

Tecnicatura en Acuicultura y procesamiento pesquero
Universidad Tecnológica Nacional - Mar del Plata

**EL ROL DEL LABORATORIO EN EL
CONTROL MICROBIOLOGICO DE
ALIMENTOS
y DE LOS PROCESOS
INDUSTRIALES**

Alumno: Ana Valeria Saicha
Tutora: Angela Sofía Zamora

2010

PARTE I

EL ROL DEL LABORATORIO EN EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS y DE LOS PROCESOS INDUSTRIALES.

1.- Introducción

Según el Código Alimentario Argentino (CAA) "Alimento es toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que ingeridas por el hombre, aportan en su organismo los materiales y la energía necesarias para el desarrollo de sus procesos biológicos".

La designación de "alimento" incluye al agua y a las sustancias que se ingieren por hábito, costumbre o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo.

Los alimentos pueden servir como vehículo para que microorganismos nocivos puedan ingresar al organismo humano causando distintos tipos de enfermedades, las cuales pueden ser transmitidas por agentes infecciosos o sus toxinas como bacterias, virus, priones, parásitos y hongos.

Estos agentes difieren ampliamente en sus características estructurales, como así también en su resistencia a los distintos desinfectantes utilizados en las industrias.

Los alimentos son fácilmente colonizados por los microorganismos ya sea en forma natural o durante el procesamiento o manipulación. La proliferación de microorganismos en el alimento puede implicar desde una alteración inapreciable hasta su deterioro completo o un grave riesgo para la salud humana. Por lo cual es de gran importancia el análisis microbiológico en la evaluación de los alimentos.

El CAA especifica desde el análisis microbiológico que ningún alimento puede contener agentes infecciosos o sus toxinas.

La búsqueda de un agente infeccioso en un alimento es dificultosa, tediosa, costosa y además se demora mucho para obtener los resultados. Por ello se recurre a los indicadores bacteriológicos.

Dentro de los indicadores los más utilizados son los más importantes los pertenecientes a contaminación fecal por el alto riesgo sanitario que implica su presencia en una muestra de alimento.

El grupo de **bacterias coliformes totales** se define como bacilos gram-negativos,

aerobios facultativos, no esporulados que pueden desarrollarse en presencia de sales biliares, no tienen citocromo oxidasa y son capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas. Crecen a 37° C, en un período 48 h y pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*. Se pueden encontrar tanto en las heces como en el medio ambiente y en el agua para consumo con concentraciones de nutrientes relativamente elevadas.

El grupo de **bacterias coliformes fecales o termotolerantes** son bacterias anaeróbicas facultativas, no esporuladas, gram-negativas, que pueden fermentar la lactosa con producción de gas, a 44,5° C, en un período de 24 h. Están presentes en grandes cantidades en las heces de animales de sangre caliente y del ser humano. Representadas por el género *Escherichia* entre el 80 y 90 % de la carga de enterobacterias fecales y en menor grado especies de *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. Su presencia en alimentos sirve de indicador de contaminación fecal y de riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas intestinales.

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, se caracteriza por poseer las enzimas β -galactosidasa y β -glucuronidasa. Desarrollan a 44,5° C, fermenta la lactosa con producción de gas, Es el único género de bacterias coliformes fecales que produce indol a partir del triptofano a 44,5 C, utilizada como prueba presuntiva para este genero.

Los **enterococos intestinales** son cocos gram-positivos que forman pares o cadenas, y poseen el antígeno del Grupo D de Lancefield. Pueden crecer en presencia de sales biliares y azida de sodio, este ultimo inhibidor para el cultivo de coliformes y para la mayoría de los gram- negativos. Hidrolizan la esculina y son catalasa negativos.

Otro grupo utilizado como indicador son las **bacterias aerobias mesófilas** que comprenden a las bacterias heterotróficas que desarrollan a 37 C. Su presencia indica una mala higiene en la elaboración de alimentos o los reservorios de agua.

Las **bacterias clostridios sulfito-reductoras** son bacilos gram-positivos, anaerobios, formadores de esporas. Son utilizados en el análisis de los alimentos envasados al vacío como las conservas, por el riesgo sanitario de contener toxinas botulínicas, y es un analito utilizado por otros países como control de calidad del agua, su presencia en aguas indica que estas pueden contener *Criptosporidium spp.*

2.- En este trabajo se planteo como:

Objetivo general:

- Conocer y saber aplicar las técnicas microbiológicas realizadas en el laboratorio para analizar los alimentos y los procesos industriales

Objetivo particulares:

- Evaluar las muestras de alimentos provenientes de distintos establecimientos mediante normativas nacionales y/o internacionales.
- Determinar Puntos Críticos mediante el control de las distintas etapas del proceso industrial.
- Evaluar las aguas desde el aspecto bacteriológico
- Evaluación de desinfectantes de uso en las industrias pesqueras.

3.- Muestreos:

La muestra de alimentos debe realizarse lo mas asépticamente posible y debe se recogida en un recipiente estéril. La misma tiene que ser representativa del lote de alimentos a analizar.

Para muestras de procesos industriales generalmente se realizan hisopados de superficies (10 x 10cm o superficies mayores) según las disposiciones de los establecimientos alimenticios.

Las muestras de aguas deben ser tomadas en caso de pertenecer a la distribución de red con el agregado de un agente reductor de cloro.

4.-Técnicas microbiológicas

4.1.-Estandarizadas.

Las técnicas microbiológicas son estandarizadas de acuerdo a Normas nacionales (IRAM) o internacionales (ISO).

También se tienen en cuenta métodos estandarizados como:

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association and Water Pollution Control Federation. 1998. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington, D.C. USA. Parte 9000.

The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMFS) "Microbiología de los Alimentos" 1983

Food and Drug Administration (FDA) "Bacteriological Analytical Manual". 1998

4.2.- Técnicas para alimentos

Las técnicas microbiológicas que se utilizan en la evaluación de aguas generalmente se realizan sobre volúmenes mayores a los que se utilizan para otros alimentos, por ello las técnicas para agua difieren de las del resto.

4.3. Técnicas para evaluación de agua potable según el CAA

4.3.1.- Recuento de bacterias aerobias mesófilas (APHA)

4.3.1.1 Procesamiento bacteriológico:

Se siembran 1 ml de la muestra por duplicado en placas estériles.

Para esta técnica se utiliza el medio agar para recuento en placa (PCA) fundido y enfriado a 45° C. Se vierten aproximadamente 15 ml de medio en las placas que contienen la muestra y se homogeneiza con movimientos en forma de ocho.

Una vez solidificado el medio, se incuban las placas en forma invertida en estufa a 37° C durante 24 h.

Para el recuento se seleccionan las placas que presenten entre 25-250 colonias.

Para determinar el resultado se calcula un promedio de los recuentos de las dos placas. Se informa el valor obtenido como UFC/ml. Si el recuento es superior a 500 UFC/ml se informa como mayor de 500 UFC/ml. En el caso en que las placas no presenten colonias se informará el recuento como 0 UFC/ml.

4.3.2.- Tubos múltiples para la determinación del numero mas probable (NMP) en 100 ml de muestra. (APHA)

4.3.2.1 Procedimiento bacteriológico:

Para la **prueba presuntiva de coliformes totales**, se preparan 3 tubos de ensayo con 10 ml de caldo lauril sulfato doble concentración y 6 tubos con 6 ml del mismo medio de concentración simple, todos ellos conteniendo campana de Durham invertida.

Se colocan 10 ml de la muestra en los tres primeros tubos.

Se colocan 1 ml de la muestra en 3 tubos con 6 ml.

Se colocan 0,1 ml de la muestra en los tres tubos restantes.

Se incuban durante 48 h en estufa de cultivo a 37° C. A las 24 h se puede efectuar una lectura parcial.

Se consideran positivos aquellos tubos que presenten turbidez y gas retenido dentro de la campana de Durham.

Para la **prueba confirmatoria de los coliformes totales**, desde cada tubo positivo de caldo lauril se repica una alícuota a otro tubo conteniendo 3 ml de caldo verde brillante lactosa (Brila) con campana de Durham para determinar coliformes totales, los cuales se incuban a 37° C durante 48 h.

Para la determinación de coliformes fecales se toman los tubos positivos de Brila y se repica una alícuota de estos a tubos conteniendo 3 ml de caldo EC con campana de Durham, los cuales se incuban en baño Maria a 44, 5° C durante 24 h.

Para la lectura de resultados se utiliza la tabla de NMP (numero mas probable). La combinación de tubos positivos y negativos obtenida de las pruebas presuntiva y confirmatoria de coliformes totales y de la determinación de coliformes fecales nos indica el numero de mas probable de coliformes que se encuentran en 100 ml de muestra. Tabla de NMP (ANEXO 1)

4.3.3.- Presencia/ausencia de *Pseudomonas aeruginosa* (APHA)

4.3.3.1 Procedimiento bacteriológico:

Para la prueba presuntiva se siembran 100 ml de la muestra en un frasco con 100 ml de caldo nutritivo doble concentración. La muestra se Incuba a 37° C durante 48

h. Si al finalizar la incubación se observa turbidez en el caldo se realiza un repique con ansa en anillo a una placa con agar cetrimida.

Se incuba a 37° C durante 96 horas.

Se observan las colonias desarrolladas y se consideran *Pseudomonas aeruginosa* confirmadas todas las colonias que presenten un color azul verdoso por el desarrollo del pigmento pirocianina

Se consideran *Pseudomonas aeruginosa* sospechosas todas las colonias no azul verdosas que fluorescen bajo la luz UV. A las colonias sospechosas se realiza un ensayo de oxidasa el cual consiste en colocar unas gotas de reactivo de oxidasa recientemente preparado sobre papel de filtro. Luego se frota sobre el papel el ansa cargada con el cultivo a ensayar. Se observa como reacción positiva la aparición de un color púrpura oscuro antes de los 30". Todas las cepas oxidasa positiva deben ser confirmadas por la presencia de pigmentos, para lo cual se repican a agar F y agar P y se incuban a 37° C durante 24 h. Se consideran positivos los tubos de Agar F que presenten fluorescencia bajo la luz UV y el desarrollo del color verde azulado característico en Agar P.

El resultado se expresa como presencia o ausencia de *P. aeruginosa* en 100 ml de agua.

4.3.4.- Presencia/ausencia de *E. coli*/100 ml (APHA)

4.3.4.1 Procedimiento bacteriológico:

Para la determinación presuntiva de *E. coli* se siembra una alícuota de un tubo de E-C positivo en el medio de SIM o caldo triptofano y se incuba en baño maría a 44, 5° C durante 24 h. Luego se realiza la prueba de Indol para *E. coli*.

Como pruebas complementarias para la confirmación de *E. coli* se puede realizar la prueba de IMViC

4.4.- Técnicas para evaluación de alimentos

4.4.1.- Determinación de *Enterobacteriaceae*

Este método permite determinar la presencia de enterobacterias, tanto de orígenes ambientales o fecales, que fermentan la glucosa, en un medio de cultivo que

contiene inhibidores que permiten el crecimiento de las enterobacterias, inhibiendo al resto de la flora acompañante.

4.4.1.1- Procesamiento bacteriológico:

Se pesan exactamente 10 g del alimento a analizar. Se le añaden a la muestra 90 ml de diluyente estéril. Se fricciona la bolsa suavemente durante 3 a 5´.

Se toma 1 ml de la suspensión madre y se siembran en placas estériles por duplicado. Posteriormente se le agrega el medio de cristal violeta rojo y bilis (VRB).

Luego se realiza la primera dilución de la muestra, colocando 1 ml de la "suspensión madre" en 1 tubo conteniendo 9 ml de diluyente: esto equivale a la dilución 1:10.

Luego se coloca 1 ml de la dilución 1:10 al segundo tubo, obteniendo así la segunda dilución, esto equivale a la dilución 1:100.

Seguidamente se coloca 1 M^a de la dilución 1:100 al tercer tubo, obteniendo así la tercera dilución, esto equivale a la dilución 1:1000.

Se coloca 1 ml de la dilución 1:1000 al cuarto tubo, obtendremos así la cuarta dilución, esto equivale a la dilución 1:10000.

Se coloca 1 ml de la dilución 1:10000 al quinto tubo, obtendremos así la quinta dilución, esto equivale a la dilución 1:100000.

De cada dilución se coloca 1 ml por duplicado en placas de Petri estéril. Luego se vierten 15 ml de agar VRB en cada placa y se mezclan con movimientos en forma de ocho sobre la mesada. Se dejan solidificar y se incuban, previo rótulo con la dilución que contiene, en forma invertida en estufa de cultivo a 37° C durante 24/48 h. Luego del tiempo de incubación se procede a realizar el recuento de colonias. Se selecciona la placa que tiene entre entre 30 a 300 colonias color rosadas con un halo transparente de mas de 0,5 mm de diametro. Se saca un promedio de las dos placas.

De las colonias presuntivas se toman por lo menos entre cinco y diez por placa y se las transfiere a tubos conteniendo agar Triple Sugar Iron (TSI) en pico de flauta. Se realiza una siembra en superficie con ansa en anillo y una siembra en profundidad con ansa recta. Se incuban los tubos durante 18 a 24 h. El cambio de color del medio a amarillo denota fermentación de la glucosa.

De los tubos que presenten fermentación de la glucosa se toma una porción de cultivo y se realiza la prueba de oxidasa.

Las colonias que den resultado negativo de la prueba de oxidasa y fermentación de la glucosa se consideran Enterobacterias.

Se informa el total de colonias multiplicando por la inversa de la dilución. Por. ej.: en la placa 10^{-5} se contaron 38 colonias, tendremos:

$$38 \times 10^{-5} = 3.800.000 \text{ UFC/g o ml de alimento}$$

4.4.2.-Determinación de *Staphylococcus aureus*

Este método permite determinar la presencia de *Staphylococcus aureus* en 10 g de muestra.

4.4.2.1.- Procedimiento bacteriológico:

Se pesan exactamente 10 g del alimento a analizar. Se le añaden a la muestra de alimento 90 ml de diluyente estéril. Se fricciona la bolsa por 3-5'.

La siembra se realiza por extensión en superficie de la siguiente manera: 1 ml repartido en tres placas conteniendo el medio de Agar Baird Parker. En una placa se colocan 0.4 ml y en las otras dos 0.3 ml. Se incuba a 37 ° C durante 30/48 h. A las 30 h. se cuentan las colonias de color negro, con un halo transparente, se marcan y se vuelven a incubar las placas hasta completar las 48 h. Una vez finalizado en periodo de incubación se cuentan todas las colonias de color negro brillante con o sin halo y se somete una parte proporcional de las colonias sospechosas a la prueba de coagulasa.

Las colonias que den resultado positivo en esta prueba se consideran *S. aureus* confirmadas. Se informa el nro de UFC por g de alimento.

4.4.3. *Salmonella* (ISO y ICMFS)

Este análisis permite determinar la presencia de *Salmonella* en 25 g de muestra.

4.4.3.1 Procedimiento bacteriológico:

Se pesan exactamente 25 g del alimento a analizar. Se le añaden a la muestra de alimento 225 ml de caldo lactosado estéril. Se macera hasta alcanzar la mayor homogenización posible de la "suspensión madre".

Se incuba el caldo en estufa de cultivo a 37°C durante 24 h.

Luego de la incubación se traspasa 1 ml de muestra a un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de caldo selenito y 1 ml a un tubo de ensayo conteniendo caldo Rapaport, se incuban los tubos en estufa de cultivo a 37°C durante 24 h. Desde los tubos se realiza un repique con ansa de Drigalsky a placas de petri conteniendo agar XLD y SS respectivamente, se incuban en estufa de cultivo a 37°C durante 24 h.

De las colonias típicas desarrolladas se realiza un repique para aislamiento de por lo menos 10 colonias a placas conteniendo el mismo medio de donde provienen.

Luego se realiza la prueba de oxidasa y las prueba de IMVIC. Si estas pruebas no permiten determinar el tipo de enterobacteria que estamos examinando se realizan repiques en forma de estría y picadura a agar Triple sugar iron (TSI) en pico de flauta y Fenil alanina. Se incuban a 37°C durante 24 h.

Para la prueba confirmatoria se toman las colonias aisladas y se realiza una siembra por estría en un tubo conteniendo agar Lisina Hierro en pico de flauta. Se incuban los tubos a 37°C durante 24 h. El cambio de color del medio denota presencia de Salmonella.

4.4.4 .Shigella (ISO y ICMFS)

Este análisis permite determinar la presencia de Shigella en 25 g de muestra.

4.4.4.1 Procedimiento bacteriológico:

Se pesan exactamente 25 g del alimento a analizar. Se le añaden a la muestra de alimento 225 ml de caldo estéril para Gram-negativos. Se macera hasta alcanzar la mayor homogenización posible de la "suspensión madre".

Se incuba el caldo en estufa de cultivo a 37°C durante 18 h.

Luego de la incubación se traspasa un alícuota de muestra con ansa y se siembra en estría por agotamiento a por lo menos tres medios sólidos que pueden ser: agar xilosa lisina desoxicolato; agar tergitol 7; agar *Salmonella-Shigella*. Se incuban las placas invertidas en estufa de cultivo a 37°C durante 24 h. Las colonias típicas desarrolladas en agar xilosa lisina presentan un color rojo o rosa de 1 mm de diámetro aprox. Las típicas desarrolladas en agar Tergitol 7 aparecen de color azul y el agar SS aparecen opacas o sin color.

Si hay desarrollo típico en estos medios se toman tres colonias y se repican para aislamiento a agar MacConkey

Para la prueba confirmatoria se toman las colonias aisladas y se realiza una siembra por estría en un tubo conteniendo agar Triple Sugar Iron (TSI) en pico de flauta y por puntura en profundidad. Se incuban los tubos a 37°C durante 12 h. El cambio de color del medio denota presencia de *Shigella* dando como resultado el color rojo en superficie (lactosa -, alcalino) y en profundidad el color amarillo (glucosa +).

4.4.5 Hongos

Por las características de sus colonias se puede realizar el recuento de hongos, o realizar recuentos parciales de levaduras y de mohos.

4.4.5.1 Procedimiento bacteriológico:

Se realizan generalmente diluciones seriadas hasta 10^{-3} de la muestra

Se siembran 1 ml cada dilución por duplicado en placas estériles.

Para esta técnica se utiliza el medio agar YGC fundido y enfriado a 45° C. Se vierten aproximadamente 15 ml de medio en las placas y se homogeneiza con movimientos en forma de ocho.

Una vez solidificado el medio, se incuban las placas en forma invertida en estufa a 25° C durante 5 días.

El recuento se realiza a los 3, 4 y 5 días de incubación.

Al quinto día se seleccionan las placas que contengan un menos de 150 colonias.

Para determinar el resultado se calcula un promedio de los recuentos de las dos placas. Se informa el valor obtenido como UFC/ml.

4.4.6. Presencia de CT CF y *E. coli* presuntivo en 1g

4.4.6.1 Procedimiento bacteriológico:

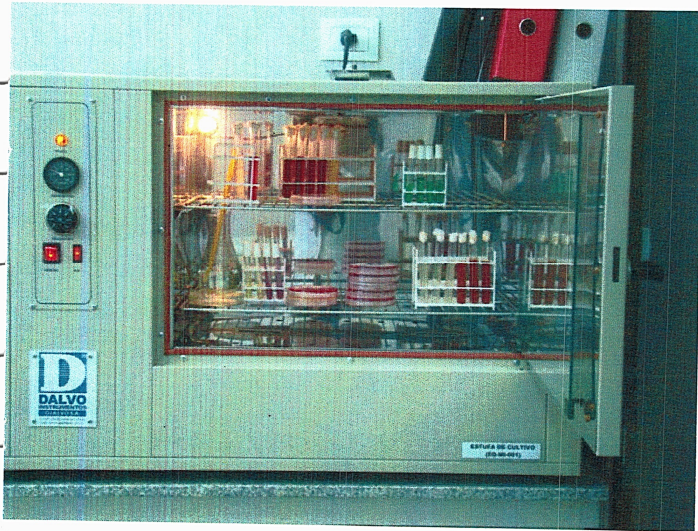
Se pesan exactamente 10 g del alimento a analizar. Se le añaden a la muestra de alimento 90 ml de diluyente estéril en una bolsa estéril, se fricciona por 3 a 5'.

Se toman 10 ml de la suspensión madre y se siembran en un tubo conteniendo 10 ml de caldo Brila doble concentración con campana de Durham. Los tubos se incuban durante 24/48 h. Los que presenten turbidez y producción de gas se

consideran positivos. Para la determinación de coliformes fecales, de los tubos positivos de Brila se traspasa una alícuota a tubos conteniendo 3 ml de caldo E-C con campana de Durham, los cuales se incuban en baño María a 44, 5° C durante 24 h.

Para la determinación de *E coli*, de los tubos positivos de E-C se toma una porción de cultivo con un ansa recta y se repica mediante puntura a un medio agar SIM, se incuban durante 24 h, y se realiza la prueba de indol.

Si la prueba de Indol da resultado positivo, el ensayo se considera positivo. Se informa presencia de *E. coli* en 10 g de alimento.



PARTE II

Evaluación de la eficiencia de tres desinfectantes.

1.- Ensayos para la evaluación de la actividad de salmonicidas de los productos “A” y “B” para ser utilizados en la industria.

Las industrias utilizan continuamente en la desinfección de sus plantas industriales, una gran diversidad de desinfectantes, tanto para las mesadas, pisos y limpieza de equipos como para incluir en el producto final para reducir la carga bacteriana en general y en algunos casos puntuales impedir la proliferación en ese producto alimenticio, de determinada bacteria.

1.2.- Objetivo

1.2.1.- Objetivo general:

- Evaluar la eficacia de los desinfectantes “A” y “B” como salmonicidas utilizados para la desinfección de harinas de pescado.

1.2.1.- Objetivo particular:

- Evaluar la efectividad de los desinfectantes utilizados en el proceso de manufactura de los productos pesqueros teniendo en cuenta las dosis recomendadas de uso y otras concentraciones.

1.3.- Evaluación de la actividad salmonicida de los sanitizantes “A” y “B”.

A partir de las muestras originales se prepararon las concentraciones a evaluar. Las diluciones se conservaron en tubos de ensayo en refrigeración durante el periodo de ensayo.

Dosis de uso evaluada: de 2 litros por cada 1000 Kg. de harina de pescado (0,2%)
de 5 litros por cada 1000 Kg. de harina de pescado (0,5%)

1.3.1.- Procedimiento para evaluación del salmonicida "A" en harina de pescado.

Este procedimiento se llevo a cabo teniendo en cuenta la solución recomendada por el proveedor, es decir se partió de una concentración 0,2 % y se continuó con una concentración 0,5 %. Los ensayos se realizaron por duplicado teniendo en cuenta las mismas condiciones de trabajo que en la fábrica.

1.3.1.1.- Ensayo 1 (concentración del desinfectante 0,5%)

Previo a los ensayos se esterilizaron 600 g de harina de pescado en autoclave.

Para la realización del presente ensayo se siguieron los siguientes pasos:

1º) Se tomaron 50 g de harina de pescado estéril y se colocaron dentro de una bolsa estéril.

2º) Se agrego a la bolsa 1 ml de un cultivo de *Salmonella* spp. de concentración 36×10 UFC/ml que se distribuyo por toda la muestra, lo mas uniformemente posible.

3º) Se agrego a la muestra inoculada 1 ml de una dilución 1/10 del salmonicida "A" lo que equivale a 0.1 ml de de salmonicida en 50 g de harina (concentración final de 0,2%).

El ensayo se continuo con los pasos del procedimiento estandarizado de siembra para la determinación de *Salmonella* spp. en 25 g

1.3.1.1.- Ensayo 2

Se realizo el mismo procedimiento que para el ensayo 1 pero con diferente concentración del salmonicida (0,5%).

Se agrego a la muestra de harina estéril inoculada con la cepa de *Salmonella* spp., 1 M^a de una dilución 2.5/7,5 del salmonicida "A" lo que equivale a 0.25 ml de de salmonicida en 50 g de harina (0,5%)

El ensayo se continuo con los pasos del procedimiento estandarizado de siembra para la determinación de *Salmonella* spp. en 25 g

1.3.2.- Procedimiento para evaluación del salmonicida “B” en harina de pescado.

Este procedimiento se realizo en el ensayo 3 con una concentración 0,2 % y en el ensayo 4, con una concentración 0,5 %. Los ensayos se realizaron por duplicado teniendo en cuenta las mismas condiciones de trabajo que en la fábrica.

1.3.2.1.- Ensayo 3

Para la realización del presente ensayo se siguieron los siguientes pasos:

1º) Se tomaron 50 g de harina de pescado estéril y se colocaron dentro de una bolsa estéril.

2º) Se agrego a la bolsa 1 ml de un cultivo de *Salmonella* spp. de concentración 36×10 UFC/ml que se distribuyo por toda la muestra, lo mas uniformemente posible.

3º) Se agrego a la muestra inoculada 1 ml de una dilución 1/10 del salmonicida “B” lo que equivale a 0.1 ml de de salmonicida en 50 g de harina (0,2%)

El ensayo se continuo con los pasos del procedimiento estandarizado de siembra para la determinación de *Salmonella* spp. en 25 g

1.3.2.2.- Ensayo 4

Se realizo el mismo procedimiento que con la muestra anterior pero con diferente concentración del salmonicida.

Para ello se agrego a la muestra inoculada 1 ml de una dilución 2.5/7,5 del salmonicida “B” lo que equivale a 0.25 ml de de salmonicida en 50 g de harina (0,5%)

El ensayo se continuo con los pasos del procedimiento estandarizado de siembra para la determinación de *Salmonella* spp. en 25 g

1.4.- Evaluación de los resultados:

En la tabla N° 1 se puede observar los resultados obtenidos con las distintas concentraciones del salmonicida "A"

Tabla N° 1: Recuperación de Salmonella spp. después de la acción del desinfectante "A" a 0.2 % y 0,5 %

DESINFECTANTE	0,2 %	0,5 %
MUESTRA "A"	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento moderado)	No se recupera <i>Salmonella</i> spp.
MUESTRA "A" Duplicado	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento moderado)	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento escaso)

Los resultados obtenidos con el salmonicida "B" utilizando la concentración de 0.2 % y 0,5 % se observan en la tabla N° 2.

Tabla N° 2: Recuperación de Salmonella spp. después de la acción del desinfectante "B" a 0.2 % y 0,5 %

DESINFECTANTE	0,2 %	0,5 %
MUESTRA "B"	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento abundante)	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento abundante)
MUESTRA "B" Duplicado	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento abundante)	<i>Salmonella</i> spp. (crecimiento abundante)

1.5.- Comentarios:

Se podría concluir en base a los resultados *in Vitro* sobre la eficacia de los dos desinfectantes evaluados que:

El desinfectante "A" en la concentración 0,5% de las dos placas evaluadas solo se recupera *Salmonella* spp. en una ellas. Por lo cual no es buena su efectividad

El desinfectante "A" en la concentración 0,2% carece de acción salmonicida

El desinfectante "B" a 0,2 y a 0,5 carece de actividad salmonicida.

2- Evaluación de la actividad bactericida del desinfectante "C" a distintas concentraciones de uso y a distintos tiempos de exposición.

En este ensayo se evaluó la actividad de desinfectante "C" para ser utilizado en pisos y mesadas durante las distintas etapas del procesamiento industrial.

2.1.- Objetivo general:

- Evaluar la eficacia del desinfectante "C" como bactericida utilizado para la desinfección de superficies y procesos en la industria.

2.1.- Objetivo particular:

- Evaluar la efectividad del desinfectante utilizados en el proceso industrial de manufactura de los productos alimenticios teniendo en cuenta las dosis recomendadas de uso.

- Estimar el tiempo de contacto de las células bacterianas con el desinfectante a diferentes concentraciones.

2.2.- Procedimiento para la evaluación *in Vitro*.

Para la realización de este ensayo se prepararon distintas suspensiones bacterianas de cepas de *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis* y *Klebsiella spp.* A las cuales se les efectuó individualmente el recuento total de bacterias ajustándose a concentraciones de 100 UFC/ml; 1000 UFC/ml y 10000 UFC/ml. Las mismas se conservaron en refrigeración para ser utilizadas en los distintos ensayos.

El desinfectante se utilizó al 0,5 y al 1 %.

Los ensayos se realizaron por recuentos totales de bacterias en placas por duplicado teniendo en cuenta para cada uno de ellos, las mismas condiciones de trabajo.

Cada una de las suspensiones bacterianas se enfrentó con las distintas concentraciones del desinfectante y se evaluó a los 1, 15 y 30' de exposición.

2.2.1.- Ensayo *E coli*, 100 + desinfectante al 0,5%

1º) Previo al contacto con el desinfectante, se realizaron siembras control por duplicado de *E. coli* 100 en medio agar cristal violeta rojo y bilis (VRB), para determinar la carga inicial de la suspensión bacteriana.

2º) A un tubo conteniendo 9 ml de la suspensión de *E coli* 100 se le agrego 1 ml de "C" al 0,5 %. Se homogeneizo la muestra y al minuto de contacto se sembró por duplicado 1 ml en cada placa de Petri estéril. Se agrego el medio de agar VRB. Se incubo en estufa a 37 durante 48 h y se realizo el recuento bacteriano.

3º) Este procedimiento se repitió a los 15 y a los 30 minutos de contacto.

2.2.2.- Ensayo *E coli* 1000 + desinfectante al 0,5%

1º) Se realizo la siembra control de la suspensión bacteriana, y como la carga bacteriana original era superior a 300 UFC/ml se realizo una dilución control 10^{-1} la cual también se sembró para el recuento de bacterias posteriormente esta dilución se descarto.

2º) A la suspensión bacteriana se le agrego 1 ml de "C" al 0,5 %. Se homogeneizo la muestra. Al minuto de contacto se inoculo 1 ml de la muestra en dos placas de Petri estériles y se realizo una dilución 10^{-1} y se sembró 1 ml de esta dilución en otras dos placas y se descarto la dilución. Se les agrego a todas las placas de Petri, el medio de agar VRB. Se incubaron en estufa a 37° C, durante 48 h y posteriormente se realizaron los recuentos.

3º) Este procedimiento se repitió a los 15 y a los 30 minutos de contacto.

2.2.3.- Ensayo *E. coli* 10000 + desinfectante al 0,5%

1º) Se realizo la siembra control de la suspensión bacteriana, y como la carga bacteriana original era superior a 300 UFC/M^a se realizaron las diluciones controles 10^{-1} y de 10^{-2} las cuales también se sembraron para el recuento de bacterias,

posteriormente estas dos diluciones se descartaron. Se les agrego el agar VRB. Las placas se incubaron en estufa a 37° C durante 48 h, se realizaron los recuentos.

2º) A la suspensión bacteriana se le agrego 1 ml de "C" al 0,5 %. Se homogeneizo la muestra. Al minuto de contacto se inoculo 1 ml de la muestra en dos placas de Petri estériles y se realizaron las diluciones 10^{-1} y de 10^{-2} de ambas diluciones se sembró 1 ml en otras dos placas y se descartaron estas diluciones. Se les agrego a todas las placas de Petri, el medio de agar VRB. Se incubaron en estufa a 37° C, durante 48 h y posteriormente se realizaron los recuentos.

3º) Este procedimiento se repitió a los 15 y a los 30 minutos de contacto.

2.2.4.- Ensayo *E coli*, 100 + desinfectante al 1%

2.2.5.- Ensayo *E coli*, 1000 + desinfectante al 1%

2.2.6.- Ensayo *E coli*, 10000 + desinfectante al 1%

Para estos ensayos se enfrento la suspensión bacteriana con el desinfectante al 1%, el procedimiento para efectuar los recuentos bacterianos fue igual que en aquellos que se utilizo el desinfectante al 0,5%.

2.2.7.- Ensayo *Citrobacter freundii* 100 + desinfectante al 0,5%

2.2.8.- Ensayo *Citrobacter freundii* 1000 + desinfectante al 0,5%

2.2.9.- Ensayo *Citrobacter freundii* 10000 + desinfectante al 0,5%

2.2.10.- Ensayo *Citrobacter freundii* 100 + desinfectante al 1%

2.2.11.- Ensayo *Citrobacter freundii* 1000 + desinfectante al 1%

2.2.12.- Ensayo *Citrobacter freundii* 1000 + desinfectante al 1%

Para estos ensayos se utilizo una cepa de *Citrobacter freundii* con distintas suspensiones bacterianas y se puso en contacto con el desinfectante al 0,5% y con el 1%. El procesamiento para los recuentos fue similar al efectuado para la suspensiones de *E. coli*

2.2.13.- Ensayo *Klebsiella* spp. 100 + desinfectante al 0,5%

2.2.14.- Ensayo *Klebsiella* spp. 1000 + desinfectante al 0,5%

2.2.14.- Ensayo *Klebsiella* spp. 10000 + desinfectante al 0,5%

2.2.15.- Ensayo *Klebsiella* spp. 100 + desinfectante al 1%

2.2.16.- Ensayo *Klebsiella* spp. 1000 + desinfectante al 1%

2.2.17.- Ensayo *Klebsiella* spp. 10000 + desinfectante al 1%

Para estos ensayos se utilizo una cepa de *Klebsiella* spp. con distintas suspensiones bacterianas y se puso en contacto con el desinfectante al 0,5% y con el 1%. El procesamiento para los recuentos fue similar al efectuado para la suspensiones de *E. coli*

2.2.18.- Ensayo *Proteus* spp. 100 + desinfectante al 0,5%

2.2.19.- Ensayo *Proteus* spp. 1000 + desinfectante al 0,5%

2.2.19.- Ensayo *Proteus* spp. 10000 + desinfectante al 0,5%

2.2.20.- Ensayo *Proteus* spp. 100 + desinfectante al 1%

2.2.21.- Ensayo *Proteus* spp. 1000 + desinfectante al 1%

2.2.22.- Ensayo *Proteus* spp. 1000 + desinfectante al 1%

Para estos ensayos se utilizo una cepa de *Proteus* spp. con distintas suspensiones bacterianas y se puso en contacto con el desinfectante al 0,5% y con el 1%. El procesamiento para los recuentos fue similar al efectuado para la suspensiones de *E. coli*

2.3.- Resultados de los ensayos con desinfectante "C" a concentraciones de 0,5 % y al 1% para las distintas cepas utilizadas.

2.3.1. Ensayos: *Escherichia coli*

Resultado de los recuentos de los controles de las suspensiones de *E.coli*

E coli 100	11 UFC/ml
E coli 1000	598 UFC/ml
E coli 10000	9850 UFC/ml

En la tabla N° 3 y N° 4 se pueden observar los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos poniendo en contacto el desinfectante "C" con distintas concentraciones de *E. coli* y realizando los recuentos a los 1, 5 y 30'

Tabla N° 3 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% a los 1; 5 y 10' con distintas concentraciones de *E. coli*

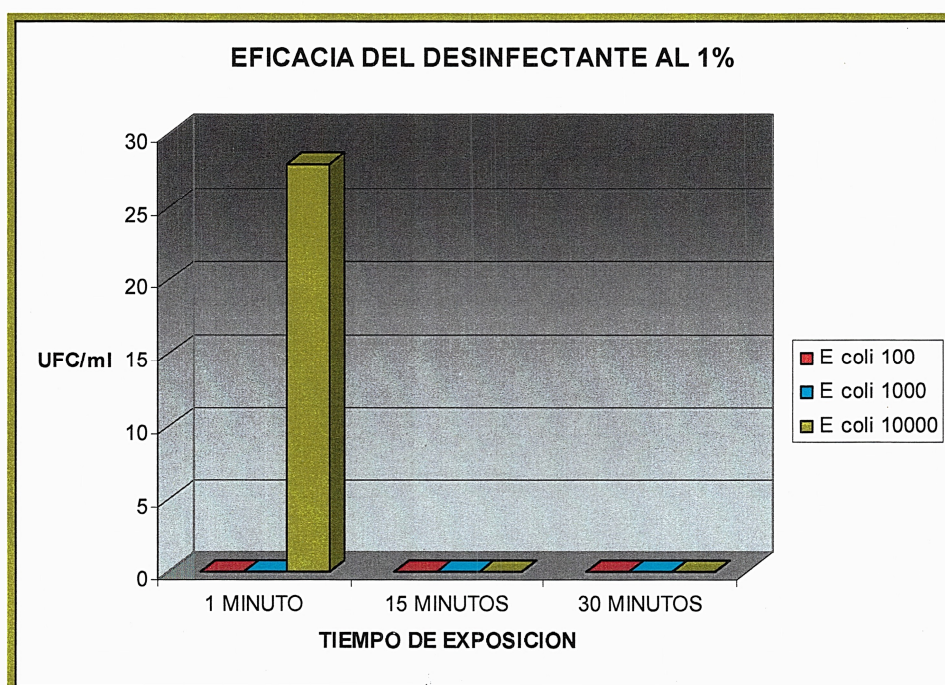
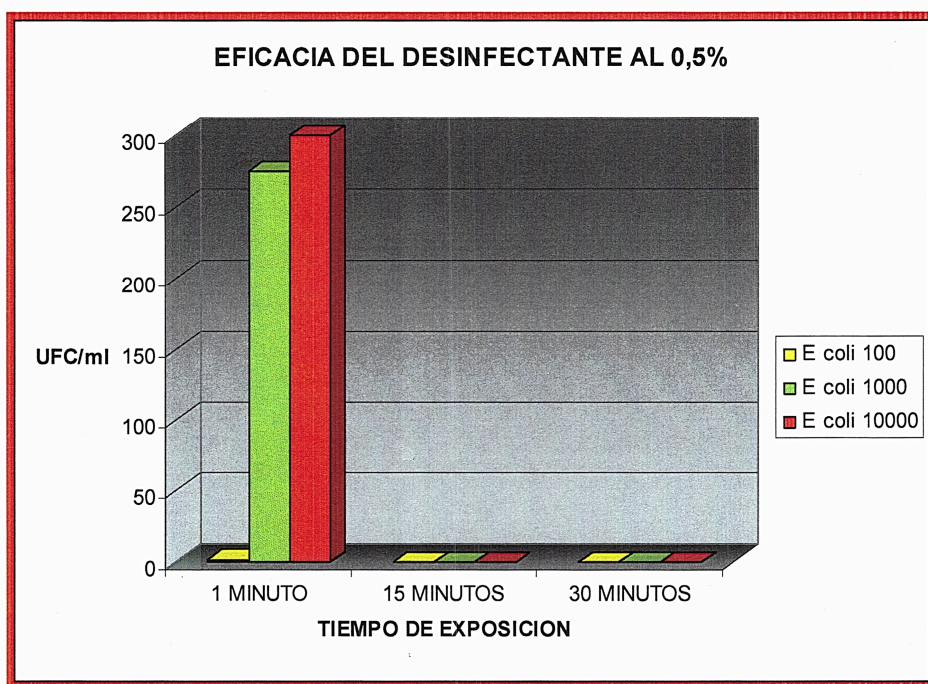
DESINFECTANTE AL 0,5 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
E coli 100	2 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
E coli 1000	275 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
E coli 10000	300 UFC/ml	0 UFC/ml	C/ml

Tabla N° 4 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 1% a los 1; 5 y 10' con distintas concentraciones de *E. coli*

DESINFECTANTE AL 1 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
E coli 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
E coli 1000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
E coli 10000	28 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml



En los gráficos N° 1 y 2 se visualizan los recuentos obtenidos al 1' de exposición. Los mismos fueron altos para *E. coli* mientras que a los 15 y 30' no se observa desarrollo.



2.3.2.- Ensayos *Citrobacter freundii*

Resultado de los recuentos de los controles de las suspensiones de *E.coli*

Citrobacter freundii 100	4 UFC/ml
Citrobacter freundii 1000	160 UFC/ml
Citrobacter freundii 10000	2050 UFC/ml

En las tablas N° 5 y N° 6 se muestran los resultados obtenidos de los recuentos de *Citrobacter* post-contacto con el desinfectante "C" a los distintos tiempos de exposición.

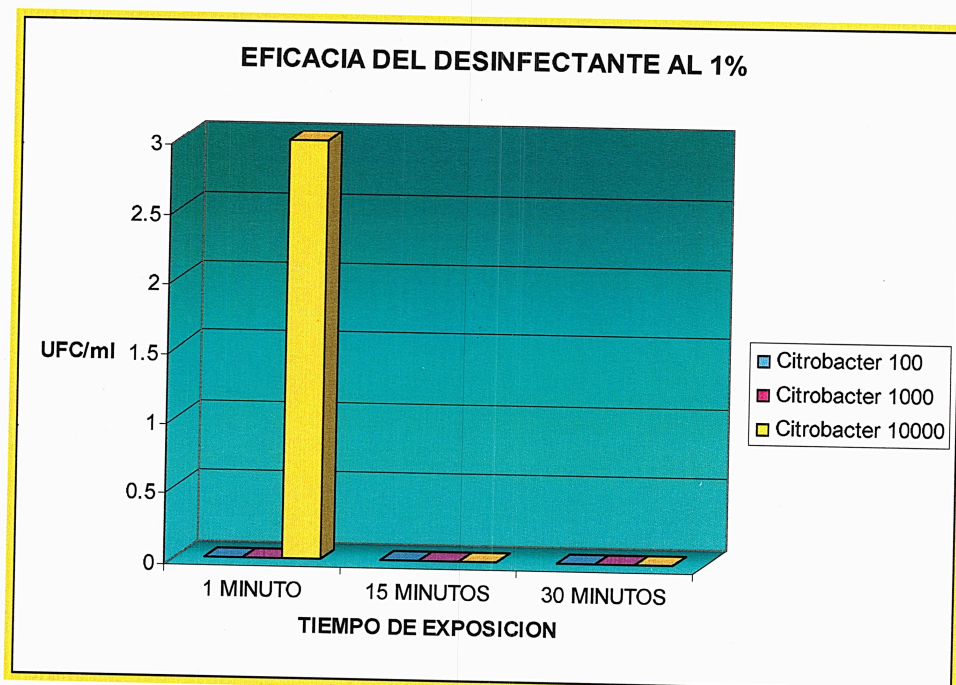
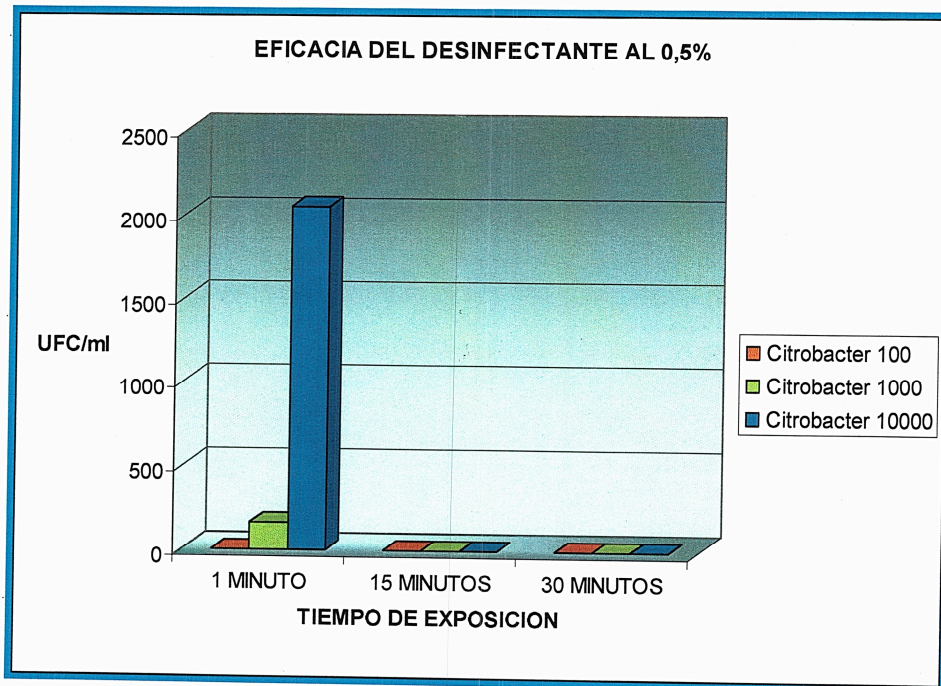
Tabla N° 5 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% a los 1; 5 y 10' con distintas concentraciones de *Citrobacter freundii*

DESINFECTANTE AL 0,5 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Citrobacter 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Citrobacter 1000	160 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Citrobacter 10000	2050 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

Tabla N° 6 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 1% a los 1; 5 y 10' con distintas concentraciones de *Citrobacter freundii*

DESINFECTANTE AL 1 %	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Citrobacter 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Citrobacter 1000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Citrobacter 10000	3 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

En el grafico N° 3 se puede observar que el mayor crecimiento bacteriano se obtiene en los recuentos al 1' de exposición con el desinfectante al 0,5% para la suspensión de *Citrobacter freundii* 10000, mientras que con el desinfectante al 1% el recuento fue bajo para la suspensión de *Citrobacter freundii* 10000 (Grafico N° 4)



2.3.2.-

Ensayos *Klebsiella* spp.

Resultado de los recuentos de los controles de las suspensiones de *Klebsiella* spp.

Klebsiella 100	174 UFC/ml
Klebsiella 1000	800 UFC/ml
Klebsiella 10000	10700 UFC/ml

En la tabla N° 7 y N° 8 se pueden observar los resultados de los recuentos bacterianos obtenidos poniendo en contacto el desinfectante "C" con distintas concentraciones de *Klebsiella* y realizando los recuentos a los 1, 5 y 30´

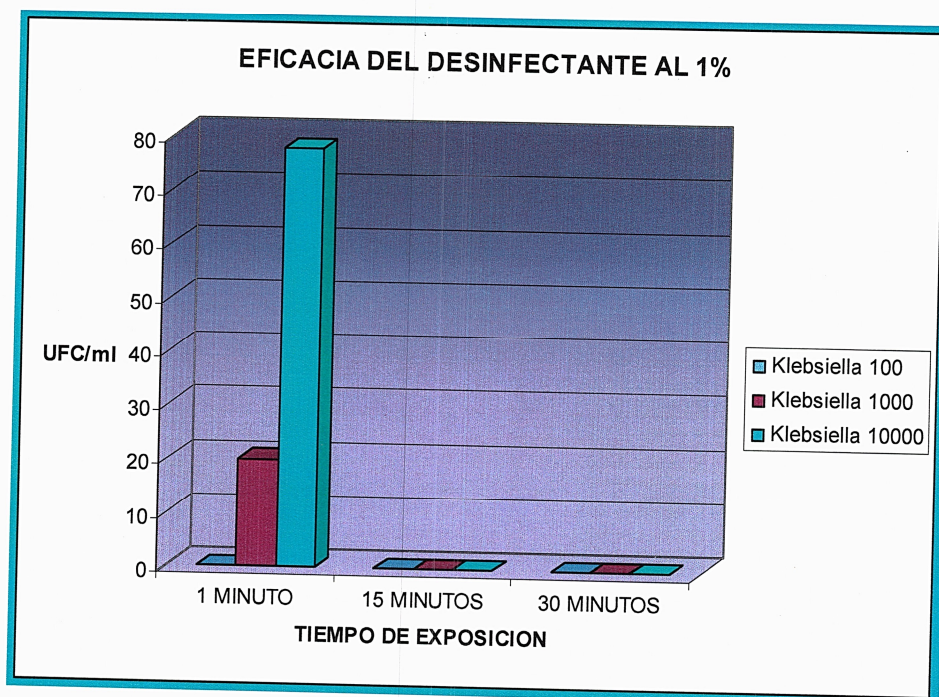
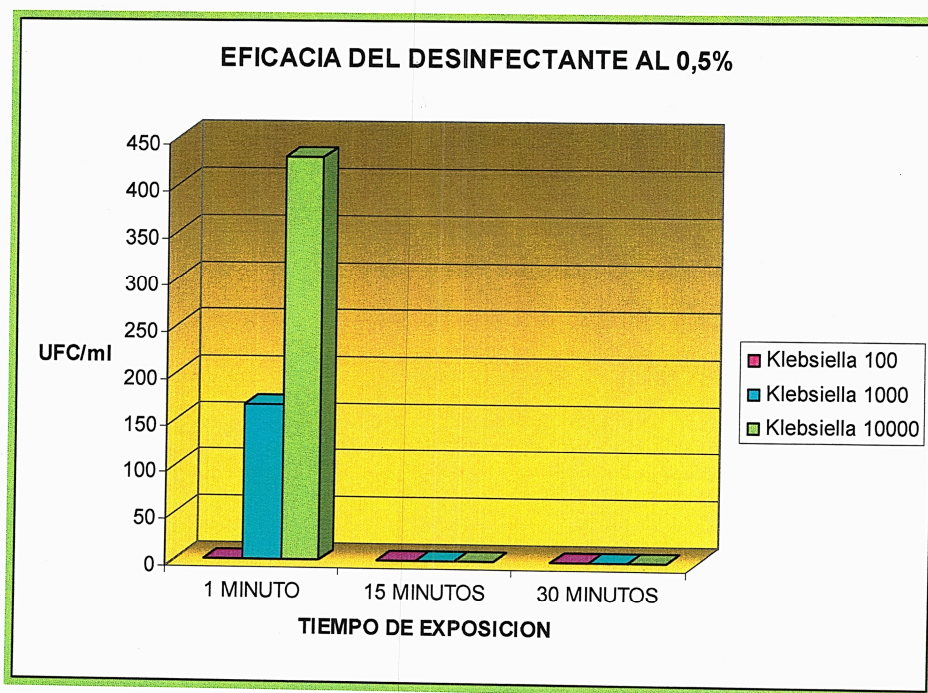
Tabla N° 7 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% al minutos, a los; 5 y 10´ con distintas concentraciones de *Klebsiella* spp.

DESINFECTANTE AL 0,5 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Klebsiella 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Klebsiella 1000	167 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Klebsiella 10000	431 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

Tabla N° 8 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% al minutos, a los; 5 y 10´ con distintas concentraciones de *Klebsiella* spp.

DESINFECTANTE AL 1 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
Klebsiella 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Klebsiella 1000	20 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
Klebsiella 10000	78 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

En los gráficos N° 5 y 6 se visualizan los recuentos obtenidos al 1' de exposición. Los mismos fueron altos para *Klebsiella sp* mientras que a los 15 y 30' no se observa desarrollo.



Proteus mirabilis

Proteus mirabilis 100 Promedio de crecimiento: 41 UFC/ml
 Proteus mirabilis 1000 Promedio de crecimiento: 60 UFC/ml
 Proteus mirabilis 10000 Promedio de crecimiento: 3400 UFC/ml

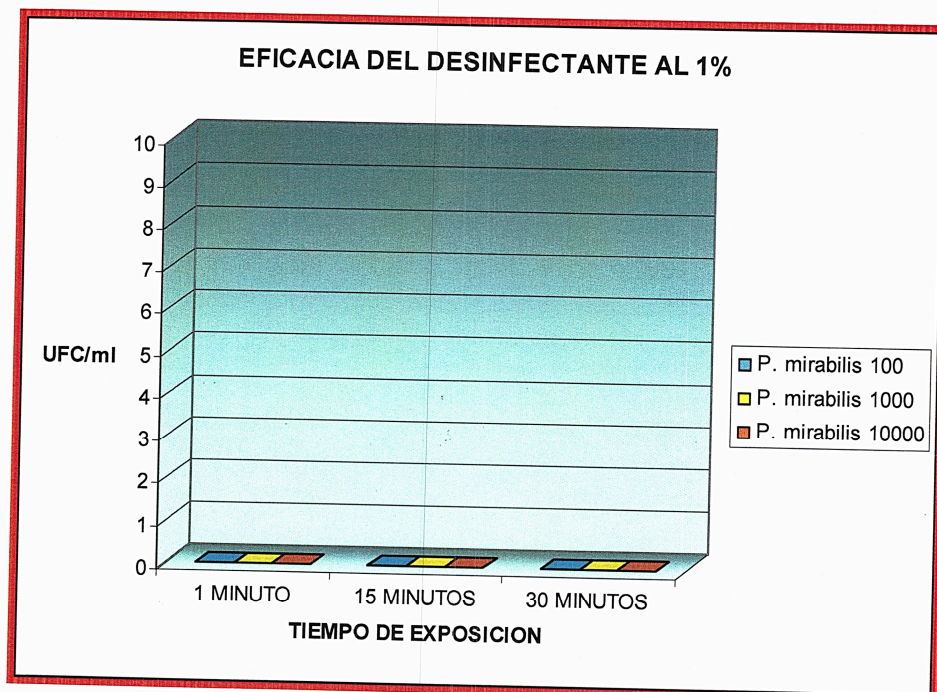
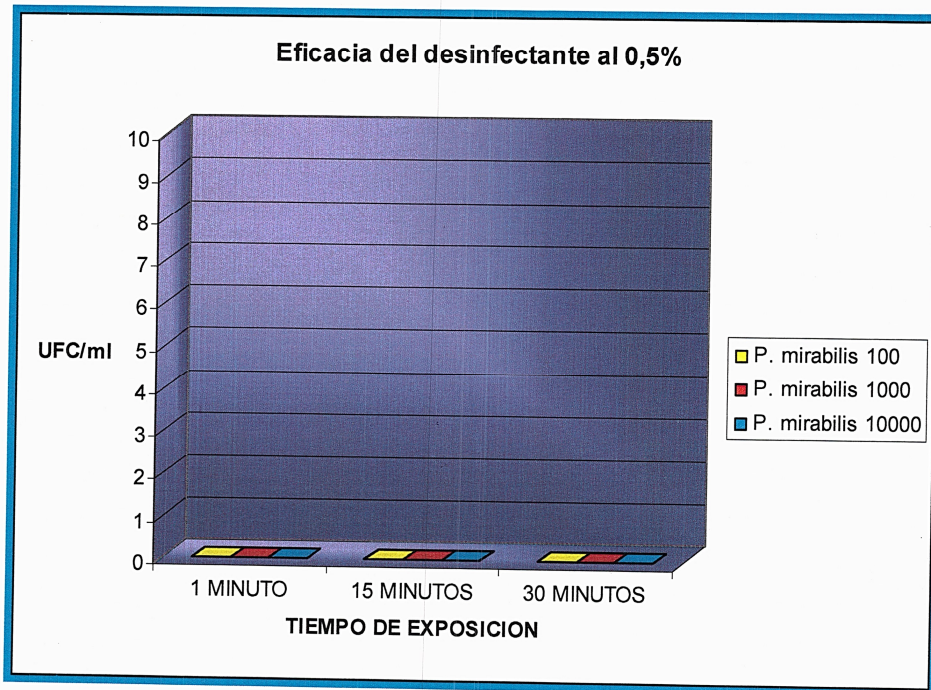
Tabla N° 9 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% al minutos, a los; 5 y 10' con distintas concentraciones de *Klebsiella* spp

DESINFECTANTE AL 0,5 %.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
P. mirabilis 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
P. mirabilis 1000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
P. mirabilis 10000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

Tabla N° 10 Resultados de la exposición del desinfectante "C" al 0,5% al minutos, a los; 5 y 10' con distintas concentraciones de *Klebsiella* spp

DESINFECTANTE AL 1%.	1 MINUTO	15 MINUTOS	30 MINUTOS
P. mirabilis 100	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
P. mirabilis 1000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml
P. mirabilis 10000	0 UFC/ml	0 UFC/ml	0 UFC/ml

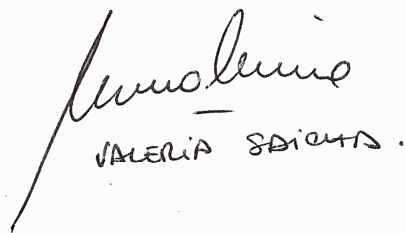
En los gráficos N° 7 y 8 se visualizan los recuentos obtenidos al 1', a los 15 y a los 30 minutos de exposición con el desinfectante "C", no observandose desarrollo en ninguno de los ensayos.

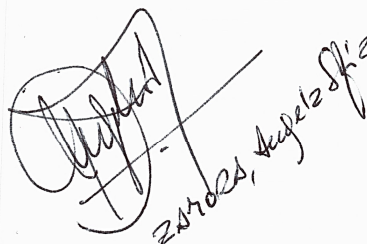


Comentarios:

De los resultados de los ensayos realizados se podría concluir:

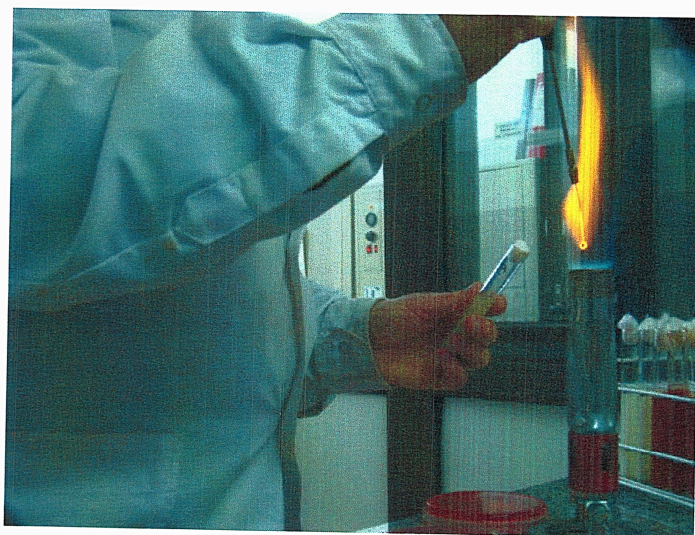
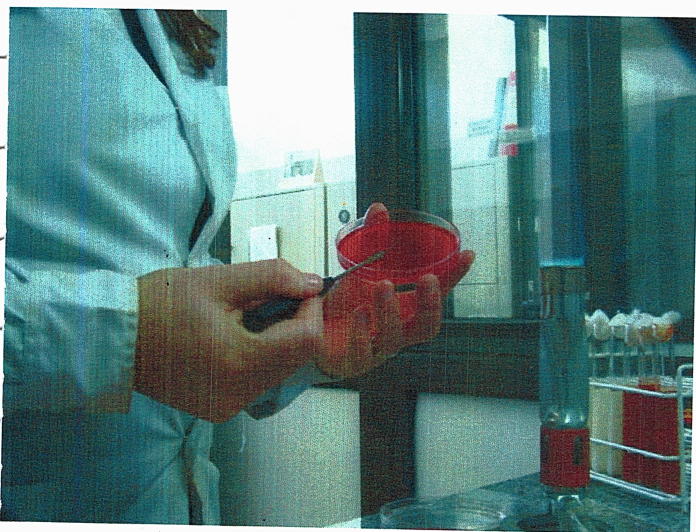
- el desinfectante "C" resulto ser el 100% efectivo con los cuatro microorganismos utilizados a distintas concentraciones y a los tiempos de contacto de 15 y 30 minutos.
- La exposición de 1 minuto, con el desinfectante "C" frente a concentraciones de 1000 y 10000 de todas las cepas utilizadas, redujo la carga bacteriana considerablemente, mientras que para la concentración de 100 fue el 100% efectivo con excepción de *E. coli*
- Para *Proteus mirabilis* los resultados revelaron una efectividad del 100% de inhibición en todos los ensayos, tanto a distintas concentraciones como a diferentes tiempos de exposición.


VALERIA SAICHA.


ZSOLT, Angeliz

BIBLIOGRAFIA

- CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO. Capitulo XX. Agua potable. Artículo 982 (Res Con SPR y RS y SAGPyA N° 68/2007 y 196/2007)
- American Public Health Association (APHA), American Water Work Association and Water Pollution Control Federation. 1998. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington, D.C. USA. Parte 9000.
- ICMSF (1982). Microorganismos de los alimentos. Técnicas de Análisis microbiológico Vol. 1 páginas: 113-129
- Food and Drug Administration (FDA) "Bacteriological Analytical Manual". 1998



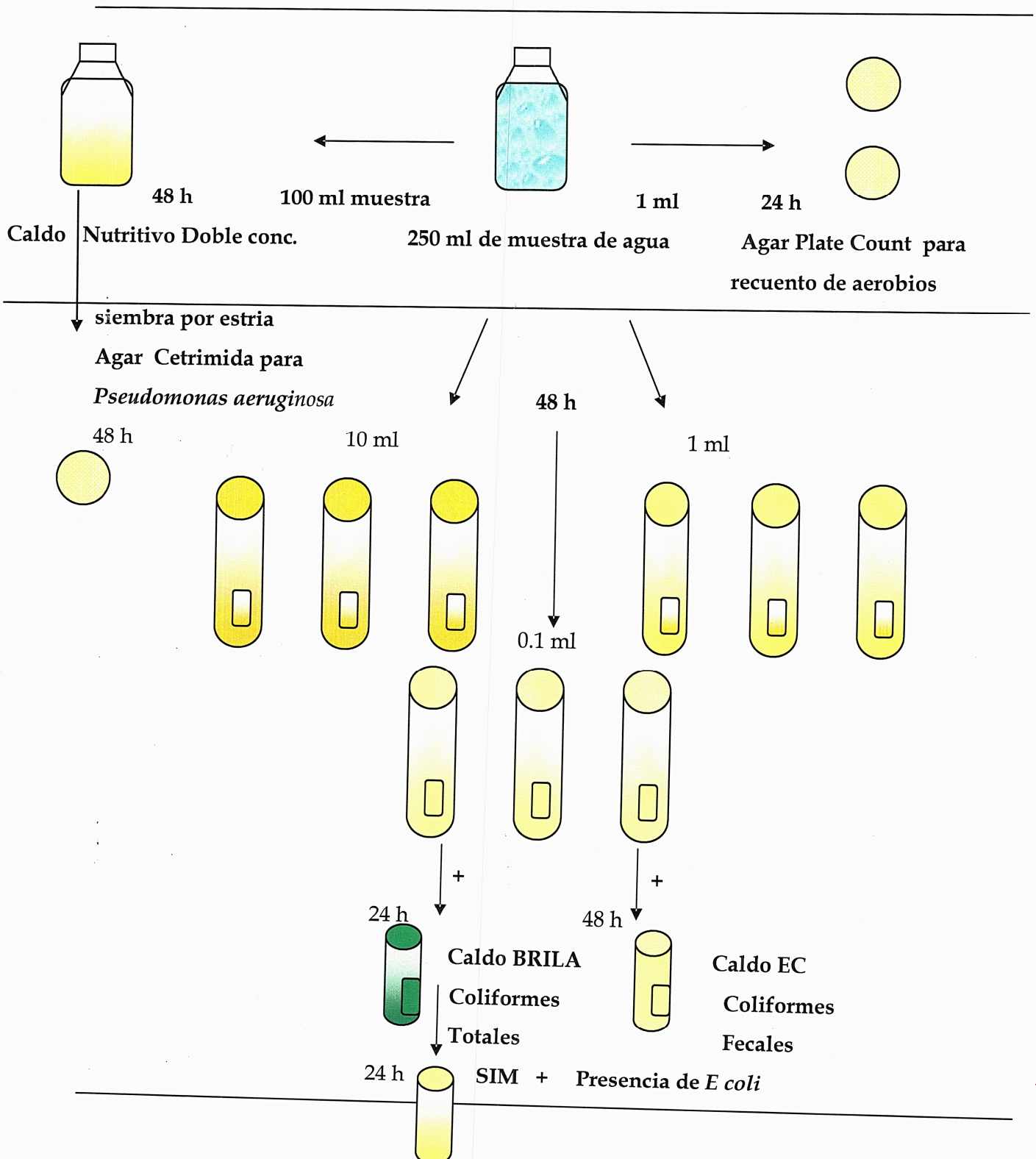
Apendice 1

Tabla 1: Combinación de tubos positivos y negativos para establecer el Número Más Probable (NMP) de bacterias por 100 ml de agua.

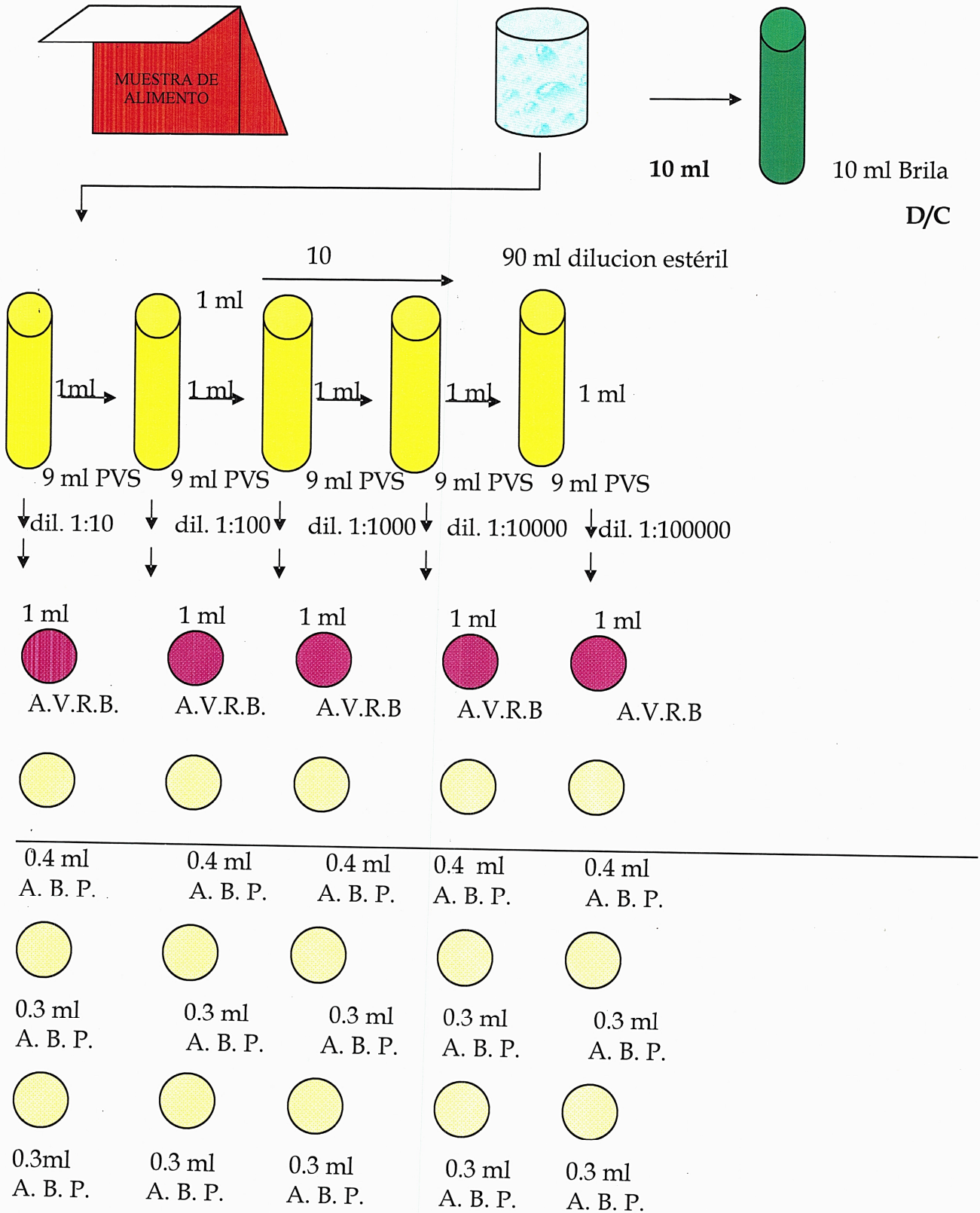
Número de tubos positivos			NMP por 100 ml	Límite de confianza (95%)	
3 con 10 ml	3 con 1 ml	3 con 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	1	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Apendice II

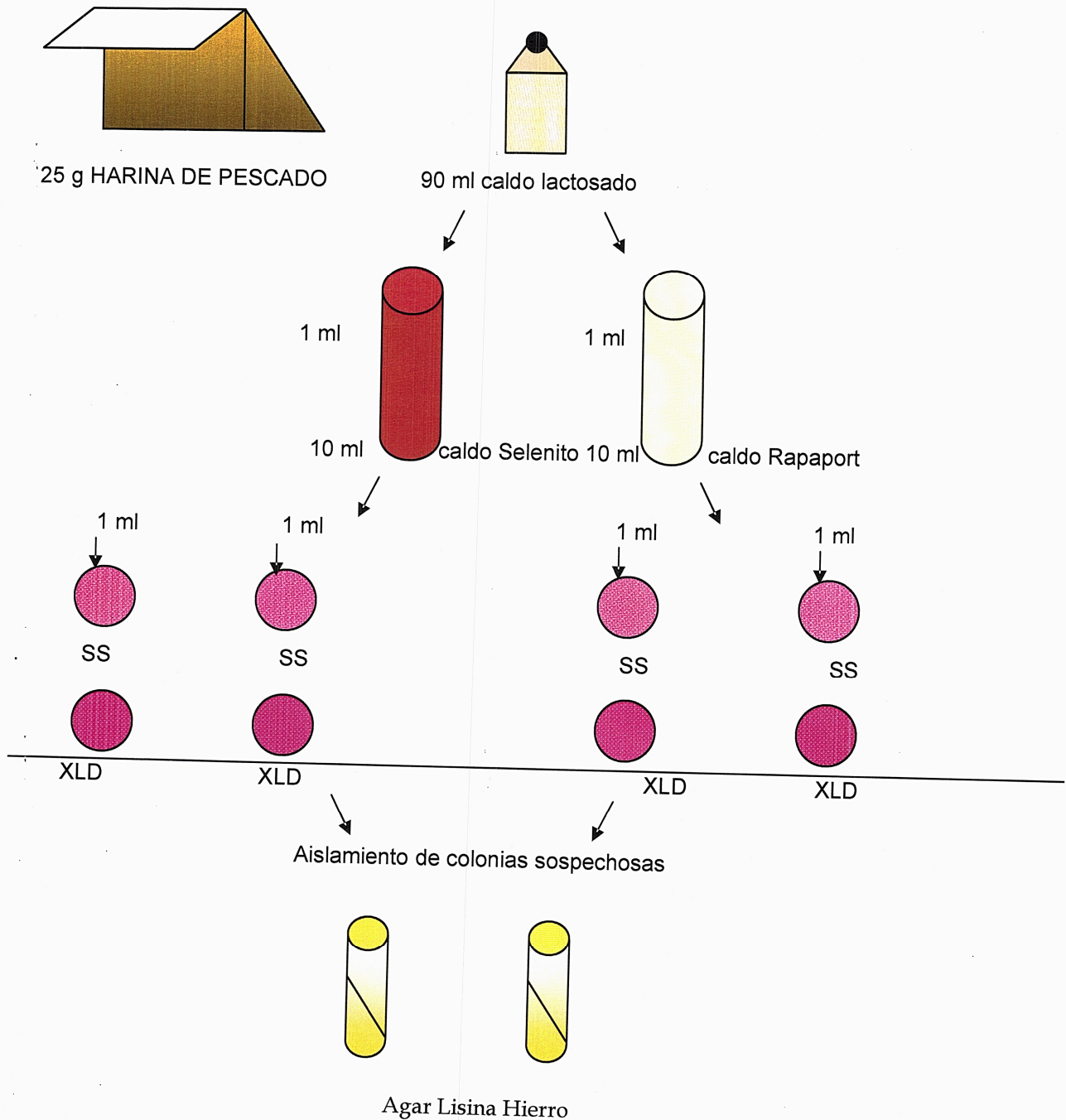
Esquema de trabajo para las técnicas de evaluación de agua potable según CAA



Esquema de trabajo para la determinación de Enterobacterias y *Staphylococcus aureus*.



Esquema de trabajo para la determinación de *Salmonella* spp.



Apendice III

Medios de cultivo y reactivos

Caldo Lauril sulfato

Medio selectivo para el ensayo coliformes presuntivos y para el enriquecimiento selectivo de los mismos. Debido a su elevada calidad nutritiva y al tampón de fosfatos, se produce un rápido crecimiento y una intensa producción de gas, aún en las bacterias coliformes de fermentación lenta. El lauril sulfato inhibe notablemente el crecimiento de las bacterias ajenas al grupo coliformes.

Composición (g/l): Triptosa 10 g, K_2HPO_4 2,75 g, KH_2PO_4 2,75 g, NaCl 5 g, lactosa 5 g, sodio laurilsulfato 0,1 g.

Preparación: disolver los componentes (35,6 g) en un litro de agua destilada, mezclar bien, ajustar pH a 6,8. Distribuir 10 ml por tubo que contienen una campana de Durham, esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

La preparación de 35,6 g en un litro de agua destilada a la concentración correcta es denominada simple concentración. Cuando se siembra 10 ml de la muestra de agua se debe pesar 71,6 g en un litro de agua destilada, se usa a concentración doble.

Caldo Nutritivo

Es un caldo de uso general para una amplia variedad de microorganismos sin requerimientos nutricionales especiales.

Composición (g/l): peptona de carne 5 g, extracto de carne 3 g.

Preparación: disolver en 1 litro de agua destilada, fraccionar en tubos (1 ml por tubo) esterilizar en autoclave (15 min a 121° C). El caldo preparado es de color ámbar, sin precipitado. pH: 6.8 ± 0.2 .

Interpretación: incubar 2 a 4 días a $35 \pm 1^\circ$ C. La aparición de precipitado en el fondo del tubo indica crecimiento bacteriano.

Caldo Brila

Medio utilizado para el enriquecimiento selectivo de coliformes. Contiene bilis y verde brillante que inhiben la flora acompañante y permiten el desarrollo de coliformes totales.

Composición (g/l): peptona de carne 10 g, lactosa 10 g, bilis de buey desecada 20 g, verde brillante 0,133 g.

Preparación: Disolver el medio en 1 litro de agua destilada, ajustar pH 7,2 y distribuir en tubos de ensayo provistos de campana de Durham en su interior y esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Caldo E-C

Permite el crecimiento selectivo de coliformes y *Escherichia coli*. El contenido de lactosa favorece especialmente a los coliformes y *E. coli*; las sales biliares inhiben el desarrollo de gérmenes no correspondientes al grupo de coliformes fecales.

Composición (g/l): peptona de caseína 20 g, lactosa 5 g, mezcla de sales biliares 1,5 g, NaCl 5 g, K₂HPO₄ 4 g, KH₂PO₄ 1,5 g.

Preparación: Disolver en 1 litro de agua destilada, ajustar pH 6,9 (aproximadamente) distribuir 10 ml por tubo que contienen campanas de Durham y esterilizar en autoclave (121° C - 15 minutos).

Agar para recuentos en placa (APC)

Medio general utilizado para el recuento de microorganismos a partir de distintos orígenes.

Composición (g/l): digerido pancreático de caseína 5; extracto de levadura 2,5; dextrosa 1; agar-agar 15.

Preparación: suspender 23,5g en 1l de agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo. Posteriormente, autoclavaza 121°C durante 15 minutos. pH final: 7 ± 0,2.

Medio SIM

Es un cultivo de ensayo para comprobar la formación de sulfuro, la producción de indol y movilidad en el marco del diagnóstico de Enterobacteriaceas.

Composición (g/l): Triptona 20 g, peptona 6,1 g, FeSO₄(NH₄) 0,2 g, Na Tiosulfato 0,2 g, agar-agar 3,5.

Preparación: suspender en un litro de agua destilada y hervir hasta disolver completamente el medio. Distribuir en tubos (4 ml por tubo) y esterilizar en el autoclave a 121° C durante 15'.

Técnica: Inocular el medio SIM, que contiene triptofano, con el microorganismo en estudio por medio de una puntura central con ansa recta e incubar a 35° durante 24 h. Al finalizar este período, añadir 5 gotas de xilol o cloroformo y posteriormente 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo.

Interpretación: El desarrollo de un color rojo fucsia en la capa del diluyente orgánico segundos después de añadir el reactivo indica la presencia de indol y una prueba positiva. La movilidad se pone de manifiesto por la turbidez difusa alrededor del canal de la puntura. La formación de sulfuro se reconoce por el ennegrecimiento de la zona de crecimiento.

Agar Cetrimida

Este medio permite el aislamiento y diferenciación de *Pseudomonas aeruginosa*.

Composición (g/l): 20 Peptona de gelatina; 1.4 cloruro de magnesio; 10 sulfato potásico; 0.3 N-cetil, N, N, trimetilamonibromuro (cetrimida); 13 Agar-agar.

Preparación: Disolver 44.5 g/l, añadir 10 ml/l de glicerina, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 °C) y verter en placas. pH: 7.2 ± 0.2.

Interpretación: Las colonias de *Pseudomonas aeruginosa* forman un pigmento verde-azulado (piocianina) y son fluorescentes a la luz UV.

Caldo RM/VP (Rojo de metilo - Voges-Proskauer según Clark y Lubs)

Es un caldo que permite estudiar las diferentes rutas metabólicas (vía de los ácidos mixtos o Butilenglicólica) que llevan a cabo los microorganismos cuando fermentan los azúcares del medio.

Composición (g/l): peptona de carne 7; D (+)- glucosa 5; tampón de fosfatos 5.

Preparación: disolver en agua destilada; distribuir en tubos a razón de 5 ml y esterilizar en autoclave (15 minutos a 121° C). pH = 6.9 ± 0.1.

Agar Citrato de Simmons

Este medio determina la capacidad de un organismo de utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo.

Composición (g/l): fosfato dihidrógeno amonio 1; fosfato dipotásico 1; NaCl 5; citrato de sodio 2; sulfato de magnesio 0,2; azul de bromotimol 0,08; agar-agar 15.

Preparación: pesar 24,2g en 1l de agua destilada. Mezclar frecuentemente. Calentar con agitación y hervir por 1minuto hasta completar su disolución. Fraccionar en los respectivos tubos y autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Luego, colocar los tubos en posición de picos de flauta.

pH final: 6,9 ± 0,2.

Interpretación: se considera un tubo citrato positivo cuando habiendo trascurrido 24-48h se observa un color azul del medio (pH alcalino), producto del indicador azul de bromotimol. Mientras que a pH ácido, el medio permanece verde indicando un resultado citrato negativo.

Caldo Rappaport-Vassiliadis

Caldo de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp.

Composición (g/l): bacto triptona 4,54; NaCl 7,2; MgCl₂ 13,4; H₂KPO₄ 1,45; verde de malaquita 0,036.

Preparación: suspender 26,6 g en 1l de agua destilada y esterilizar a 115°C durante 15 minutos.

pH final: $5,1 \pm 0,2$.

Caldo tetrionato

Caldo de enriquecimiento selectivo para *Salmonella* spp.

Composición (g/l): peptona proteosa 5; sales biliares 1; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 30; CaCO_3 10.

Preparación: suspender 4,6g en 100ml de agua destilada y calentar hasta ebullición. Luego, adicionar 2ml de solución de Yodo, 1ml de solución de verde brillante y novobiocina (30mg/l).

Solución de yodo: 6g de I_2 y 5g de KI en 20ml de agua destilada.

Solución de verde brillante: 0,1g de verde brillante en 100 ml de agua destilada.

El medio completo se homogeniza manualmente para evitar la formación de un precipitado de CaCO_3 y se distribuye en tubos estériles. No se autoclava. Se usa inmediatamente.

pH final: $8,4 \pm 0,2$.

Agar SS (Salmonella-Shigella)

Medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella* spp y *Shigella* spp.

Composición (g/l): pluripeptona 5; extracto de carne 10; lactosa 10; mezcla de sales biliares 8,5; citrato de sodio 8,5; tiosulfato de sodio 8,5; citrato férrico 1; agar-agar 13,50; verde brillante 0,00033; rojo neutro 0,025.

Preparación: suspender 60g del polvo por litro de agua destilada. Calentar agitando y hervir 2 minutos para disolver. No se debe esterilizar en autoclave.

pH final: $7 \pm 0,2$.

Agar X.L.D (xilosa-lisina-desoxicolato de sodio)

Medio de cultivo selectivo y diferencial para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Composición (g/l): extracto de levadura 3; HCl-L-lisina 5; xilosa 3,75; lactosa 7,5; sacarosa 7,5; desoxicolato de sodio 1; NaCl 5; tiosulfato de sodio 6,8; citrato de amonio férrico 0,8; rojo fenol 0,08; agar-agar 12,5.

Preparación: agregar 53g a un litro de agua destilada. Calentar con agitación frecuente hasta que el medio entre en ebullición. Luego, verter en las correspondientes placas. No se debe autoclavar este medio.

pH final: $7,4 \pm 0,2$.

Agar T.S.I (triple sugar iron)

Este medio permite evaluar la capacidad de un organismo de atacar uno o más hidratos de carbono específicos incorporados en un medio de crecimiento básico, con formación o no de gases, junto con la producción de ácido sulfhídrico.

Composición (g/l): extracto de carne 3; pluripectona 20; NaCl 5; lactosa 10; sacarosa 10; glucosa 1; sulfato de hierro y amonio 0,20; tiosulfato de sodio 0,20; rojo de fenol 0,025; agar-agar 13.

Preparación: suspender 62,5g por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente. Hervir 1-2 minutos hasta disolver. Distribuir en los tubos correspondientes. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

pH final: $7,3 \pm 0,2$.

Agar cristal violeta rojo y bilis:

Permite el crecimiento selectivo de Enterobacterias.

Composición (g/l): extracto de levadura 3 g, peptona 7 g, sales biliares 1,5 g, NaCl 5 g, lactosa 10 g, Rojo neutro (solucion al 1%) 3 ml, Cristal violeta (sn acuosa al 0,1 % p/v 2 ml, Agar-agar 15 g.

Preparación: Disolver en 1 litro de agua destilada, ajustar pH 7,4 (aproximadamente) distribuir como convenga y esterilizar en autoclave (121° C - 15 minutos).

pH final: $7 \pm 0,2$.

Agar fenilalanina desaminasa

Medio utilizado en la clasificación de enterobacterias que permite determinar la formación de ácido fenilpirúvico a partir de fenilalanina.

Composición (g/l): extracto de levadura 3; fenilalanina 2; fosfato disódico 1; NaCl 5; agar-agar 12.

Preparación: suspender 23g en 1l de agua destilada y calentar a ebullición hasta su disolución total. Colocar en tubos para picos de flauta y esterilizar a 121°C durante 10 minutos.

pH final: $7,3 \pm 0,2$.

Interpretación: trascurridas las 24h horas de incubación, se agrega a cada tubo 5 gotas del reactivo FeCl_3 (color amarillo). Así, se considera una cepa fenilalanina positiva cuando el medio y el líquido resultante adquieren color verdoso.

Medio lisina hierro descarboxilasa

Medio utilizado en la clasificación de enterobacterias que permite determinar la formación de cadaverina a partir de la descarboxilación de la lisina.

Composición (g/l): peptona 5; extracto de levadura 3; glucosa 3; púrpura de bromocresol (0,2% sn. acuosa) 10ml.

Preparación: disolver los componentes en agua destilada, ajustar a pH 6,7 y adicionar la solución indicadora. Esterilizar a 115°C durante 15 minutos. Luego agregar L-lysina 0,5%. Reajustar el pH a 6,7 si fuera necesario. Distribuir en tubos con 2ml de medio y esterilizar a 115°C durante 15 minutos.

Interpretación: un cultivo se considera lisina descarboxilasa positivo cuando, luego de 24h de incubación, se observa un color azul en el medio producto del pH alcalino generado por la utilización de dicho aminoácido y evidenciado por el indicador púrpura de bromocresol.

Reactivo de Kovacs

Composición:

- A) p-dimetilaminobenzaldehido 10 g.
- B) Alcohol amilico o isoamilico 150 ml.
- C) HCl concentrado 50 ml.

Preparación: disolver A en B y luego agregar C muy lentamente.

Alfa-naftol (5%)

Composición: 5.0 g en 100 ml de alcohol absoluto.

KOH (40%)

Composición: 40.0 g de KOH en 100 ml de agua destilada.

Apendice IV

Pruebas bioquímicas. Fundamentos

Prueba de oxidasa

La prueba de citocromo oxidasa utiliza ciertos reactivos colorantes como el diclorato de p-fenilendiamina, que actúa como aceptor artificial de electrones sustituyendo al oxígeno. La p-fenilendiamina es incolora en estado reducido, pero en presencia de citocromo oxidasa y oxígeno atmosférico, se oxida formando azul de indofenol.

Los citocromos son hemoproteínas que contienen hierro y actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia transfiriendo electrones al oxígeno, con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de oxidasa es importante para identificar aquellos organismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados. La prueba es muy útil para el "screening" de colonias sospechosas de ser enterobacterias (todas negativas), y para la identificación de colonias que se presumen *Pseudomonas* spp o *Neisseria* spp (positivas).

Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que se encuentra en todas las células con metabolismo aeróbico. La catalasa transforma el peróxido de hidrógeno tóxico, formado durante el proceso metabólico, en agua y oxígeno. La presencia o ausencia de la enzima catalasa es una característica taxonómica de los microorganismos.

Prueba de Indol:

El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: Indol, metilindol e indolacético. Este método

determina la capacidad que tiene un organismo de desdoblar el indol de la molécula triptofano. La prueba positiva denota un anillo rojo en la superficie del medio, en la capa alcoholica. En la prueba negativa no se forma el anillo de color, solo toma el color del reactivo de Kovacs. Puede aparecer un resultado variable al formarse un color anaranjado en la superficie del medio debido al desarrollo del escatol, un precursor de la formación de Indol.

Prueba de Rojo de Metilo

Dos de las vías alternativas para el metabolismo del piruvato formado por la fermentación de la glucosa son: ácidos mixtos y butilenglicol.

Las bacterias que siguen principalmente la vía de fermentación ácida mixta, producen a menudo suficiente ácido (acético, láctico, fórmico) como para mantener el pH por debajo de 4.4 (el límite de viraje de color del indicador rojo de metilo) contra el sistema estabilizador de pH del medio. Esto brinda una característica valiosa para identificar aquellos organismos productores de altas cantidades de ácidos, designándose RM positivos. El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6.0 (amarillo) y 4.4 (rojo).

Prueba de Voges Proskauer

Una de las vías de degradación del ácido pirúvico lleva a la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol), un subproducto de reacción neutra. En presencia de oxígeno atmosférico y de KOH al 40%, la acetoína se convierte en diacetilo y el alfa-naftol actúa como catalizador para revelar un complejo color rojo al unirse el diacetilo a los grupos guanidina de las peptonas. Las bacterias que siguen esta ruta, producen cantidades de ácidos menores, insuficientes para bajar el pH del medio con rojo de metilo y hacer virar el color del indicador. Por ello generalmente las bacterias VP positivas son RM negativas y viceversa.

Prueba de citrato

Consiste en determinar la capacidad de un microorganismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo y desarrollo. La utilización del citrato se detecta por la formación de subproductos alcalinos. El medio incluye citrato de sodio, como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno. Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno de la sal de amonio, con producción de amoníaco, llevando a la alcalinización del medio por conversión del amoníaco en hidróxido de amonio. El azul de bromotimol, amarillo a pH < 6 y azul a pH > 7.6, es el indicador.

Tabla N°1: Diferenciación de Tribus de *Enterobacteriaceae* por métodos bioquímicos.

Test o sustrato	Escherichieae	Edwardsiellae	Citrobacterae	Salmonelleae	Klebsielleae	Proteeae	Yersinieae
Prod. de SH ₂	-	+	+ o -	+	-	+ o -	-
Índol	+ o -	+	- o +	-	-	+ o -	+ o -
Rojo de metilo	+	+	+	+	-	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-	-	+	-	-
Citrato (Simmons)	-	-	+	+	+	d	-
Movilidad	+ o -	+	+ o -	+ o -	-	+ o -	+ o -

Referencias: +: 90% o más reacción positiva entre 1 o 2 días; (+): reacción positiva después de 3 días; -: no hay reacción (90% o más) en 30 días; +o-: la mayoría cultivos positivos, algunas cepas negativas; - o +: la mayoría cepas negativas, algunos cultivos positivos; + o (+): la mayoría de las reacciones ocurren entre 1 o 2 días; d: reacciones diferentes.

