convertido a ácido láctico, acético y fórmico. Parte del ácido fórmico es degradado por un complejo del sistema hidrogenasa a cantidades de CO₂ y H₂O. Es oxidasa y ureasa negativo y no produce SH₂.

La identificación de E. coli se inicia con la realización del examen completo para coliformes acompañado de pruebas bioquímicas del Indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y Citrato (prueba IMVIC).

PROCEDIMIENTO :

- 1) De los tubos de E. C. positivos sembrar en agar EMB por 18 – 24 horas a 35°C. por estrias.
- 2) De las colonias típicas de E. coli (ver cuadro) se las siembra por estria en tubos que contienen agar PCA (inclinado). Para de ésta manera mantener su crecimiento y poder realizarles las pruebas bioquímicas.
- 3) Incubar por 18 – 24 horas a 35°C.
- 4) Realizar pruebas bioquímicas.

MEDIO DE CULTIVO

EMB : (Agar eosina azul de metileno)

Agar selectivo para demostración y aislamiento de Enterobactereaceas patógenos.

FORMA DE ACTUACION

El contenido de lactosa y sacarosa hacen posible la distribución de Salmonella y Shigella. Los gérmenes de acompañamiento indeseable como bacterias Gram – positivas y los microorganismos fermentadoras de glucosa especialmente resultan notablemente inhibidos gracias a la presencia, de colorantes presentes en la formulación.

COMPOSICION g/lt. :

- Peptona de caseína
- Potasio dihidrogenofosfato
- Lactosa
- Sacarosa
- Eosina
- Azul de metileno
- Agar – agar.

PREPARACION :

Disolver 36 gramos en 1 litro de agua destilada, esterilizar en autoclave a 121°C. por 15 minutos. Verter en placas y dejar solidificar.

EMPLEO E INTERPRETACION

COLONIAS	POSIBLES MICROORGANISMOS
Transparentes y de color ambar	Shigella o Salmonella
Verdosa con brillo metálico reflejado a la luz y el centro negro azulado a la luz transmitida.	Escherichia coli
Más grande que la Escherichia coli.	Enterobacter, Klebsiella y otros.

5.4.1 PRUEBAS BIOQUIMICAS :

INDOL-ROJO DE METILO-VOGUES PROSKAUER Y CITRATO (IMVIC).

a) PRUEBA : INDOL.

Para demostrar la producción microbiana de indol en la identificación bioquímica de los microorganismos.

MATERIALES Y EQUIPOS :

- Pipetas estériles
- Mechero
- Aza de platino
- Incubadora

PROCEDIMIENTO :

- 1) De los tubos de agar PCA inclinados, tomamos una muestra con aza de platino.
- 2) Inocular en agua de triptona
- 3) Incubar a 37 °C. por 24 horas.
- 4) Adicionar el agua de triptona 0,2 – 0,3 ml. del reactivo de Kovac's y agitar, esperar 10 minutos y observar los resultados.



COLOR	RESULTADO
Rojo oscuro en la superficie del agua de triptona.	Positivo
Naranja	Negativo (presencia de escatol)

MEDIO DE CULTIVO

AGUA DE TRIPTONA

FORMA DE ACTUACION :

La peptona de caseína contiene una elevada proporción de triptófano la cual es degradada por los microorganismos indol positivo, como la E. coli produciéndose indol.

La producción de indol se comprueba mediante el reactivo de Indol, según Kovac's.

COMPOSICION (g/lt.) :

- Peptona de caseína 10,0
- Cloruro de sodio 5,0

PREPARACION :

Disolver 15 gramos en 1 litro de agua destilada. Dispensar en tubos 5 ml y esterilizar 121°C. por 15 minutos.

REACTIVO DE KOVAC'S.

Para demostración del Indol producido microbiológicamente para la identificación de microorganismos Indol positivo e Indol negativo, según Kovac's.

FORMA DE ACTUACION :

Diversos microorganismos son capaces de romper el triptófano, dando ácido pirúvico, amoníaco e indol, éste último reacciona con el 4 -dimetil-aminobenzaldehído dando una coloración rojo oscuro.

El triptófano da una reacción colorada con el 4 - dimetilaminobenzaldehído es necesario de una separación del indol, esto se consigue con el Butanol el cual extrae selectivamente el indol, ya que el indol es soluble en Butanol .



COMPOSICION g/lt :

- Acohol isoamílico 75 ml
- Acido clorhídrico 25 ml.
- Paradimetilaminobenzaldehído 5 gramos.

b) PRUEBA : ROJO DE METILO

Para diferenciación bioquímica del grupo Enterobactereaceas.

MATERIALES Y EQUIPOS.

- Pipetas estériles
- Aza de platino
- Mechero
- Incubadora

PROCEDIMIENTO :

- 1) De los tubos de agar PCA inclinados, tomamos una muestra con aza de platino.
- 2) Inocular en glucosa tamponada
- 3) incubar los tubos sembrados a 37°C. por 5 días.
- 4) Adicionar a los tubos 5 gotas de la solución rojo de metilo y agitar.
- 5) Resultados.

COLOR	RESULTADO
Rojo intenso	Positivo
Amarillo	Negativo.

MEDIO DE CULTIVO

CALDO GLUCOSA TAMPONADA

Medio de cultivo a usar para la realización de la prueba del rojo de metilo.

FORMA DE ACTUACIÓN:

Algunas bacterias usan glucosa para formar grandes cantidades de ácidos de tal manera que el valor del pH del medio baja a menos 4,4. Otras bacterias producen menos ácidos lo que reduce menos intensamente el pH del medio.

Esta distinción puede hacerse visible a través de la utilización del indicador rojo de metilo que presenta un color amarillo por encima del pH 5,1 y solamente presenta un color rojo cuando el pH baja 4,4.

COMPOSICION (g/lt.)

- Peptona universal 7
- Glucosa 5
- Fosfato dipotásico 5

PREPARACION :

Disolver 28 gramos en 1 litro de agua destilada, colocar 5 ml. a cada tubo y esterilizar en autoclave a 121°C. por 15 minutos.

ROJO DE METILO (Indicador)

PREPARAR:

- Rojo de metilo 0,1 gramos
- Alcohol etílico 300 ml
- Agua destilada 200 ml.

c) PRUEBA : VOGES PROSKAVER

Para la diferenciación bioquímica del grupo Enterobactereaceas.

MATERIALES Y EQUIPOS :

- Pipetas estéril
- Aza de platino
- Mechero
- Incubadora.

PROCEDIMIENTO :

- 1) De los tubos de agar PCA inclinado, tomamos una muestra con aza de platino
- 2) Inocular en caldo glucosa tamponada
- 3) Adicionar 0,5 ml de la solución δ . naftol y 0,8 ml de KOH a cada tubo.
- 4) Agitar los tubos y dejar en reposos de 2 – 4 horas
- 5) Observar los resultados

6) Resultados.

COLOR	RESULTADOS
Rojo carmesí	Positivo
Amarillo	Negativo

MEDIO DE CULTIVO

CALDO : GLUCOSA TAMPONADA

Medio de cultivo usado para la realización de la prueba Vogues Proskauer.

FORMA DE ACTUACION

Muchos microorganismos metabolizan la glucosa para producir acetoína, 2,3 butano-diol. La presencia de estos metabolitos se lo establecen con el resultado Vogues Proskauer.

PREPARACION DEL REACTIVO : VOGUES PROSKAUER.

- Solución de δ – naftol al 5% : disolver 5 gramos de naftol en 100 ml de alcohol absoluto.
- Solución de hidróxido de potasio al 40% : Disolver 40 gramos en 100 ml. de agua destilada estéril.

La solución δ – naftol debe prepararse el día de la prueba.

d) PRUEBA : CITRATO SODICO

Para la diferenciación bioquímica del grupo Enterobactereaceas. Y de ciertos hongos basados en el empleo de citrato como único medio de carbono.

MATERIALES Y EQUIPOS:

- Pipetas estériles
- Mechero
- Incubadora

PROCEDIMIENTO :

- 1) De los tubos de agar PCA inclinados, tomamos una muestra.
- 2) Sembrar por picadura y por estría en superficie inclinada, en agar citrato sódico.

3) Incubar a 37C. por 48 horas.

El crecimiento se manifiesta por el cambio de color de verde claro del medio al azul oscuro.

COLOR	RESULTADO
Azul oscuro	Positivo
amarillo	Negativo

MEDIO DE CULTIVO

AGAR CITRATO SIMMONS.

Medio de cultivo totalmente sintético para la identificación de microorganismos.

FORMA DE ACTUACION

El empleo de citrato por los microorganismos da lugar a una alcalinización del medio de cultivo lo que se manifiesta por un viraje azul oscuro del indicador de pH azul de bromotimol.

COMPOSICION (g/lt.) :

- Dihidrogenofosfato amónico 1,0
- Hidrógenofosfato dipotásico 1,0
- Cloruro sódico 5,0
- Citrato sódico 2,0
- Sulfato de magnesio 0,2
- Azul de bromotimol 0,08
- Agar – agar 13,0

PREPARACION :

Disolver 22,5 gramos en 1 litro de agua destilada, colocar en tubos y esterilizar a 121°C. por 15 minutos. Dejar enfriar en posición inclinada.

INTERPRETACION DE IMVIC.

INDOL	ROJO DE METILO	VOGUES PROSKAUER	CITRATO	COLIFORME
+	+	-	-	E. coli I
-	+	-	-	E. coli II
-	-	+	+	Enterobacter aerógenes I
+	-	+	+	Enterobacter aerógenes II
-	-	+	+	Enterobacter cloacae.

EJEMPLO : Escherichia coli

MUESTRA : Camarón sin cabeza.

PRUEBAS BIOQUIMICAS	DILUCION			RESULTADOS (tabla MNP)
	10 ¹	10 ²	10 ³	
INDOL	0	0	1	3
ROJO DE METILO	0	0	1	3



BIBLIOTECA DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

REPORTE : 3 MNP / g. (ver anexo # 2)

5.5. SALMONELLA

Género perteneciente a la familia de las Enterobactereaceas. Está integrado por microorganismos que forman colonias típicas sobre medios de cultivo selectivos sólidos y posee características bioquímicas y serológicas definidas. Gram - negativo, fermenta la glucosa con formación de gas, pero no fermentan la lactosa.

Los microorganismos del grupo Salmonella provocan intoxicación alimenticia mediante infección. Llegan a los alimentos directa e indirectamente desde los excrementos animales en el momento del sacrificio, desde excrementos humanos o de aguas putrefactas por descarga de alcantarillas.

MATERIALES Y EQUIPOS:

- ☐ Cajas petric
- ☐ Pipetas estéril
- ☐ Mechero
- ☐ Fundas stomacher
- ☐ Homogenizador stomacher
- ☐ Incubadora



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PROCEDIMIENTO:

5.5.1. PRE-ENRIQUECIMIENTO

- Pesar 25 g de muestra en fundas Stomacher y adicionar 225 ml. de Caldo de Lactosa. Homogenizar por 2 minutos en el equipo Stomacher.
- Incubar 24 horas a 35°C.

MEDIOS DE CULTIVO

CALDO : LACTOSA

Medio de cultivo exento de sustancias inhibitoras para el ensayo previo orientado de bacterias.

FORMA DE ACTUACION

La utilización de lactosa se demuestra por la formación de gas.

COMPOSICION:

- Peptona de gelatina	5,0
- Extracto de carne	3,0
- Lactosa	5,0

PREPARACION :

Disolver 13 gr. /lt. y esterilizar a 121 °C. por 15 minutos, en frascos con 225 ml. de caldo.

5.5.2. ENRIQUECIMIENTO

- Del pre-enriquecimiento con caldo Lactosa, sembrar 1 ml. a un tubo que contiene 10 ml. de caldo Selenito – Cistina, e incubar por 24 horas a 35°C.
- Del pre-enriquecimiento con caldo Lactosa, sembrar 1 ml. a un tubo que contiene 10 ml. de caldo Tetrionato e incubar por 24 horas a 35 °C.

MEDIO DE CULTIVO

CALDO DE ENRIQUECIMIENTO SELENITO

Para enriquecimiento selectivo de Salmonella, a partir de heces, orina, agua, alimentos, etc.

FORMA DE ACTUACION

El selenito inhibe el crecimiento de bacterias intestinales Coliformes y Enterococos, principalmente en las primeras 6 a 12 horas de incubación. Salmonella, Proteus y Pseudomonas no son inhibidos.

COMPOSICION (g/lt.) :

- Peptona de carne	5,0
- Lactosa	6,0
- Selenito sódico	4,0
- Hidrogenofosfato dipotásico	3,5
- Dihidrogenofosfato potásico	6,5

PREPARACION :

Disolver 23 g/lt. a temperatura ambiente. En caso necesario calentar brevemente como máximo a 60 °C. esterilizar por filtrado si se prevé un almacenamiento prolongado y distribuir en tubos.

No esterilizar en autoclave.

El caldo preparado es claro y ligeramente amarillento.

EMPLEO E INTERPRETACION

El material sólido sometido a ensayo se introduce en el caldo preparado. Si el material a ensayar fuere un líquido, mezclar en la proporción de 1:1 con un Caldo preparado a concentración doble de la anteriormente indicada.

CALDO DE ENRIQUECIMIENTO TETRATIONATO

Para el enriquecimiento selectivo de Salmonella, a partir de diversos materiales de investigación.

El medio de cultivo basal preparada puede almacenarse durante largo tiempo, pues el tetrionato no se sintetiza a partir del tiosulfato, hasta que se añade el compuesto de yodo antes del uso.

FORMA DE ACTUACION

El tetrionato, junto con el tiosulfato excedente, inhibe a Coliformes y otras bacterias acompañantes.

En cambio, todas las bacterias reductoras de tetrionato, como por ejemplo, Salmonella y Proteus pueden multiplicarse más o menos sin obstáculo. El ácido procedente de la reducción del tetrionato es neutralizado por el carbonato cálcico.

Las sales biliares inhiben considerablemente a todos los microorganismos de presencia no obligatoria en el intestino.

La adición de verde brillante sirve, sobre todo, para inhibir a la flora Gram-positiva. Dado que el medio de cultivo con verde brillante posee un efecto inhibitor muy intenso, resulta ventajoso a veces suprimir la adición de verde brillante a fin de obtener un rendimiento satisfactorio de Salmonella.

5.5.3. AISLAMIENTO

- De los dos medios de enriquecimiento (Selenito y Tetrionato), con aza de platino sembrar por agotamiento y por estría en los siguientes agares:
 - Bismuto Sulfito Agar (BSA)
 - Xilosa Lisina Desoxicolato Agar (XLD)
 - Agar para Enterobacteriaceas Hektoen (HEA)
- El agar Bismuto Sulfito (BSA) se deja incubar por 48 horas a 37°C.
- Los agares Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Hektoen (HEA) se incuban por 24 horas a 37°C.

MEDIO DE CULTIVO

BSA : AGAR BISMUTO SULFITO

Agar selectivo para aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras *Salmonellas*.

FORMA DE ACTUACION

El verde brillante y el Bismuto inhiben considerablemente a los gérmenes de acompañamiento. Las colonias de *Salmonella* H₂O positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismutos metálico produce brillo metálico alrededor de las correspondientes colonias.

COMPOSICION:

- | | |
|-------------------------------|-------|
| - Extracto de carne | 5,0 |
| - Peptona de carne | 10,0 |
| - D (+) glucosa | 5,0 |
| - Hidrogenofosfato disódico | 4,0 |
| - Sulfato ferroso | 0,3 |
| - Verde brillante | 0,025 |
| - Indicador bismuto – sulfito | 8,0 |
| - Agar – agar | 15,0 |

PREPARACION

Disolver 47,5 g/lit. verter en placas, en capa gruesa, el precipitado obtenido después de haberlo distribuido homogéneamente.

No esterilizar en autoclave.

Las placas con medio de cultivo, obligadamente turbias, deben presentar un color hasta verde pálido. En caso de coloración pardusca el medio de cultivo no es utilizable.

El medio de cultivo recién preparado es muy inhibitorio y, por este motivo, se recomienda su uso en casos de contaminación intensa. Por lo general el brillo metálico de las colonias aparece en este medio sólo al cabo de 48 horas. Tras un almacenamiento de 4 días a +4°C. el medio de cultivo pierde algo de su potencia inhibitoria, siendo entonces adecuado para la investigación de material ligeramente contaminado.

En este caso, el brillo metálico aparece ya al cabo de poco tiempo de incubación.

EMPLEO E INTERPRETACION

Sembrar finamente la superficie de las placas, por estría con el material objeto de prueba. Con frecuencia al cabo de 18 horas puede reconocerse ya un ennegrecimiento de las colonias de Salmonella pero todavía ningún brillo metálico. Dicho brillo metálico aparece algunas horas después, según lo antiguo que ya sea el medio de cultivo.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Centro negro, borde claro, precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias (ojo de conejo o de pez).	Salmonella, con excepción de S. para typhi A y B. Pollorum.
Pequeños, verdes hasta pardas, a veces mucosas	Bacterias Coliformes, Serratia, Proteus, y otros.

AGAR XLD: (Agar – xilosa – lisina – desoxicolato).

Para el aislamiento y diferenciación de Enterobacteriaceas patógenas especialmente de especies de Shiguella y Salmonella.

En combinación con un enriquecimiento adecuado, con el agar XLD se puede detectar un número notablemente mayor de Salmonellas y Shiguellas que con otros medios de cultivo.

FORMA DE ACTUACION

La degradación a ácido de la xilosa, lactosa y sacarosa produce un viraje a amarillo del rojo de fenol.

El tiosulfato y la sal de hierro III revelan, la formación de ácido sulfhídrico por la precipitación de sulfuro de hierro negro en las colonias. Las bacterias que descarboxilan la lisina, produciendo cadaverina, se reconocen por la presencia de un color rojo purpúreo, debido al aumento del pH alrededor de sus colonias.



Varios de estas reacciones pueden presentarse simultáneamente o sucesivamente, lo que puede dar lugar a diversos matices de color del indicador de pH, o a un viraje de amarillo a rojo en el transcurso de una incubación más prolongada.

COMPOSICIÓN (g/lt) :

-	Extracto de levadura	3,0
-	Cloruro sódico	5,0
-	D (+) xilosa	3,5
-	Lactosa	7,5
-	Sacarosa	7,5
-	L (+) lisina	5,0
-	Desoxicolato sódico	2,5
-	Tiosulfato de sodio	6,8
-	Citrato de amonio y hierro III	0,8
-	Rojo fenol	0,08
-	Agar – agar	13,5

PREPARACION

Disolver 55 g/lt. rápida, totalmente y verter en placas. No esterilizar en autoclave.

Las placas con medio de cultivo son de color rojo y casi siempre claras.

EMPLEO E INTERPRETACION

Sembrar el medio de cultivo en superficie, por estría en capa fina.

Incubar por 48 horas a 37°C.

COLONIA	MICROORGANISMOS
Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas, halo de precipitación	Escherichia coli, Enterobacter, Aeromonas.
Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas, mucosas, halo de precipitación.	Klebsiella.
Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas, a veces con centro negro.	Citrobacter (cepas lactosa – positivo)
Amarillas, con zona amarilla alrededor, opacas.	Serratia, Hafnia.
Amarillas, con zona amarilla alrededor, transparentes, centro negro.	Proteus vulgaris, la mayoría de Proteus mirabilis.
Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes, a veces, con centro negro.	Salmonella
Del mismo color que el medio de cultivo, transparentes.	Shiguella, Providencia, Pseudomonas.
Anaranjadas, ligeramente opacas	Salmonella typhi (cepas xilosa – positivas)

HEA : Agar para enterobacteriáceas de HEKTOEN

Agar selectivo para la demostración y aislamiento de bacterias intestinales patógenas, inclusive Shiguella, a partir de los más diversos materiales.

FORMA DE ACTUACION

Debido a los dos indicadores, azul de bromotimol y fucsina ácido, las colonias lactosa – positivo muestran una expresiva diferencia cromática frente a las colonias lactosa – negativas. Igual ocurre en el caso de colonias que fermentan lentamente la lactosa y más fácilmente fermentable lo que impide hallazgos de patógenos falsamente positivos.

Prácticas Profesionales

La combinación de tiosulfato, como sustancia reaccionante, y una sal de hierro como indicador, de una coloración negra a las colonias H₂S positivas. Una mezcla de sales biliares inhibe a una gran parte de la flora acompañante.

COMPOSICION (g/lt) :

-	Peptona	15,0
-	Cloruro de sodio	5,0
-	Extracto de levadura	3,0
-	Sacarosa	14,0
-	Lactosa	14,0
-	Salicina	2,0
-	Tiosulfato sódico	5,0
-	Citrato de amonio y hierro III	1,5
-	Mezcla de sales biliares	2,0
-	Azul de bromotimol	0,05
-	Fucsina ácida	0,08
-	Agar – agar	13,5



BIBLIOTECA
ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PREPARACION

Disolver totalmente 75 g/lt. no esterilizar en autoclave.

Las placas con medio de cultivo son claras y de color azul – verdoso.

EMPLEO E INTERPRETACION

Sembrar finamente, por estría, la superficie del medio de cultivo como material procedente de un cultivo de enriquecimiento.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Verdes, húmedas, planas, transparentes.	Shiguella, Providencia.
Verde – azuladas, con o sin centro negro.	Salmonella, Paracolobactrum, Proteus.
Verdes hasta azuladas planas, borde irregular.	Pseudomonas
De color salmón con halo de precipitado.	Coliformes.

5.5.4. IDENTIFICACION

✧ Seleccionar 2 o más colonias típicas de cada uno de los agares anteriormente mencionados y sembrar en superficie , y fondo los agares: Hierro 3 azúcares (TSI) y lisina hierro (LIA) inclinados.

✧ Incubar por 24 – 48 horas a 35°C.

TSI (Triple Sugar Iron Agar)

Para identificación de Enterobactereaceas.

FORMA DE ACTUACION

La degradación del azúcar, con formación de ácido, se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de fenol que vira de anaranjado – rojizo a amarillo o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro (negro).

COMPOSICION (g/lt.) :

-	Peptona de caseina	15,0
-	Peptona de carne	5,0
-	Extracto de carne	3,0
-	Extracto de levadura	3,0
-	Cloruro sódico	5,0
-	Lactosa	10,0
-	Sacarosa	10,0
-	D (+) – glucosa	1,0
-	Amonio de hierro III	0,5
-	Citrato Tiosulfato sódico	0,3
-	Rojo de fenol	0,024
-	Agar – agar	12,0

PREPARACION :

Disolver 65 g en 1 litro de agua destilada, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave 121°C por 15 minutos. Dejar solidificar en posición inclinada de forma que, sobre una columna de unos 3 cm de altura se forma una superficie oblicua, elíptica de unos 5 cm de diámetro mayor.

EMPLEO E INTERPRETACION

Letras y signos utilizados en el cuadro:

- A = Viraje a rojo, por formación de álcali.
- OA = Sin alteración del color original del medio de cultivo o rojo por formación de álcali
- S = Viraje a amarillo, por formación de ácido
- SG = Viraje a amarillo y producción de gas.
- + = Ennegrecimiento, por formación de H₂S .
- = Ausencia de ennegrecimiento.

MICROORGANISMO	MEDIO DE CULTIVO		FORMACION DE H ₂ S	FONDO	SUPERFICIE INCLINADA
	Columna Vertical	Superficie inclinada			
S. typhi	S	OA	+ solamente en la parte de la columna vertical, frecuentemente formación de anillo eventualmente sólo al cabo de 48 h.	Amarillo: fermentación de glucosa.	Amarillo : lactosa y/o sacarosa fermentada
S. paratyphi A	SG	OA	-	Rojo o sin cambio del color del medio de cultivo: no hay fermentación de glucosa.	Rojo o sin cambio de color original : ni lactosa, ni sacarosa fermentada.
S. paratyphi B	SG	OA	+		
E. coli	SG	S	-	Burbujas o grietas : gas a partir de glucosa.	
Citrobacter					

LIA

Agar lisina - hierro.

Agar de ensayo para la demostración simultánea de lisina descarboxilasa (LD) y de la formación de ácido sulfhídrico (H₂S) para la identificación de Enterobactereaceas, sobre todo Salmonella, sobre todo Salmonella y Arizona.

FORMA DE ACTUACIÓN

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD-positivos, que la transforman en la amina cadaverina. Esto produce un viraje al violeta del indicador de pH púrpura de bromocresol. Puesto que la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6,0), es necesario que se produzcan, previamente la acidificación del medio de cultivo, por fermentación de la glucosa. por éste motivo, éste motivo, este medio de cultivo sólo puede utilizarse para la diferenciación de cultivo que fermentan la glucosa.

Los microorganismos LD-negativos, pero fermentadores de la glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad a del medio de cultivo. La incubación prolongado puede ocasionar una alcalinización en la zona de la superficie del medio de cultivo y en consecuencia, se produce un viraje al violeta. La formación de H₂S produce una coloración negra debido al sulfuro de hierro producido.

COMPOSICION (g/lit.) :

-	Peptona de carne	5,0
-	Extracto de levadura	3,0
-	D (+) glucosa	1,0
-	L-lisina monoclóhidrato	10,0
-	Tiosulfato sódico	0,04
-	Citrato de amonio y hierro III	0,5
-	Púrpura de bromocresol	0,02
-	Agar - agar	12,5



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PREPARACION

Disolver 32 g/lit., distribuir en tubos y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121°C.). Dejar enfriar en posición inclinada de forma que, al solidificarse se produzca una columna de unos 3 cm. de altura, y sobre ella, una superficie inclinada de por lo menos, la misma longitud.

Prácticas Profesionales

El medio de cultivo preparado es claro y de color gris violeta.

EMPLEO INTERPRETACION

Este medio nutritivo se siembra con el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente.

MICROORGANISMOS	COLOR DEL MEDIO DE CULTIVO		FORMACION DE H ₂ S
	COLUMNA VERTICAL	SUPERFICIE INCLINADA	
<i>Salmonella</i>	violeta	violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	amarillo	pardo – rojizo	+
<i>Proteus vulgaris</i>	amarillo	pardo – rojizo	+
<i>Citrobacter</i>	amarillo	violeta	+
<i>Escherichia</i>	amarillo	violeta	-

- * Excepción : *Salmonella paratyphi* A (sin formación de lisina)
descarboxilasa, columna vertical = amarillo.
Superficie inclinada = violeta.

5.5.5. PRUEBAS BIOQUIMICAS

a) PRUEBA UREA

- ✧ De los tubos que se presume sea *Salmonella* positivo, sembrar por azada en caldo urea.
- ✧ Incubar por 24 horas a 37°C.
- ✧ Los tubos de caldo urea si son de color púrpura rojo son positivos para otras bacterias y no para *Salmonella*.
- ✧ Los tubos de caldo urea si son de color amarillo pueden ser *Salmonella* y se los confirma con los antisueros de *Salmonella* O y H.

CALDO UREA

Medio de cultivo de diferenciación para la demostración de microorganismos que utilizan urea.

FORMA DE ACTUACION

En éste medio de cultivo sólo pueden crecer aquellos microorganismos que, como por ejemplo Proteus, son capaces de utilizar urea como única fuente de carbono. Ha sido recomendado para la diferenciación de Proteus y Salmonella, y además es utilizable también para la diferenciación de bacilos y sarcinas. Los gérmenes que utilizan urea producen un viraje del indicador hacia el rojo y eventualmente su crecimiento produce turbidez del medio de cultivo.

COMPOSICION (g/lt.) :

-	Extracto de levadura	0,1
-	Dihidrógenofosfato potásico	9,1
-	Hidrógenofosfato disódico	9,5
-	Urea	20,0
-	Rojo de fenol	0,01



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PREPARACION

Disolver 38,5 g/lt. calentando, en caso necesario a 60°C como máximo. Esterilizar por filtración.

No esterilizar en autoclave.

El caldo distribuido es claro y de color amarillo – rojo.

Si no fuera posible la esterilización por filtración, o de otra manera, deberá sembrarse inmediatamente después de su preparación.

EMPLEO E INTERPRETACION

MEDIO DE CULTIVO	MICROORGANISMOS
Rojo	Urea – positivos : Proteus (P. vulgaris, P. mirabilis). Morganella, Rettegerella y otros.
Amarillo	Urea – negativos o débilmente positivos : Shiguella, Escherichia, Salmonella, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia y otros.

b) PRUEBA DE OXIDASA

La citocromooxidasa es una enzima muy extendida en la naturaleza.

Oxida el citocromo C, reducido y a su vez es transformada en su forma reducida e inactiva. Por transferencia de electrones a oxígeno molecular, la citocromo oxidasa reducida se convierte de nuevo en la forma oxidada y activa.

En presencia de oxígeno el sistema citocromo oxidasa, citocromo C, pueda tomar electrones de una amplia serie de sustancias orgánicas, entre ellos reactivo NADI (Naftol + dimetilparafenilendiamina), formando la molécula azul de indofenol.

Para la realización de ésta prueba bioquímica, se utilizan tirillas llamadas Bactident Oxidasa, para demostrar la presencia de citocromo oxidasa en los microorganismos.

BACTIDENT OXIDASA : (composición).

Estas tirillas vienen impregnadas con los siguientes reactivos:

δ - naftol al 1% y N - M - dimetil - p - fenileno - diamina.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Con un isopo estéril, coger una colonia que haya crecido en el agar PCA.
- 2) Colocar la colonia en la tirilla indicadora.
- 3) Esperar 1 minuto para poder ver la reacción.

Reacción positiva : Color morado (presencia de Indofenol)

Reacción negativa: Color amarillo.

c) PRUEBA ONPG :

El test de ONPG es actualmente un método rápido, para determinar si un organismo tiene la capacidad de utilizar la lactosa. Las Enterobactereaceae son preliminarmente agrupados acorde con sus habilidades para fermentar lactosa, Salmonella, Shigella, Proteus, Providencia y Morganella, pueden ser usualmente considerados no fermentadores de lactosa. Otros organismos incluyendo ciertos E. coli, Shigella sonna, Hafnia alvei, Serratia marcescens y algunas especies de Yersinia, pueden aparentar ser no fermentadores de lactosa porque ellos carecen de la enzima Permeasa el cual transporta activamente la lactosa a través de la membrana, haciéndose útil para beta galactosidasa intracelular. Si la beta - galactosidasa, pero no la permeasa, es producida por una especie generará eventualmente la capacidad de fermentar lactosa, que lentamente se difunde a

través de la membrana aunque éste proceso puede ser demasiado lento para detectarlo con caldos de fermentación de carbohidratos. Un examen rápido para la presencia de Beta – galactosidasa es el ONPG test.

Las Beta – galactosidasa en el substrato de Orthonitrofenil – beta – D – galactopiranosida (ONPG) en la misma forma como las enzima hidrolizan lactosa para formar galactosa y glucosa aunque el producto de la hidrólisis ONPG es un producto visible (amarillo) Orthonitrofenil.

REACTIVO ONPG: (ORTO– NITROFINEL– BETA – D – GALACTOPIRANOSIDO)

En el mercado existen discos (pastillas) impregnadas con orto – nitrofenil – beta – D – galactopiranosido.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Suspender un crecimiento suficiente procedente de un cultivo en el agar Hierro 3 azúcares (TSI).
- 2) Colocarlo en tubo que contiene 0,2 ml de solución salina estéril al 0,85%, a fin de obtener un enturbiamiento del medio claramente visible.
- 3) Añadir un disco ONPG.
- 4) Incubar 6 horas 35 – 37 °C.

La reacción positiva se manifiesta por el desarrollo de un color amarillo.

La reacción negativa no presenta ningún color.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

d) PRUEBA INDOL:

Prueba bioquímica para la demostración de la producción de Indol, por la degradación del triptófano por parte de los microorganismos Indol positivos. La producción de Indol se comprueba mediante el reactivo de Kovac´s que toma un color rojo al cabo de unos pocos minutos. La composición, fundamento, forma de actuación, preparación, técnica, empleo e interpretación, se detallaron en la identificación de E. coli.

Para Salmonella la prueba de Indol es negativo.

SI LOS RESULTADOS SON :

UREA : Negativo
ONPG : Negativo
INDOL : Negativo
OXIDASA : Negativo.

Salmonella : positivo.

5.5.6. **CONFIRMACION SEROLOGICA**

- * Los cultivos en TSI (negativo para urea), se siembran en caldo cerebro corazón (BHI) que contiene 5 ml de éste caldo .
- * Incubar por 24 horas a 37°C.
- * Añadir 25 ml. de suero fisiológico salino con formol a cada tubo.
 - Antisuero 0,5 ml. + antígeno con formol 0,5 ml.
 - Control : suero fisiológico 0,5 ml. + antígeno con formol 0,5 ml.
- * Incubar 1 hora a 48 – 50 °C.

RESULTADOS :

POSITIVO	Si hay aglutinación con el antígeno. No hay aglutinación con el control.
NEGATIVO	No hay aglutinación con el antígeno. No hay aglutinación con el control.

EJEMPLO:

MUESTRA : **FILETE FRESCO (Tilapia)**

AGAR	COLUMNA VERTICAL	SUPERFICIE INCLINADA	SH ₂
TSI	Viraje a amarillo y producción de gas	Viraje a amarillo por formación de ácido. Lactosa y/o sacarosa fermentada.	Negativo. No hay ennegrecimiento.
LIA	Viraje a amarillo	Violeta	negativo

PRUEBAS BIOQUIMICAS

PRUEBA	MEDIO DE CULTIVO	RESULTADO
UREA	Rojo	Positivo
ONPG	Amarillo	Positivo
OXIDASA	Púrpura	Positivo
INDOL	Rojo	Positivo



CONFIRMACION SEROLOGICA :

- No hay aglutinación con el antígeno
- No hay aglutinación con el control.

REPORTE FINAL : Salmonella Negativo.

5.6. VIBRIO CHOLERAE

El Vibrio cholerae pertenece a la familia de las vibrionaceae son bacilos en forma de coma, móviles, flagelo polar, oxidasa, y catalasa positiva. Fermentan la glucosa sin producción de gas y son Gram negativos.

El Vibrio cholerae es patógeno para el hombre, para su crecimiento es necesario medios de cultivos ricos en sodio, por lo que son considerados halofílicas.

MATERIALES Y EQUIPOS

- Pipetas estériles
- Cajas petric
- Mechero
- Fundas Stomacher
- Homogenizador Stomacher
- Incubadora
- Aza de platino

PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar 25 gramos de muestra en funda Stomacher, adicionar 225 ml de peptona alcalina y homogenizar en el Stomacher por 2 minutos.
- 2) Incubar por 6-8 horas 35 – 37°C cuando se trata de producto sin congelar
Incubar por 16 – 24 horas 35 – 37°C cuando se trata de producto congelado.
- 3) Sembrar por agotamiento y estrías en agar Tiosulfato – Citrato – Bilis – Sacarosa Agar (TCBS).
- 4) Incubar 18 – 24 horas 35 – 37°C.

MEDIOS DE CULTIVO

AGUA DE PEPTONA ALCALINA:

COMPOSICION (g/lt.) :

- Peptona 10 gramos
- Na Cl 10 gramos.

Distribuir 225 ml en frascos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

El agua de peptona alcalina conserva bien a los organismos en la disolución.

TIOSULFATO – CITRATO – BILIS – SACAROSA AGAR (TCBS)

Usado para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibrios enteropatógenicos.

MODO DE ACCION

La alta concentración de tiosulfato, citrato y la fuente de alcalinidad de éste medio inhibe notablemente el crecimiento de enterobacteriaceas mientras que la bilis inhibe el crecimiento principalmente de enterococos. Si los coliformes pudiesen crecer en el medio no pueden metabolizar la sacarosa, sólo unos pocos microorganismos sacarosa positivos, como especies del género *Proteus* pueden crecer para formar colonias amarillas parecidas a las del vibrio.

La mezcla de inhibidores azul de timol y azul de bromotimol cambia su color a amarillo cuando ácido es formado, aún en un medio tan fuertemente alcalino.

COMPOSICION (g/lit.):

-	Peptona de caseína	5g.
-	Peptona de carne	5g
-	Extracto de levadura	5
-	Citrato de sodio	10
-	Tiosulfato de sodio	10
-	Bilis deshidratada	5
-	Sacarosa	20
-	Cl Na	10
-	Citrato de hierro III	1
-	Azul de timol	0,04
-	Azul de bromotimol	0,04
-	Agar – agar	14 g.

PREPARACION:

Disolver y verter en placas estériles. No esterilizar en autoclave.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS	MICROORGANISMOS
Chatas o planas de 2 – 3 mm de diámetro y amarillas.	Vibrio cholerae tipo Torr.
Pequeñas con el centro verde azulado	Vibrio parahemolítico Vibrio alginoliticus
Grandes y amarillas	Pseudomonas, Aeromonas,
Azules diminutas y transparentes.	Enterobactereaceas y otros.

- 5) Escoger 3 o más colonias típicas y sembrar para aislamiento de las colonias en Agar peptona de caseína – peptona de harina de soja. (TSAN) = Tryptic Soy Agar.
- 6) Incubar por 18 – 24 horas a 35 – 37°C.

MEDIO DE CULTIVO

TSAN: (Tryptic Soy Agar) = Agar Caseína y (Agar peptona de caseína – peptona de harina de soja).

Medio de cultivo universal, exento de sustancias inhibitoras y de indicadores, concebidos para su utilización en un amplio espectro de aplicaciones.

Por su rica y abundante base nutritiva, estos medios de cultivo son adecuados también para el cultivo de microorganismos exigentes.

COMPOSICION (g/lit.):

- Peptona de caseína 15,0
- Peptona de harina de soja 5,0
- Cloruro sódico 5,0
- Agar – agar 15,0



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

EMPLEO E INTERPRETACION

Actúese en cada caso, según los correspondientes fines de empleo.

7) Realizar las pruebas bioquímicas : sembrar en agar :

- * Hierro 3 azúcares (TSI) inclinado
- * Hierro 2 azúcares Agar (KIA) inclinado.
- * Oxi Agar.

MEDIO DE CULTIVO

KIA : AGAR KLINGER (Agar – Hierro – Dos Azúcares)

Medio de cultivo ensayo para la identificación de bacterias intestinales Gram – negativas.

FORMA DE ACTUACION: (véase Agar Hierro Tres Azúcares).

COMPOSICION (g/lt.) :

-	Peptona de caseína	15,0
-	Peptona de carne	5,0
-	Extracto de carne	3,0
-	Extracto de levaduras	3,0
-	Cloruro sódico	5,0
-	Lactosa	10,0
-	D (+) glucosa	1,0
-	Citrato de amonio y hierro III	0,5
-	Tiosulfato sódico	0,5
-	Rojo fenol	0,024
-	Agar – agar	12,0

PREPARACION:

Disolver 55 g/lt, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.
dejar solidificar como Agar inclinada.

El medio de cultivo preparado es claro y de color rojo pardusco.

EMPLEO E INTERPRETACION: (véase Agar Hierro Tres Azúcares).

5.6.1. PRUEBAS BIOQUIMICAS Y CONFIRMACION DE VIBRIO CHOLERAE

a) AGAR TRIPLE AZUCAR HIERRO: (TSI).

- * Incubar cada uno de los cultivos sospechosos en un tubo de agar triple azúcar hierro inclinado.
- * Sembrar en estría la parte inclinada y por picadura la columna .
- * Incubar los tubos, inoculando por 12 horas a 37°C.

INTERPRETACION:

Los cultivos de *Vibrio cholerae* producirán una parte inclinada ácida (amarilla) y una columna de medio también ácida, sin producción de gas ni ennegrecimiento (producción de SH₂) de la columna de medio.

b) AGAR HIERRO DOS AZUCARES (KIA)

- * Inocular cada uno de los cultivos sospechosos en un tubo con agar KIA inclinado.
- * Sembrar en estría la parte inclinada y por picadura la columna.
- * Incubar los tubos inoculados por 12 horas a 37°C.

INTERPRETACION:

Los cultivos de *V. cholerae* aparecen con parte inclinada alcalina (roja) y columna de medio ácido (amarillo), sin producción de gas ni SH₂.

c) PRUEBA DE LA OXIDASA

- * Inocular cada uno de los cultivos sospechosos en un tubo con agar OXI inclinada.
- * Sembrar en estría la parte inclinada y por picadura la columna .
- * Incubar los tubos inoculados por 12 – 14 hora 35 – 37°C.

Esta prueba diferencia los miembros de la familia Enterobactereaceae de *V. cholerae*. Los miembros de la familia Enterobactereaceas son negativos a ésta prueba, en tanto que *V. cholerae* es positivo.

Los cultivos de *V. cholerae* positivos, la zona de reacción muestra una coloración azul hasta violeta.

MEDIO DE CULTIVO

OXI (Oxidasa positivo)

La citocromooxidasa es una enzima muy extendida en la naturaleza.

Oxida el citocromo C reducido y a su vez es transformada en su forma reducida e inactiva. Por transferencia de electrones a oxígeno molecular, la citocromo oxidasa reducida se convierte de nuevo en la forma oxidada y activa.

En presencia de oxígeno el sistema citocromo oxidasa, citocromo C, pueda tomar electrones de una amplia serie de sustancias orgánicas, entre ellos reactivo NADI (Naftol + dimetilparafenilendiamina), formando la molécula azul de indofenol.

COMPOSICION (g/l):

- N, N dimetil – 1,4 fenilendiamonio cloruro
- 1 – naftol.

EMPLEO E INTERPRETACION

En caso de gérmenes citocromoxidasa positivos, la zona de reacción muestra una coloración azul hasta violeta.

MICROORGANISMOS	OXIDASA
Salmonella	-
Escherichia coli	-
Vibrio	+



d) FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

- * Inocular ligeramente a partir de un cultivo en agar nutritivo de 24 horas, tubos con caldo de peptona azucarada hechos con glucosa, sacarosa, Arabinosa, Manitol e Inositol.
- * Incubar 35 – 37 °C. por 4 – 5 días y examinar periódicamente.

MEDIO DE CULTIVO

PREPARACION:

Peptona 10,0 gramos

Cloruro de sodio 5,0 gramos

Añadir a éste medio 0,5% del azúcar correspondiente y añadir 10 ml del indicador (bromotimol, fenol) en 1 lt. de agua destilada.

Distribuir 5 ml. en tubos que contengan campanas DURHAM invertido y esterilizar a 115°C. por 10 minutos.

INTERPRETACION

Si hay presencia de gas : no es *Vibrio cholerae*.

REACCIONES DEL VIBRIO CHOLERAЕ EN LAS PRUEBAS DE IDENTIFICACION

PRUEBA	REACCION
Oxidasa	+
Manitol	+
L – inositol	-
Sacarosa	+
Manosa	+
Arabinosa	-

EJEMPLO : *Vibrio cholerae*

MUESTRA: FILETE FRESCO (congelado)

MEDIO:

AGAR TCBS

Colonias : azules muy pequeñas y transparentes

PRUEBAS BIOQUIMICAS

AGAR	COLUMNA VERTICAL	SUPERFICIE INCLINADA	SH ₂
TSI	Amarillo, producción de gas.	Amarillo por formación de ácido.	Positivo.
KIA	Amarillo, producción de gas	Amarillo por formación de ácido	Positivo.

FERMENTACION CARBOHIDRATOS : Presencia de gas en el medio de cultivo (Agar nutritivo) = positivo.

PRUEBA OXIDASA : Positivo (color púrpura).

REPORTE FINAL : *Vibrio cholerae* = **negativo.**

5.7. ESTAFILOCOCOS AUREUS

Pertenece a la familia de las Micrococaceas. Tienen forma de cocos, agrupados en racimos, inmóviles, Gram positivo, aerobio y anaerobio facultativo. Esta especie se diferencia de las otras por su capacidad de producir coagulasa que coagula el plasma sanguíneo.

El *S. aureus* se encuentra habitualmente en la piel, nariz, boca, cuello, orejas. Existe una gran proporción de sujetos portadores (nariz y manos) de estos organismos.

Por ésta razón es casi obligatorio e imprescindible eliminar de las líneas de producción de alimentos así como en la manipulación de los mismos.

MATERIALES Y EQUIPOS :

- Pipetas estériles
- Cajas petric
- Fundas Stomacher
- Asa de platino
- Mechero
- Stomacher (homogenizador)
- Estufa
- Baño de María

Prácticas Profesionales

- ☐ Contador de colonias
- ☐ Balanza
- ☐ Asa de platino.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

PROCEDIMIENTO

- 1) Pesar 25 gramos de muestra, adicionar 225 ml de agua tamponada y homogenizar por 2 minutos en el Stomacher (dilución 1/10).
- 2) Prepare una serie de diluciones : tomar 2 ml de la dilución 1/10 y pasar a un tubo que contiene 18 ml de agua tamponada y así obtener la dilución 1/100 (10^2).
- 3) Adicionar 0,5 ml de la dilución 10^2 y extenderla en la placa del medio de cultivo que es el agar Baird Parker.
- 4) Incubar 48 horas a 35°C.

MEDIOS DE CULTIVO

AGAR BAIRD PARKER

Para aislamiento y diferenciación de Staphylococos en alimentos y materiales farmacéuticos, según Baird – Parker.

FORMA DE ACTUACION

Este medio de cultivo contiene cloruro de litio y telurito para la inhibición de la flora acompañante, en tanto que el piruvato y la glicocola actúan favoreciendo selectivamente el crecimiento de Staphylococos.

Sobre el medio de cultivo, opaco por su contenido de yema de huevo, las colonias de Staphylococos muestran dos características diagnósticas : por lipólisis y proteólisis, se producen halos y anillos característicos y debido a la reducción del telurito a telurio, se desarrolla una coloración negra.

COMPOSICION DE BAIRD PARKER (g/l):

- Peptona de caseína	10,0
- Extracto de carne	5,0
- Extracto de levadura	1,0
- Piruvato de sodio	10,0
- Glicina	12,0
- Cloruro de litio	5,0
- Agar – agar	15,0

PREPARACION

Disolver 58 g. en 1 lt. de agua destilada y esterilizar en autoclave, enfriar a 45°C. añadir mezclando 50ml/lt de emulsión de yema de huevo y 3 ml/lt. de solución de telurito de potasio al 3,5%, verter en placas y dejar solidificar.

ADITIVOS:

a) EMULSION DE YEMA DE HUEVO

Esta se emplea como aditivo para el medio de cultivo (Baird parker) y sirve para la demostración de la actividad lecitinasa de los microorganismos.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Lava cuidadosamente el huevo con agua ligeramente caliente (T° 40 – 45°C.) y secar con papel toalla.
- 2) Sumergir el huevo en alcohol al 70% por 2 minutos y secar con papel toalla.
- 3) Romper el huevo, hacer rodar las yemas en una probeta estéril.
- 4) Añadir una cantidad de solución salina al 0,85% igual a la cantidad de yema de huevo obtenida y mezclar bien. La emulsión debe utilizarse inmediatamente después de su preparación.
- 5) La emulsión ya preparada se mezcla con el agar Baird – Parker.
- 6) Adicionar 50 ml de emulsión de yema de huevo por litro de agar Baird Parker.

b) TELURITO DE POTASIO

El telurito se reduce a teluro y por lo tanto se desarrolla una coloración negra.

PREPARACION

- 1) Prepare una solución de telurito de potasio al 3,5% y adicionar al agar Baird Parker.
- 2) Adicionar 3 ml de telurito de potasio al 3,5% por litro de agar Baird Parker.

INTERPRETACION DEL AGAR BAIRD PARKER

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Negras, lustrosas, convexas, 1-5mm de diámetro con borde estrecho blanquecino, rodeado por un halo claro de 2-5mm de anchura.	Staphylococos áureos.
Negras, lustrosas, pero de forma irregular. Al cabo de 24 horas, presencia de zonas opacas alrededor de las colonias grandes y deformes.	Staphylococos epidermis.

- 5) Contar las placas que contengan 20 – 200 colonias típicas, seleccione 1 o más colonias, para continuar con las pruebas de identificación de S. áureos.

5.7.1. ENRIQUECIMIENTO

MEDIO DE CULTIVO

BHI (caldo cerebro – corazón)

Para el cultivo de diversos microorganismos patógenos existentes.

PROCEDIMIENTO

- 1) Con un aza de platino coger la colonia sospechosa e incubar en los tubos que contienen el caldo BHI (0,3ml).
- 2) Incubar 3 – 4 horas a 37°C.

FORMA DE ACTUACION

Este medio es adecuado para el cultivo de muchas bacterias exigentes, como Staphylococos, meningococos y otros.

El caldo BHI es especialmente adecuado para el cultivo de Staphylococos destinados al ensayo de plasma coagulasa.

COMPOSICION DE BHI (g/lt.) :

- Infusión de cerebro	12,5
- Infusión de corazón	5,0
- Proteasa peptona	10,0
- D (+) glucosa	2,0
- Cloruro de sodio	5,0
- Disodiohidrógenofosfato	2,5

PREPARACION

Disolver 37 gramos en un litro de agua destilada y distribuir 0,3 ml. en tubos. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

5.7.2. PRUEBA DE LA COAGULASA

PROCEDIMIENTO:

- 1) Disolver el plasma de conejo, con 3-5 ml de agua destilada estéril.
- 2) Con pipeta estéril, colaxar 0,5 ml del plasma hidratado a los tubos que contienen el caldo – cerebro – corazón (BHI) el mismo que ya está enriquecido con la colonia sospechosa.
- 3) Incubar 4-6 horas a 35°C.
- 4) Los resultados son:
- 5) Coagulo completo : Staphylococos áureus positivo.
- 6) Si no se forman el coágulo el resultado es negativo.

EJEMPLO:

MUESTRA: Filete fresco congelado

$1 \times 10^2 = 100$ colonias/gramo de alimento.



**BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS**

4.8. ANÁLISIS DE AGUA

Los respectivos análisis de agua se lo realiza en forma diaria, el calendario de muestreo es el siguiente:

MUESTREO SEMANAL DE AGUA						
LUNES	MARTES	MIERCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
Agua de beber.	Agua de beber	Agua de beber	Agua de beber	Agua de beber	Agua de beber	Agua de beber.
	IQF	Cisterna 1-2	Cisterna #3	C.S.T.	Glasee	
Hielo de tilapia	Tilapia	IQF camarón	Hielo silo de Tilapia	potabilizadora	camarón	
	Cámara #2	U.V. Tilapia	de Tilapia	U.V. camarón	Silo de camarón.	
Maquina A	Maquina E		Empaque manual	Manguera de tilapia		
Cámara #3						

Los análisis realizados son los siguientes :

- Coliformes totales
- Coliformes fecal
- Escherichia coli
- Aerobios totales

(Los límites permitidos para aguas, ver anexo # 3).

5.8.1. COLIFORMES TOTALES

Para el análisis se utiliza el caldo lauril – sulfato doble concentración.

Se colocan 10 ml. de caldo lauril en tubos de ensayo y colocarles campanas Durham.

PROCEDIMIENTO

En una serie de 10 tubos.

- 1) Contienen caldo lauril, añadir 10 ml de agua (muestra a examinar).
- 2) Incubar a 35 °C. por 48 horas
- 3) Anotar los tubos como positivos si presentan : gas y enturbiamiento en el caldo lauril.

- 4) Ver los resultados en la tabla del número más probable (MNP) y reportar según corresponda. (ver tabla).

EJEMPLO : AGUA DE BEBER

Ningún tubo presentó formación de gas (0), veo en la tabla y el resultado es : < 1,1 NMP/100 ml. (ver anexo # 4).

5.8.2. COLIFORMES FECALES.

Se utiliza el caldo E.C. para confirmación. La técnica se la describió en el capítulo anterior.

EJEMPLO : Agua de Beber

Todos los tubos no formaron gas = < 1,1 (ver anexo # 4).

5.8.3. ESCHERICHIA COLI

Para confirmación de E. coli se utilizan las pruebas IMVIC.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

TUBOS	RESULTADO
0,0,0.	< 1,1 NMP/ 100ml.

(ver anexo # 4).

5.9. TOMA DE MUESTRAS (SWABS) EN : PLANTA DE TILAPIA Y PLANTA DE CAMARON

Las áreas, materiales – equipos, utensilios, mesas, etc. donde se toman las muestras se detallan en forma ordenada en el Anexo # 5 .

La toma de muestra se la realiza antes de comenzar el proceso de producción.

MATERIALES , para tomar muestras.

- Guantes
- Gradilla
- Isopos estériles
- Alcohol

- ☐ Algodón
- ☐ Mechero
- ☐ Diluyente (solución Rinse)
- ☐ Marcador.

PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRAS : SUPERFICIES

Rotular los tubos con los siguientes datos: área de la toma de muestra, fecha y hora.

- 1) Humedecer el Isopo estéril en la solución Rinse.
- 2) Frotar con energía en trazos paralelos la superficie que se va a examinar, girando a la vez el isopo, se frota por segunda vez haciendo trazos paralelos perpendiculares a los de la vez anterior. Conviene cuidar que se frote toda el área elegida (aprox. 50 cm.)
- 3) Colocar el isopo en el tubo que contiene la solución Rinse, y quebrar el lado del isopo que estuvo en contacto con la mano.

PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRAS : CUCHILLOS, BANDEJAS, Y GAVETAS.

- 1) Rotular los tubos, coger 5 cuchillos, gavetas, baldes, etc.
- 2) Humedecer el isopo con la solución Rinse. pasar sobre la superficie del cuchillo (metal en contacto con el alimento), y frotar el isopo en la unión del mango con el metal.
- 3) Repetir la operación anterior con los 4 cuchillos restantes.
- 4) Guardar el isopo dentro de la solución Rinse y romper la parte superior del isopo que estuvo en contacto con la mano.

PROCEDIMIENTO PARA TOMA DE MUESTRAS : MANOS DEL PERSONAL

- 1) Se le tomará la muestra a aquella persona que esté lista para comenzar su trabajo.
- 2) A las persona se le indicará lo siguiente: poner la mano lo más abierta posible y firme.
- 3) Con isopo estéril humedecerlo en la solución Rinse.
- 4) Frotar el isopo sobre toda la mano : palma, dedos, entre los dedos, uñas.
- 5) Guardar el isopo dentro de la solución Rinse y romper la parte superior del isopo que estuvo en contacto con la mano.



SOLUCION RINSE.

- * Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2 \text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) al 10%.
- * Disolver 100 gramos de tiosulfato en 1 litro de agua destilada.
- * Dispersar 5 ml en cada tubo.
- * Esterilizar en autoclave a 121°C . por 15 minutos.

El tiosulfato de sodio presente en la solución Rinse es para inactivar el cloro que está presente en las superficies de los equipos y materiales.

5.9.1 AEROBIOS TOTALES

PROCEDIMIENTO

- 1) Pipetear 1 ml. de solución Rinse que contiene la muestra de la superficie tomada y adicionar a un tubo que contiene 9 ml de agua tamponada y así se obtiene la solución 1/10 (10^1).
- 2) Pipetear 0,1 ml de la dilución 1/10 (10^1) y colocarlo en un tubo que contiene 9 ml. de agua tamponada y así obtengo la dilución 1/1000 (10^3).
- 3) Pipetear 1 ml. de la dilución 1/1000 (10^3) y adicionar a las cajas petri. (10^3).
- 4) Agregar 10 – 15 ml de agar PCA, y dejar solidificar las cajas.
- 5) Incubar a 35°C . por 48 horas.
- 6) Contar las colonias que hagan crecido en el medio de cultivo y multiplicarla por el número de la dilución.

EJEMPLOS:

- Banda transportadora $42 \times 10^2 = 42 \times 2 = 840 \text{ UFC/cm}^2$
- Gavetas $53 \times 10^2 = 53 \times 2 = 106 \text{ UFC/U.}$
- Pisos $439 \times 10^3 = 439 \times 20 = 8.780 \text{ UFC/cm}^2$



CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

- Durante los tres meses que estuve en Empacadora Nacional (ENACA), tuve la oportunidad de conocer nuevas técnicas en lo que se refiere a análisis microbiológicos a productos pesqueros y reforzar así los conocimientos aprendidos en la Universidad.
- La toma de muestras (camarón y tilapia) es estrictamente llevada a cabo por las personas que trabajan en el laboratorio, ya que si las muestras son inapropiadamente colectadas, mal manejadas, o no son representativas de un determinado lote, los resultados de los análisis no serían confiables.
- Todos los conocimientos aprendidos en la Universidad en lo que se refiere a Microbiología II y Sanidad e Higiene Industrial, los pude poner en práctica durante mi experiencia realizada en Empacadora Nacional (ENACA).
- La empresa ENACA, aplica el sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points), de una manera muy estricta para de ésta manera controlar los peligros en la producción de sus productos, y garantizar así un producto seguro y confiable para el consumidor.
- Se recomienda que en el laboratorio de Microbiología de Empacadora Nacional (ENACA), se rotulen todos los agares, caldos y soluciones, para evitar así posibles confusiones.

BIBLIOGRAFIA

- Food and Drug Administration (FDA). BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. (BAM). Publicado por AOAC Internacional. Séptima Edición. 1992.
- Manual de Medios de Cultivo MERCK. 1994.
- Marvin L. Speck. COMPENDIUM OF METHODS FOR THE MICROBIOLOGICAL EXAMINATION OF FOODS. American Public Health Association. Segunda Edición. Washington. 1984.
- ICMSF. MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS I; TECNICOS DE ANALISIS MICROBIOLOGICO. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Primera Edición. 1982.
- Guy Carvajal. MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS MARINOS. Primera Edición. Lima, Perú. 1991.
- Apuntes de la Materia de Microbiología de Alimentos II.
- Apuntes de la Materia Sanidad e Higiene Industrial.
- Información y Apuntes proporcionados por la Empresa ENACA C.A.
- Sidney M. Finegold and Ellen Jo Barón. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY. G.V. Mosby Company. Toronto . Séptima Edición. 1986.

ANEXOS

ANEXO #1

ANALISIS REALIZADOS A : TILAPIA Y CAMARON

- 1 Salmonella
- 2 Vibrio cholerae
- 3 Aerobios totales
- 4 Coliformes totales
- 5 Coliformes fecales
- 6 Escherichia coli.

NUMERO MAS PROBABLE (MNP) POR GRAMO DE
ALIMENTO, USANDO 3 TUBOS 0,1 ; 0,01 ; Y 0,001.

TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS				TUBOS POSITIVOS			
0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN	0,1	0,01	0,001	MPN
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	1,1	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12,0	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1.100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100



ANEXO # 3

LOS LIMITES PERMITIDOS PARA EL AGUA SON LOS
SIGUIENTES:

Coliformes totales	< 1,1 NMP / 100 ml.
Coliformes fecales	< 1,1 NMP / 100 ml.
Escherichia coli	< 1,1 NMP / 100 ml.
Aerobios totales	< 30 UFC / ml.

ANEXO # 4

TABLA DEL NUMERO MAS PROBABLE (MNP) EN EL
ANALISIS DE AGUAS UTILIZANDO UNA SERIE DE 10 TUBOS

TUBOS POSITIVOS	NMP/100 ml.
0	< 1,1
1	1,1
2	2,2
3	3,6
4	5,1
5	6,9
6	9,2
7	12,0
8	16,1
9	23,0
10	> 23,0



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

REPORTE DE MUESTRAS DE AGUAS

Tipo de Muestra	Punto de Monitoreo	PPM Cl	Coliforme total NMP/100ml.	Coliforme fecal NMP/100ml.	Escherichia coli IMVIC	Aerobios totales
Consumo Humano	Potabilizadora	0,4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	20,0
Potable	Manguera Tilapia	10,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	4.000
UV	Cisterna # 1-2 Camarón	3,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 10
		0,6	< 1,1	< 1,1	< 1,1	10
Potable	Cisterna #3	6,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	70
Glasee	Cisterna potabilizadora. Valor agregado	1,5	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 10
		8,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 10
Hielo	Cámara #3	3,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 10
Glasee	Maquina A IQF Tilapia	0,4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	40
		1,0	< 1,1	< 1,1	< 1,1	< 10
Consumo Humano	Potabilizadora.	0,4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	20
Glasee	Potabilizadora.	0,4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	140
Manguera.	Maquina E	0,4	< 1,1	< 1,1	< 1,1	100
	Tilapia.	0,4	23	< 1,1	< 1,1	380
	Cámara #2	0,4	1,1	< 1,1	< 1,1	240

PPM = Partes por millón de cloro.

ANEXO # 6

CRITERIO PARA EL RECHAZO DE CAMARON

- 1 Escherichia coli : mayor a 7,2 NMP.
- 2 Staphylococos áureus : mayor a 10.000 UFC/g.
- 3 Salmonella : presencia en producto listo para comer.
- 4 Vibrio cholerae : presencia en producto listo para comer.



BIBLIOTECA
DE ESCUELAS TECNOLÓGICAS

EMPACADORA NACIONAL C.A.

Control de Calidad / Microbiología

Anexo #4 ✓

Fecha

AREA

PUNTOS DE MONITOREO

TOTAL PLATE COUNT

LISTERIA

AREA	PUNTOS DE MONITOREO	TOTAL PLATE COUNT	LISTERIA
Recepción	Tanque		
	Banda de Inspección		
	Banda Transportadora		
	Gaveta		
Descabezado	Piso		
	Tanque		
	B. Transportadora		
	Tanque de Colas		
	Gavetas		
Clasificación A E	Tanque de Cabezas		
	Tanque		
	B. Inspección		
	Elevador		
	Resbaladeras		
	B. Pequeñas		
	Mesas		
	Baldes		
	Tanque de Glaceo		
	Gavetas		
Piso			
E. Manual	Gavetas		
	Transportadora		
	Bandeja		
	Lavacaros		
	Mesas de Pesado		
	Tanque de Glaceo		
	Mesa de transportadora		
Piso			
Valor Agregado	Mesa ()		
	Mesa ()		
	Lavacaros		
	Gavetas		
	Tanque de Glaceo		
RHR	Piso		
	Gavetas		
IQF	Mesa		
	T. Glaceo		
	Banda Acero		
	Banda de T. Glaceo		
	Transportadora 1		
	Elevador		
	Conveyer		
Transportadora 2			
Silo de Hielo	Lavacaros		
	Piso		
Personal	Manos		



BIBLIOTECA DE ESCUELAS TECNOLOGICAS

