

# protocolos

**DIARIO DE LABORATORIO**

FECHA	TRABAJO A INICIAR	TRABAJO PENDIENTE
OBSERVACIONES		

**DIARIO DE LABORATORIO**

FECHA	TRABAJO A INICIAR	TRABAJO PENDIENTE
OBSERVACIONES		

## 1.- Técnicas básicas:

### 1.1. Normas básicas de actuación y recomendaciones para prácticas correctas de Microbiología de los alimentos

Las siguientes normas, extraídas de guías para el correcto trabajo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, debieran ser obligatorias e incuestionables en cualquier situación de trabajo. El personal que trabaje en un laboratorio debe conocer los riesgos y como evitarlos. Para este curso tendremos preferentemente en cuenta las siguientes:

#### A. NORMAS DE TÉCNICAS PERSONALES:

1. - Es necesario trabajar con limpieza de medios, ya que es el rasgo evidente de trabajo seguro.
2. - Sea cual fuera el origen de los microorganismos, hay que suponer que son potencialmente patógenos. Debe evitarse a toda costa: pipeteo bucal, aplicación de cosméticos, beber, comer, fumar,...
3. - El trabajo se debe realizar de tal forma que no produzca contaminaciones ambientales.

#### B. NORMAS DE EQUIPO Y MATERIAL:

1. - Es necesario utilizar bata blanca.
2. - Todos los utensilios utilizados (pipetas, placas de Petri, etc...) deben ser estériles antes de su utilización.
3. - Antes de hacer los medios de cultivo, consultar con el profesor (algunos medios no deben de ser esterilizados, otros necesitan añadirle algún componente, etc.)
4. - El autoclave está regulado a 121° C. No debe tocarse ningún mando, sólo el de encendido y apagado.
5. - La estufa de esterilización a calor seco, para el material de vidrio, está programada a 140-150° C. No tocar ningún mando, sólo el de encendido y apagado.
6. - Las estufas de cultivo de aerobios están a 31° C, 37° C y 44° C. No tocar los termostatos. Antes de introducir el cultivo comprobar si la temperatura es la que indica.
7. - Todo el material sucio que quede después de realizar la práctica se llevará al fregadero para su limpieza. No dejar nada en las mesas.
8. - Los tubos, placas, etc. en los que existiera algún cultivo microbiano deberán introducirse en una bolsa de esterilización y llevarse al autoclave antes de lavarlos, para evitar la contaminación del personal.
9. - Antes de comenzar la práctica comprobar que no falta ningún material del que se indica en el protocolo. La falta de una pipeta o una placa estéril es suficiente para paralizar y no ser válido nada de lo realizado anteriormente.
10. - Terminada la práctica cada alumno deberá anotar lo realizado desde la preparación del material utilizado hasta los resultados obtenidos.

## 1.2. Técnicas básicas

### 1.- Preparación de medios de cultivo

(ADSA=MICRO Medios de Cultivo para Microbiología. Barcelona.)

#### a) Diferenciación de los medios de cultivo

Para estudiar las características de las bacterias y el crecimiento de los gérmenes, y poder verificar su identificación, es indispensable ponerlos en medios a propósito que produzcan un desenvolvimiento con facilidad; esto lo conseguiremos facilitándoles las materias nutritivas para que puedan realizar su metabolismo.

Se denomina:

1. - **AGAR** a los medios sólidos con un contenido de agar igual o superior al 1%.
2. - **MEDIO FLUIDO** a los medios semisólidos con un contenido de agar inferior al 1%.
3. - **CALDO** a los medios de cultivo líquido con componentes orgánicos indefinidos (peptona, extractos de órganos y tejidos, etc.).
4. - **SOLUCIONES NUTRITIVAS** a los medios de cultivo de composición química definida.
5. - **MEDIO SELECTIVO** es aquel que sólo permite el crecimiento de un biotipo o unos pocos biotipos entre los que se presentan en el inóculo.
6. - **MEDIO DIFERENCIAL** es aquel que permite la distinción entre tipos culturales próximos y relativamente parecidos.
7. - **MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO** es aquel que favorece más el crecimiento de un determinado biotipo por encima de los otros presentes en el inóculo.
8. - **MEDIO GENERAL** es aquel que soporta el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos sin exigencias nutritivas especiales.

#### b) Preparación de los medios de cultivo:

El aspecto y calidad del medio preparado depende con mucha frecuencia de la forma de rehidratarlo y almacenarlo, por ello es importante que en lo posible se sigan las recomendaciones que se ofrecen a continuación.

##### 1) Rehidratación

- Seguir las instrucciones particulares de cada medio deshidratado, que se encuentran inscritas en sus etiquetas.
- El agua que se empleará debe ser destilada o desionizada.
- La homogeneidad de la solución o suspensión debe ser total y la exposición al calor, si es preciso, será mínima.
- Para la preparación del medio de cultivo la práctica más recomendable es la siguiente: A un volumen de agua mitad del necesario y previamente calentada a 50-65°C se añade la cantidad total del polvo necesaria y se agita constantemente hasta su disolución. Con el resto del agua se lavan las paredes del recipiente y se continúa agitando y calentando si es preciso. La aplicación del calor debe ser directa y suave, con agitación para evitar que los componentes se peguen a las paredes del recipiente

(de volumen 2 ó 3 veces superior a la cantidad de medio a preparar).

- Los medios que no contienen agar (caldos y soluciones nutritivas) se suelen disolver bien en agua precalentada, si bien van a necesitar de una agitación vigorosa.
- Los medios que contienen agentes gelificantes (ágar y medios fluidos) precisan un calentamiento previo antes de su esterilización. Los medios que contengan agar-agar deben llevarse a ebullición. Es muy conveniente que antes de iniciar el calentamiento se deje reposar el agar en el agua precalentada durante 5 a 10 minutos. Una práctica muy aconsejable es retirar el medio del fuego cuando ha empezado a hervir y volverlo a calentar hasta que hierva de nuevo (2 ó 3 veces) con agitación constante.
- La disolución de los medios de cultivo directamente durante el proceso de esterilización al autoclave es una práctica del todo incorrecta.
- Los medios fluidos al contener poca cantidad de agente gelificante son más delicados y se debe tener precaución tanto en el calentamiento, como después en el enfriamiento que debe ser lento y suave, para así evitar la aparición de flóculos y nubes.
- Los medios con azúcares pueden oscurecerse debido al exceso de calentamiento.
- Los medios con agar-agar a un pH inferior a 5 no se pueden sobrecalear para evitar la hidrólisis del agar y que éste no pierda su capacidad gelificante.

## 2) Esterilización de medios de cultivo preparados en el laboratorio

Deben seguirse las instrucciones de la etiqueta teniendo en cuenta que se especifican para pequeños volúmenes, inferiores a los 100 ml. Para volúmenes mayores hay que tener en cuenta las condiciones del autoclave y de penetración de calor en el medio. A título orientativo se da una escala de tiempo suplementario de esterilización, a añadir a los 15 minutos básicos para otros volúmenes:

- 250 ml prolongar la esterilización durante 12 minutos.
- 500 ml prolongar la esterilización durante 18 minutos.
- 1000 ml prolongar la esterilización durante 22 minutos.
- 2000 ml prolongar la esterilización durante 27 minutos.
- 5000 ml prolongar la esterilización durante 37 minutos.

- Hay que controlar periódicamente el funcionamiento del autoclave para verificar los manómetros y termómetros y que el calor en su interior se distribuye de forma adecuada.
- Los recipientes que se emplean en la esterilización deben tener una cámara de aire grande para permitir la libre ebullición. Cuando se esterilicen frascos con tapones roscados deberán aflojarse para permitir que se equilibren las presiones interna y externa. Los recipientes que se empleen deben ser totalmente inertes para impedir las variaciones de pH.
- Los medios con azúcares siempre oscurecen ligeramente con la esterilización, siendo recomendable para ellos que la temperatura no rebase los 118°C, cuando sea posible.
- Algunos medios contienen sustancias selectivas para no precisar esterilización. En estos casos, el proceso es más rápido, ya que se pueden usar inmediatamente después de disolver. Pero estos medios suelen ser muy poco estables y se recomienda preparar solamente las cantidades estrictamente necesarias para su uso inmediato.
- Cuando sea preciso añadir sustancias al medio esterilizado deberá hacerse de forma aséptica, lo que supone una previa esterilización del aditivo. Generalmente las sustancias a añadir son termolábiles, y por ello se deberán adicionar cuando el medio se haya enfriado lo suficiente (50-65°C) para no destruir

el aditivo y permitir el correcto reparto en todo su volumen. Una vez hecha la adición debe evitarse cualquier calentamiento del medio.

- La distribución en los recipientes definitivos se lleva a cabo con los medios fundidos y a una temperatura próxima a la gelificación (45-50°C). Si es posible debe hacerse antes de la esterilización evitando así las manipulaciones. Si no es posible, se realizará en cámaras estériles. La excesiva condensación de vapor se puede evitar si se distribuye el medio a temperaturas próximas a la gelificación.

### 3) Almacenamiento de los medios deshidratados

- Los medios de cultivo deshidratados deben conservarse al abrigo de la humedad, de la luz y calor que son esencialmente los agentes de alteración más frecuentes.
- Es recomendable que el frasco se abra en ambientes secos e inmediatamente después de su uso se vuelva a cerrar. No precisan refrigeración aunque las bajas temperaturas prolongan su efectividad. Si los medios se humedecen quedan apelmazados y duros, perdiendo sus propiedades e incluso permitiendo el crecimiento directo de microorganismos en ellos.
- La conservación de los medios deshidratados no es indefinida y por ello no es recomendable el almacenamiento de grandes cantidades. Se aconseja un pequeño "stock" que se fechará cuando se reciba y evitar que se acumulen los más antiguos.

### 4) Almacenamiento de los medios de cultivo preparados

Aunque lo más adecuado es preparar los medios a medida que son necesarios, es frecuente que se almacenen ya preparados y estériles para ahorrar así tiempo de preparación. En estas circunstancias el mayor peligro es la deshidratación y cualquier precaución que la evite prolongará la vida del medio, que en ningún caso será superior a 4-6 semanas.

Consideraciones:

- Los recipientes con tapón roscado hermético (tubos o frascos) son más aconsejables que las torundas de algodón.
- Por lo general una refrigeración moderada (4°C) alarga la vida del medio, aunque debe tenerse en cuenta que el ambiente refrigerado es muy seco y favorece la deshidratación.
- La incidencia de la luz directa debe evitarse siempre pero sobre todo en los medios que contienen algún tipo de indicador.
- Los medios sólidos para placa se mantienen mejor en el frasco original que ya vertidos en placas. Sin embargo, se podrían almacenar teniendo en cuenta las siguientes precauciones:

- Refrigerarlos inmediatamente después de su solidificación, controlando la esterilidad del lote.

- Si el almacenamiento va a ser prolongado, se precintarán individualmente con cinta adhesiva impermeable, y a ser posible se envasarán también de forma individual.

- Si el almacenamiento va a ser superior a un par de días se envolverán en bolsas de plástico para evitar la deshidratación.

- La formación de agua de condensación será inevitable, por lo cual es recomendable que las placas se mantengan en posición invertida. Este agua de condensación facilita mucho su contaminación y debe evitarse vertiendo el medio en placas lo más frío que se pueda.

Los medios mantenidos en refrigeración deben atemperarse antes de su uso y es recomendable mantenerlos unas horas a temperatura ambiente antes de inocularlos o sembrarlos, evitándose así la condensación de humedad ambiental en la superficie y los retrasos en el crecimiento.

Nunca se pueden utilizar medios de cultivo preparados y almacenados que presenten una fuerte deshidratación, que se manifiesta por la excesiva agua de condensación o por disminución del volumen (en los medios líquidos) aumento de concentración o precipitación (medios fluidos o líquidos) o retracción, cuarteamiento y precipitados (en medios sólidos). Tampoco las placas que presenten las superficies excesivamente secas o con cambios de color aparentes.

MICROBIOLOGIA

FECHA:    /    /   

GRUPO:

A: PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

B: PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

A. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO LIQUIDOS

PREPARACION:

B. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

PREPARACION:

2. EJERCICIO PRÁCTICO SOBRE RUTINA DE ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS:

a. - Recepción de las muestras

Anotar en el libro registro de laboratorio

MUESTRA NUMERO:		FECHA:	
ALIMENTO:			
PESO MUESTRA: 25 g		DILUYENTE: HP/TSB	

b. - Análisis:

c.- Dilución de alimentos para su examen microbiológico

Debido a la carga microbiana que generalmente tienen los alimentos es necesario, por lo general, hacer diluciones de la muestra con objeto de poder obtener, en los medios de cultivo, colonias perfectamente diferenciadas; de esta forma podemos estudiarlas, contarlas y llegar al aislamiento e identificación de los gérmenes existentes.

MATERIAL

- Pipetas de 1 ml. estériles
- Botes de dilución de 225 ml de TSB/HP
- Tubos de dilución con 9 ml. de agua de peptona al 0.1 % estériles.

Diluciones decimales, siembra e incubación

DILUCIONES DECIMALES

MEDIOS	-1	-2	-3	-4	-5	-6

Dilución inicial de alimentos: 1/10

METODOS

- Pesarse asepticamente y anotar con dos decimales la cantidad de muestra que debe ser alrededor de 25 grs. de muestra
- Diluciones decimales

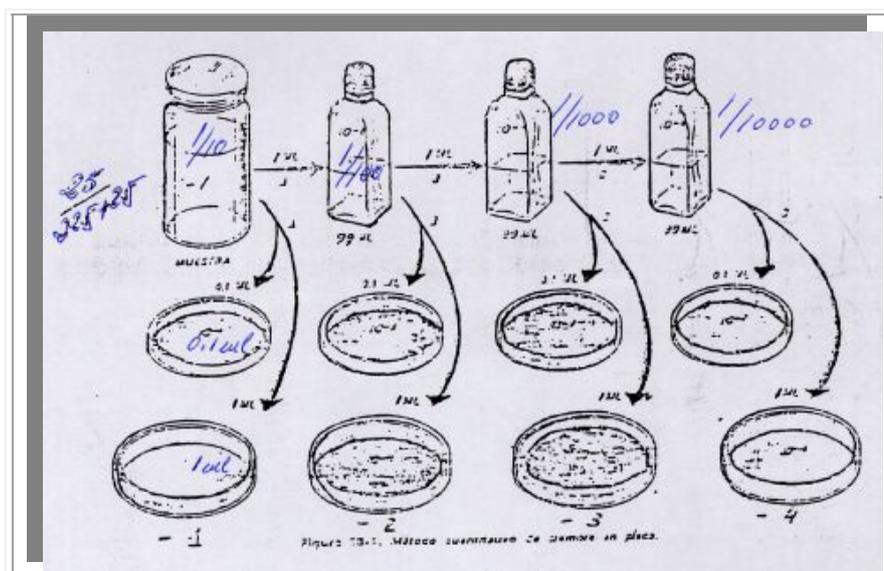
**Alimentos líquidos Dilución 1/10:**

Muestra Diluyente (HP)

1 cc/gr ↔ 9 cc

10 cc/gr ↔ 90 cc

25 cc/gr ↔ 225 cc



**Alimentos sólidos y finamente particulados: realizar una semi-dilución previa**

Introducir en bolsa de *Stomacher*

Mezclar bien el total de la muestra/homogeneizar durante 1 min.

Tomar 1 ml. de la muestra con pipeta estéril.

Poner en tubo de dilución con 9 ml. de diluyente estéril, la dilución obtenida es al 1/10.

Se desecha la pipeta.

Tomar 1 ml. de la dilución anterior con nueva pipeta estéril.

Poner en tubo de dilución con 9 ml. de diluyente estéril. La dilución obtenida es al 1/100.

Desechar la pipeta.

Por el mismo procedimiento hacer las diluciones al 1/1000, 1/10000, etc., según se estime el grado de contaminación.

La inoculación en los medios de cultivo debe hacerse entre 30 y 90 minutos, después de hacer las diluciones.

## d.- CULTIVO DE MICROORGANISMOS: Recuentos y Pruebas de P/A

El cultivo de microorganismos tiene por objeto su estudio e identificación, que se efectúa, mediante las características que presentan las bacterias. Dichas características dependen del comportamiento de las poblaciones o de los cultivos, más que de los organismos individualmente, de ahí que sean importantes los materiales y métodos para conseguir el desarrollo y multiplicación.

## RECUENTOS de COLONIAS/Presencia-Ausencia

## MATERIAL

Medios de cultivo

Material de siembra o cultivo problema

Asa de platino y aguja de platino

Mechero

Algodón

Tubos de ensayo

Placas de Petri estériles

Varilla de vidrio curvada (o aguja de platino curvada): Asa de *Drigalski*

Pipetas de 1 ml. estériles

Estufa a 35-37°C/44°/21°

## METODOS

## Siembra de placa en masa

Fundir tubos con PCA y otros con MC/VRBD.... (12-15 ml.) y enfriarlo hasta 45 °C. Tener en cuenta que por debajo de esta temperatura el agar solidifica.

Poner 1 ml. de cada dilución decimal en el fondo de una placa de Petri estéril.

Verter cada uno de los tubos de medio de cultivo en una placa de Petri girándolas (3 veces en sentido horario y otras tres veces a la inversa) para distribuir el agar perfectamente y dejar solidificar. Incubar a 37°C y a las 24 horas observar.

Para el recuento válido deben utilizarse placas conteniendo de 30-300 colonias.

## Siembra por extensión en superficie

Se emplea en los medios BP y AS

Se depositan 0,1-0,5 ml con pipeta correspondiente a la dilución elegida

Se distribuye uniformemente con *Espátulas Drigalski*

Siembras para Presencia Ausencia:

Presencia/Ausencia	Tipo de Siembra: Estría superficie
	<p>Elegir la dilución apropiada</p> <p>Descargar asa de platino en dos sectores de la placa con medio de cultivo solidificado</p> <p>En el tercer sector arrastrar hacia el otro extremo</p>

Interpretación:

Finalizado el período de incubación, observar con buena luz a efectos de visualizar las colonias puntiformes y diferenciar cualquier partícula de muestra que pueda haber. Si molesta, borrar la escritura. Contar las colonias desarrolladas por placa. Se cuentan como colonias individuales, todas aquellas que disten de las colonias próximas una distancia al menos igual al diámetro de la colonia más pequeña.

Es posible que se desarrollen colonias extendidas, sobre la superficie, o el fondo y bordes de la placa, o que se den cadenas de colonias unidas. Este tipo de crecimiento se denomina "spreaders" y se cuentan como uno. Cuando el spreader cubre más del 50% de la placa, esta no debe contarse. Cuando el spreader cubre una superficie menor del 50%, se cuentan las colonias en el resto de la placa, SOLO si están uniformemente distribuidas.

Resultados

Factor Dilución (FD): Título de la dilución inicial\* Títulos diluciones sucesivas

Ejemplo:

1/10 (dilución inicial) 1/10 1/10 (diluciones siguientes)

FD= 1/1000

Factor Decimal de Dilución (FDD)= 1/FD

FDD=1000

Cálculo del número de ufc/gr ó cc

Nº de colonias significativas en la última placa considerada \* (multiplicado) FDD / (dividido)  
Volumen inicial sembrado

Informe

Expresión de resultados

1. - Si no ha habido crecimiento
2. - Recuentos significativos por placa: entre 30 y 300 ufc
3. - Logaritmos o número de ufc/g ó ml en potencias de 10

Alimento:	
Muestra nº	Fecha:
Peso de la muestra:	ml de diluyente: 225 90 _____

HPT 225 ml	9ml								
MEDIO	1	2	3	4	5	6	7	8	9

**CALCULOS:**

MEDIO	RESULTADOS PREVIOS	RESULTADOS FINALES

2. Rutinas de control alimentario:

2.1. Rutinas combinadas para el análisis de Agua potable de muestras tomadas del grifo.

Base de trabajo: Lo indicado en el RD 144/2003 para el Análisis de Control

<b>AGUAS*</b>		<b>GRUPO:_____*</b>		
<i>No se procede a eliminar desinfectante con tiosulfato.</i>				
<b>MUESTRA NUMERO:</b>		<b>FECHA: / /</b>		
<b>Procedente de:</b>				
	Muestras			
<b>DETERMINACIONES</b>				
CLORO libre residual				
VB 2C				
<i>Escherichia coli</i>				
MEMBRANA (CL< 0,1ppm)				
SPS 37°C				
SPS 44°C				
<b>SI CLORO &lt; 0,1 ppm ESPERAR A RESULTADOS BACTERIOL PREVIOS</b>				
NITRITOS				
AMONIACO				
pH				
CONDUCTIVIDAD				
TURBIDEZ				
OLOR(1)				
COLOR (2)				

(1) Olor: Expresar sin/con olor. Indicar olor en caso positivo

(2) Color: Expresar Transparente/Color. Indicar color

2.2. Rutinas control a la Recepción:

- \*Límites críticos a la recepción: causa dictamen NA (indicar numero)
1. No ajustarse al pliego de condiciones en fecha de duración mínima
  2. Caracteres organolépticos no satisfactorios
  3. Etiquetado incorrecto
  4. Envases/embalajes defectuosos y/o rotos y/o no de origen
  5. El alimento no se ajusta al pedido cocina
  6. La muestra obtenida no se ajusta a las especificaciones analíticas del pliego de condiciones
  7. Otras

=====

\*\*CONSERVACION:

FECHAS  
ENVASADO/CADUCIDAD/CONSUMO PREFERENTE

PRODUCTO	PRESENTACION

MUESTRA	REFRACTOMETRIA

OBSERVACIONES