

TEMA 1

MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS MICROORGANISMOS MARCADORES: ÍNDICES E INDICADORES. SIGNIFICADO Y CARACTERÍSTICAS. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

- Introducción
- Significado y características de los microorganismos marcadores
 - ✓ Recuentos en placa de bacterias aerobias
 - ✓ Recuentos de mohos y levaduras
 - ✓ Bacterias entéricas indicadoras: *Escherichia coli*, coliformes y *Enterobacteriaceae*
 - ✓ Enterococos
 - ✓ Microorganismos sulfitorreductores esporulados anaerobios



MICROORGANISMOS MARCADORES: ÍNDICES E INDICADORES. SIGNIFICADO Y CARACTERÍSTICAS. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de microorganismos en los alimentos no significa necesariamente un peligro para el consumidor o una calidad inferior de estos productos. La mayor parte de los alimentos se convierten en potencialmente peligrosos para el consumidor sólo después de que han sido violados los principios de higiene, limpieza y desinfección. La puesta en evidencia de este riesgo se basa en el examen de muestras de alimentos en busca de los propios agentes causales o de indicadores de una contaminación no admisible.

El examen microbiológico rutinario de los alimentos para detectar en ellos toda una serie numerosa de microorganismos patógenos y de sus toxinas no es practicable en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, es imperativo realizar los análisis microbiológicos de rutina correspondientes siempre que la información epidemiológica sugiera la presencia de un agente patógeno específico en un determinado alimento. El microbiólogo de alimentos prefiere la utilización de grupos o especies de microorganismos, cuya enumeración o recuento se realiza con gran facilidad y cuya presencia en los alimentos (en determinado número) indica que estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido organismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. Los grupos o especies utilizadas con estos fines se denominan marcadores y sirven para evaluar tanto la seguridad que ofrecen los alimentos en cuanto a microorganismos y sus toxinas como su calidad microbiológica.

Dentro de los microorganismos marcadores encontramos dos grupos: en primer lugar el grupo cuya presencia en un alimento indica la posible presencia simultánea de microorganismos patógenos ecológicamente relacionados, se denominan índices. Así, por ejemplo, *E. coli* ha venido utilizándose como índice de posible presencia de patógenos de procedencia entérica (entre ellos, *Salmonella spp.*) en el agua y los alimentos. Otro grupo serían aquellas bacterias cuyo propósito es poner de manifiesto deficiencias en la calidad microbiológica de un determinado alimento en términos más generales, denominándose indicadores. Por ejemplo, la presencia de bacterias del grupo coliformes en la leche pasteurizada, en número que exceda a un valor de

referencia experimentalmente establecido, puede poner de manifiesto o advertir diversas deficiencias de este producto, entre ellas: a) un tratamiento térmico insuficiente, b) una contaminación posterior al tratamiento, c) un almacenamiento del producto final a una temperatura demasiado elevada.

Por supuesto que un determinado marcador puede funcionar como índice o como indicador, incluso en un mismo alimento. Por ejemplo, la presencia de números significativos de ufc de *E. coli* en camarones o gambas precocidos o congelados, pone de manifiesto: a) un tratamiento de inocuidad inadecuado, por lo tanto función indicadora, b) presencia posible de microorganismos patógenos de procedencia entérica, función de índice para microorganismos significativos en cuanto a la salud, riesgo derivado de las industrias donde los crustáceos fueron preparados o procesados.

2. SIGNIFICADO Y CARACTERÍSTICAS DE LOS MICROORGANISMOS MARCADORES

En el momento actual, es posible la determinación directa de casi todos los microorganismos patógenos entéricos. No obstante, existe todavía espacio en la moderna microbiología analítica de los alimentos para pruebas o determinaciones adecuadamente diseñadas de microorganismos marcadores, además de buscar o aislar directamente los patógenos. Las razones que lo justifican son:

- El fallo en la detección de Enterobacteriaceas patógenas concretas tiene un significado limitado, debido a la frecuente distribución muy irregular de estos microorganismos en los alimentos y a la falta de fiabilidad de las técnicas de aislamiento, aun a las que se refieren al género más estudiado (*Salmonella*). Así sucede, que los resultados negativos tienen un valor muy problemáticos.
- No es posible en un laboratorio no especializado detectar la presencia en los alimentos de ciertos agentes patógenos entéricos, tales como el virus de la hepatitis A y los helmintos, por lo que con frecuencia no se realizan estas determinaciones.
- Además, aun cuando falten en efecto todos los agentes patógenos entéricos en una alícuota adecuada de una partida de alimentos, este resultado tiene únicamente significado en lo que se refiere a la partida o lote en cuestión. Por

el contrario, si se pone de manifiesto de forma repetida la ausencia de microorganismos marcadores en una serie de muestras tomadas de lotes sucesivos, la probabilidad de que tales productos puedan en alguna ocasión presentar niveles de contaminación peligrosos es prácticamente nula.

2.1. Recuentos en placa de bacterias aerobias

La mayoría de los alimentos industrializados (excepto, por ejemplo, los productos fermentados) deben ser considerados como inadecuados para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. Pueden darse varias razones que justifican esta conducta:

- Recuentos altos en alimentos estables a menudo indican materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios desde el punto de vista sanitario, mientras que en los productos perecederos pueden indicar también condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante su almacenamiento. La presencia de un número elevado de bacterias aerobias mesófilas que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella, significa que pueden haberse dado condiciones favorables a la multiplicación de los microorganismos patógenos de origen humano o animal.
- Algunas cepas de bacterias mesófilas comunes, no generalmente consideradas como agentes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Proteus, Enterococos y Pseudomonas) han sido señaladas como causa de enfermedad cuando existía un elevado número de células viables en los alimentos.
- La mayoría de las bacterias patógenas conocidas vehiculadas por los alimentos son mesófilas y en algunos casos contribuyen con su presencia a los recuentos en placa encontrados.
- Hay que tener en cuenta que las bacterias aerobias mesófilas, como grupo, pueden ser consideradas generalmente como organismos indicadores, aunque representan una medida mucho menos precisa y fiable del peligro de intoxicación alimentaria que otros indicadores de los que hablaremos más adelante. Los recuentos elevados de bacterias mesófilas, por ejemplo en productos crudos o no tratados, a menudo están constituidos por la microflora normal o quizás indican

una alteración incipiente del alimento y no un peligro potencial para la salud del consumidor.

Es preciso advertir que el recuento de la flora aerobia mesófila tiene un valor limitado en algunos casos:

- En determinados tipos de alimentos (embutidos fermentados, col ácida, queso y otros derivados lácteos) es natural y deseable una gran multiplicación bacteriana, con una fermentación o maduración paralela del alimento. En estos productos, un recuento elevado carece prácticamente de significado, ya que los microorganismos impropios no pueden diferenciarse generalmente de la microflora propia o normal.
- En los alimentos tratados por el calor, la población de microorganismos viables suele ser muy baja, aunque un examen microscópico de estos productos puede a veces poner de manifiesto la presencia de microorganismos muertos, cuyo número indica que la materia prima estaba muy contaminada.
- Del mismo modo, en los alimentos deshidratados y en los congelados, siempre se obtienen recuentos de bacterias viables más bajos. Así, un recuento en placa puede no reflejar la calidad bacteriológica de la materia prima antes de los procesos o tratamientos correspondientes, y por ello, es necesario llevar a cabo un examen microscópico directo para comprobar si, efectivamente, en un principio existían o no abundantes gérmenes.
- Los recuentos de bacterias mesófilas son de escaso valor a la hora de predecir la vida útil de un alimento conservado en refrigeración, ya que muchos microorganismos mesófilos no crecen a temperaturas por debajo de los 5°C. Para esta finalidad es preferible el recuento de bacterias viables psicrótróficas con temperaturas de incubación entre 0 y 5 °C durante 10 días.

2.2. Recuentos de mohos y levaduras

Las levaduras y los mohos crecen más lentamente que las bacterias en los alimentos no ácidos que conservan humedad y por ello pocas veces determinan problemas en tales alimentos. Sin embargo, en los alimentos ácidos y en los de baja actividad de agua, crecen con mayor rapidez que las bacterias, determinando por ello importantes pérdidas por alteración de frutas frescas y zumos, vegetales, quesos, alimentos salazonados, cereales y encurtidos, así como en los alimentos congelados

y en los deshidratados, cuyo almacenamiento se realiza en condiciones no adecuadas. Además existe el peligro potencial de producción de micotoxinas por parte de los mohos. En los alimentos frescos y en los congelados, pueden encontrarse números reducidos de esporas y células vegetativas de levaduras, pero su presencia en estos alimentos es de escaso significado. Sólo cuando el alimento contiene cifras elevadas de levaduras o mohos visibles, el consumidor se dará cuenta de la alteración. La alteración por levaduras no constituye un peligro para la salud.

2.3. Bacterias entéricas indicadoras: *Escherichia coli*, coliformes y *Enterobacteriaceae*

E. coli es un germen cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y los animales. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en los moluscos, en los productos lácteos y en otros alimentos. La enumeración de *E. coli* en el agua constituye una medida de la cuantía de la polución, mientras que los niveles detectados en los alimentos pueden estar influenciados por otros factores, tales como la multiplicación del microorganismo, su muerte o inactivación o su adherencia a las partículas del alimento. Con todo, cifras sustanciales de esta bacteria en un alimento sugieren una falta general de limpieza en el manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado. La presencia de *E. coli* en un alimento no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente.

Una práctica común es utilizar las pruebas para coliformes, que incluyen *E. coli*, en los ensayos de “screening” o preliminares. Si de estas pruebas iniciales se deduce la posibilidad de contaminación fecal, los coliformes y otras *Enterobacteriaceae* se someten a posteriores estudios para determinar si entre ellos está presente *E. coli*.

El término habitual “coliformes” comprende *E. coli* y diversas especies pertenecientes a otros géneros de la familia Enterobacteriaceae. Prácticamente hablando, los coliformes son los microorganismos que se detectan por las “pruebas para coliformes”. Pueden ser o no fecales. El término Coliformes fecales ha surgido como un intento de encontrar métodos rápidos y fiables para establecer la presencia de *E. coli* y variantes estrechamente relacionados sin necesidad de purificar los

cultivos obtenidos en las pruebas para coliformes o de aplicar las relativamente costosas pruebas confirmatorias. Los “coliformes fecales” incluyen un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44-45°C), dependiendo del método). Tales cultivos de enriquecimiento contienen por lo general un alto porcentaje de *E. coli* y son, por ello, muy indicativos de una probable contaminación de origen fecal del alimento.

Por otra parte hay laboratorios que prefieren determinar la familia entera de las Enterobacteriaceae (es decir, todos los tipos lactosa+ y lactosa -). Esta prueba es utilizada por las siguientes razones:

- Las bacterias coliformes constituyen un grupo mal definido taxonómicamente. En efecto, el recuento de coliformes puede incluir toda una serie de bacterias diferentes, según la muestra, el medio, la temperatura de incubación y los criterios utilizados para la lectura. Esta variabilidad puede ser la causa de discrepancias entre los datos obtenidos en laboratorios diferentes.
- Una prueba solo para las bacterias lactosa positivas puede llevar a resultados falsamente seguros en los casos en los que predominan las lactosa negativas. Esto es válido no únicamente para las Salmonelas (predominantemente lactosa negativas), sino también para otras Enterobacteriaceas patógenas que fermenten la lactosa de forma lenta.
- Salmonella puede ser, en los alimentos, más resistente frente a las influencias desfavorables que *E. coli* y otros coliformes. De nuevo, la ausencia de estos últimos microorganismos puede llevar a conclusiones de seguridad falsas.

En los alimentos naturales y en las superficies de los utensilios y equipos de las industrias de alimentos, varios tipos de Enterobacterias permanecen más tiempo que *E. coli*. Las especies de Erwinia y Serratia, que se incluyen en los recuentos de Enterobacteriaceas y en cierto grado en las enumeraciones de coliformes, están asociadas con los vegetales y no indican contaminación fecal. De aquí que *E. coli* sea el único microorganismo índice válido en el análisis de los alimentos vegetales frescos. En los alimentos frescos o naturales de origen animal, la mayor parte de las Enterobacteriaceae proceden de contaminaciones de origen fecal y su presencia en gran número puede indicar una manipulación no higiénica y/o un almacenamiento inadecuado. En muchos casos, los recuentos de Enterobacteriaceae no guardan

relación con la cuantía de la contaminación original a partir de fuentes fecales, debido a que las Enterobacteriaceae pueden multiplicarse en algunos alimentos, mientras que tienden a disminuir en otros y en el agua.

En los alimentos que han recibido un tratamiento para garantizar su sanidad, la presencia de niveles considerables de Enterobacteriaceae o de coliformes indica: 1) tratamiento inadecuado y/o contaminación posterior al tratamiento, más frecuentemente a partir de materias primas, equipos sucios o manejo no higiénico. 2) multiplicación microbiana que pudiera haber permitido el crecimiento de toda la serie de microorganismos patógenos y toxigénicos. Con todo lo valiosa que esta información pueda ser, nunca deberá interpretarse como indicación cierta de que ha tenido lugar una contaminación de origen fecal de tales alimentos.

2.4. Enterococos

Se ha escrito muchos sobre la adecuación de los Enterococos, y sobre la del más amplio grupo D de Lancefield de Estreptococos, como indicadores de contaminación fecal. El grupo D incluye, además de los Enterococos (*Strep. faecalis* y *Strep. faecium*), Estreptococos menos resistentes al calor, tales como *Strep. bovis* y *Strep. equinus*. Al grupo completo se le designa con cierta imprecisión con el nombre de “Estreptococos fecales”.

Aunque normalmente presentes en las heces de mamíferos, estos cocos se encuentran también tan ampliamente distribuidos en el medio ambiente que su significado como indicadores de contaminación fecal está seriamente restringido. Su uso como indicadores deberá limitarse a situaciones en las que se sepa que son manifestaciones de polución fecal, por ejemplo en agua de piscinas. En alimentos industrializados que han sido calentados, curados, congelados, deshidratados o tratados de tal modo que la microflora original muera gradualmente. Existe una escasa correlación entre la presencia de Enterococos y de *E. coli*, coliformes o Enterobacteriaceas. Por el contrario, en alimentos crudos no industrializados, la correlación entre los niveles de Enterococos y de coliformes puede ser mejor.

A pesar de las limitaciones y de las incertidumbres apuntadas, la presencia de gran número de Enterococos en los alimentos, excepto en los fermentados por cepas específicas de estos microorganismos, implica prácticas inadecuadas de higiene o

bien exposición del alimento a condiciones que pudieran haber permitido la multiplicación extensiva de bacterias no deseables.

Los Enterococos pueden tener un papel significativo como indicadores de prácticas de limpieza y desinfección deficientes en las industrias alimentarias, debido a su gran resistencia a la desecación, a las temperaturas elevadas y bajas y a los detergentes y desinfectantes. Precisamente por su resistencia a la congelación, los Enterococos son los indicadores preferidos de prácticas de sanitización deficientes en las industrias de congelación de alimentos. Y por su resistencia al calor, pueden sobrevivir a los tratamientos térmicos que permitirían también la supervivencia de virus en algunos alimentos pasteurizados o deshidratados.

Esta elevada resistencia es al mismo tiempo, la razón de la falta de validez de estos cocos como indicadores generales de contaminación fecal. Los Enterococos pueden resistir de tal modo condiciones adversas que su presencia guarda escasa relación con el peligro de la existencia simultánea de microorganismos patógenos, tales como *Salmonella spp.* y *Shigella spp.*, mucho menos resistentes, gérmenes estos últimos que aunque hubieran llegado a los alimentos o a las superficies juntamente con los Enterococos probablemente no habrían sobrevivido.

2.5. Microorganismos sulfitorreductores esporulados anaerobios

Los sulfitorreductores esporulados anaerobios, pueden proceder del intestino del hombre o de los animales, pero tienen una característica que le hace menos significativo en cuanto a su procedencia fecal; se trata, como vemos por la denominación del grupo, de bacterias esporuladas, por tanto aunque las cepas aisladas tuvieran un origen fecal, por el hecho de ser anaerobios y capaces de esporular, al contacto con el aire formarán esporos y en este estado, podrán permanecer mucho tiempo en la tierra, en el agua, en alimentos vegetales, y en general en todo nuestro entorno, por lo que es muy fácil que se incorporen a los alimentos, ya sea formando parte de la materia prima, o en el proceso tecnológico de fabricación, conservación, empaquetado, transporte o almacenamiento. La consecuencia que se saca, es que por su sola presencia, no denotan una contaminación fecal reciente.

PROCOLOS DE PRÁCTICAS

TEMA 1

MICROBIOLOGÍA E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS

MICROORGANISMOS MARCADORES: ÍNDICES E INDICADORES. SIGNIFICADO Y CARACTERÍSTICAS. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN.

- Objetivos
- Fundamentación de la práctica
- Desarrollo de técnicas analíticas
- Técnicas útiles para el control microbiológico de los alimentos
- Diluciones de alimentos para su examen microbiológico.
- Microorganismos marcadores: recuento total (en placa) de microorganismos en los alimentos
- Microorganismos marcadores: investigación y recuento de formas esporuladas y vegetativas de Clostridium sulfito reductores
- Investigación y recuento de Enterobacterias totales
- Investigación y recuento de Enterobacterias lactosa positiva (coliformes)
- Recuento de Enterococos
- Análisis microbiológico de aguas por filtración



1. OBJETIVOS

- Conocer los métodos más comunes para aplicar al control microbiológico de un alimento
- Interpretar los resultados obtenidos de los análisis microbiológicos y su repercusión sobre la comestibilidad de un alimento.
- Realizar un informe del trabajo realizado.

2. FUNDAMENTACIÓN Y DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

El control de calidad de los alimentos tiene entre sus principales fines el poner de manifiesto las condiciones microbiológicas de los mismos. Normalmente los alimentos contienen microorganismos que determinan, según su cantidad (normalmente marcadores tanto índices como indicadores), o por su simple presencia (patógenos y patógenos potenciales) la aceptabilidad o no de un alimento. Estos criterios suelen estar recogidos en las normas microbiológicas para cada uno de los alimentos. El **fundamento** del módulo práctico de microbiología es conocer las técnicas más comunes y principios aplicados a la higiene de alimentos investigando la presencia de microorganismos marcadores, y en su caso, de algunos patógenos.

3. DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS ANALÍTICAS

3.1. Normas de actuación y recomendaciones en las prácticas de microbiología de los alimentos-higiene de alimentos

- Es necesario utilizar bata blanca limpia, zapatos cerrados y llevar el pelo recogido.
- No se debe comer o beber durante la realización del trabajo.
- Hay que familiarizarse que el equipo y dispositivos de seguridad disponibles en el laboratorio (lavajos, extintores, etc)
- Todos los utensilios utilizados (pipetas, placas de Petri, etc.) deben de ser esterilizados antes de su utilización
- Está prohibido pipetear con la boca.
- El autoclave debe estar regulado a 120°C durante 15 minutos.
- La estufa de esterilización a calor seco, para el material de vidrio, debe estar programada a 140-150°C.

- Las estufas de cultivo de aerobios deben estar a 37°C y 45°C. Antes de introducir el cultivo comprobar si la temperatura es la que indica.
- Trabajar con orden y con cuidado, evitar descuidos y si ocurre algún derrame avisad al profesor.
- Los tubos con medio de cultivo no deben abrirse en posición vertical sino inclinada. Se sostendrán con una mano y se quitará el tapón con la otra, que a su vez sostendrá el asa de siembra. El tapón nunca se dejará en la mesa.
- Al inocular los tubos se flameará el orificio antes y después de realizar esta operación.
- Los tubos, placas, etc. en los que haya habido algún cultivo microbiano, deberán llevarse al autoclave antes de lavarlos, para evitar la contaminación del personal.
- Las superficies de trabajo se limpiarán con productos específicos.
- Cualquier herida personal debe notificarse al responsable del laboratorio.

3.2 TECNICAS UTILES PARA EL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

3.2.1 CULTIVO DE MICROORGANISMOS

3.2.1.1 Fundamento

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, más que de los organismos individualmente, de ahí que sean importantes los materiales y métodos para conseguir el desarrollo y la multiplicación.

3.2.1.1.1 Cultivo en medios líquidos

<p><i>1.a : Material:</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Caldo nutritivo en tubos, estéril.• Alimento problema o dilución de éste.• Asa de siembra.• Mechero.• Estufa de 37°C.	<p><i>1.b. Método:</i></p> <ul style="list-style-type: none">• Sembrar en tubo con caldo nutritivo un asa del alimento problema o de la dilución.• Llevar a la estufa a 37°C.• Observar a las 48 horas el tipo de crecimiento.
---	--

3.2.1.1.2 Cultivo en medios sólidos

<p>2a. Material:</p> <ul style="list-style-type: none">• Alimento problema o dilución de éste.• Tubos de ensayo con Agar triptosa (inclinado).• Agar triptosa estéril.• Placas de Petri estériles.• Asa de siembra.• Pipetas de 1 mL, estériles.• Estufa a 37°C.	<p>2b. Método:</p> <p>2b.1) Siembra en tubo con Agar inclinado:</p> <ul style="list-style-type: none">• Sembrar sobre la superficie del Agar inclinado un asa del alimento problema o de la dilución.• Incubar a 37 °C.• Observar a las 48 horas la forma de crecimiento. <p>2b.2) Siembra en placa en estría:</p> <ul style="list-style-type: none">• Poner 15 mL de Agar triptosa, en una placa de Petri estéril, dejar solidificar.• Sembrar en estría un asa de alimento problema o de la dilución.• Incubar las placas, en posición invertida, a 37°C durante 48 horas. Observar el tamaño, forma y aspecto de las (plana, convexa, umbilicada...etc.; brillante, seca..etc.). <p>2b.3) Siembra en placa por homogeneización en masa:</p> <ul style="list-style-type: none">• Poner 1, 0.5 y 0.1 mL de alimento (o dilución) problema en placas de Petri estériles.• Añadir 10-15 mL de ágar nutritivo a cada una de las placas, atemperado a 45°C.• Realizar movimientos circulares y de vaivén para que el inóculo se distribuya uniformemente.• Dejar solidificar.
---	--

- Incubar las placas invertidas a 37°C durante 48 horas
- Contar las placas que tienen entre 30-300 colonias.

3.2.2 RECuento DE GÉRMEENES POR DILUCIÓN EN TUBO

DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE GERMENES EN UN ALIMENTO

El recuento por dilución proporciona una idea del número de organismos vivos presentes en una muestra que son capaces de multiplicarse en un medio líquido determinado. Se elige un medio líquido capaz de mantener el crecimiento de las bacterias que se están estudiando. Este método se utiliza cuando se sospeche un número muy bajo de gérmenes.

3.2.2.1 Material

- Tres series (o más) de cinco tubos (cada serie) con el medio de cultivo adecuado, según microorganismo.
- Botes de dilución con 90 mL de agua de peptona al 0.1% y pH= 6.8-7, estéril.
- Material diverso según el tipo de alimento a analizar.

3.2.2.2 Método

- Hacer diluciones del alimento al 1/10. 1/100. 1/1000 o más si fuera necesario. (ver protocolo de diluciones).
- Poner 1 mL de la última dilución en cada uno de los tubos de la última serie.
- Hacer lo mismo con las demás diluciones de manera ascendente .
- Incubar el tiempo necesario y a la temperatura adecuada según el que queramos investigar.
- Pasado el tiempo de incubación hacer la lectura y anotar el número de tubos positivos de cada serie.
- Consultar las tablas de probabilidad con el número de tubos positivos, Estos resultados se expresarán como número más probable de microorganismos por gramo o mililitro de alimento.

Ejemplo :

- Tubos positivos en la 1^a serie (1/10) = 5
- Tubos positivos en la 2^a serie (1/100) = 5
- Tubos positivos en la 3^a serie (1/1000) = 4

Lectura en las tablas NMP 5-5-4 = 1600 microorganismos/g o ml

TABLAS DEL NUMERO MAS PROBABLE (NMP)

0	0	0	0
0	0	1	2
0	0	2	4
0	1	0	2
0	1	1	4
0	1	2	6
0	2	0	4
0	2	1	6
0	3	0	6
1	0	0	2
1	0	1	4
1	0	2	6
1	0	3	8
1	1	0	4
1	1	1	6
1	1	2	8
1	2	0	6
1	2	1	8
1	2	2	10
1	3	0	8
1	3	1	10
1	4	0	11
2	0	0	5
2	0	1	7
2	0	2	9
2	0	3	12

2	1	0	7
2	1	1	9
2	1	2	12
2	2	0	9
2	2	1	12
2	2	2	14
2	3	0	12
2	3	1	14
2	4	0	15
3	0	0	8
3	0	1	11
3	0	2	13
3	1	0	11
3	1	1	14
3	1	2	17
3	1	3	20
3	2	0	14
3	2	1	17
3	2	2	20
3	3	0	17
3	3	1	20
3	4	0	20
3	4	1	25
3	5	0	25
4	0	0	13
4	0	1	17

4	0	2	20
4	0	3	25
4	1	0	17
4	1	1	20
4	1	2	25
4	2	0	20
4	2	1	25
4	2	2	30
4	3	0	25
4	3	1	35
4	3	2	40
4	4	0	35
4	4	1	40
4	4	2	45
4	5	0	40
4	5	1	50
4	5	2	55
5	0	0	25
5	0	1	30
5	0	2	45
5	0	3	60
5	0	4	75
5	1	0	35
5	1	1	45
5	1	2	65
5	1	3	85

5	1	4	115
5	2	0	50
5	2	1	70
5	2	2	95
5	2	3	120
5	2	4	150
5	2	5	175
5	3	0	80
5	3	1	110
5	3	2	140
5	3	3	175
5	3	4	200
5	3	5	250
5	4	0	130
5	4	1	170
5	4	2	225
5	4	3	275
5	4	4	350
5	4	5	425
5	5	0	250
5	5	1	350
5	5	2	550
5	5	3	900
5	5	4	1600
5	5	5	mayor
			1800

3.2.3 RECUENTO DE GÉRMENES EN FILTROS DE MEMBRANA

3.2.3.1 Fundamento

El recuento de gérmenes en filtros de membrana, se basa en la propiedad que tienen estos filtros de permitir el paso rápido de grandes volúmenes de soluciones acuosas y de retener las bacterias existentes en éstas. Las bacterias retenidas en el filtro pueden cultivarse posteriormente colocando éste sobre un disco de papel absorbente, el cual ha sido saturado con un medio de cultivo líquido. Los nutrientes del medio de cultivo, pasan a través de los poros de membrana, permitiendo de esta forma, el crecimiento de las bacterias, y la formación de colonias visibles. Normalmente se utiliza esta técnica en el análisis bacteriológico de aguas y bebidas, y cuando se sospecha un número bajo de gérmenes.

3.2.3.2 Material

- Equipo de filtración Millipore estéril. Bomba de vacío.
- Filtros de membrana tipo IIA, de 0.45 micrómetros de diámetro de poro, estériles.
- Placas de Petri y pipetas, estériles. Pinzas.
- Medio de cultivo según microorganismo (caldo de triptosa soja, caldo MacConkey, caldo para Enterococos..etc.). Tienen fórmulas especiales.
- Solución Ringer al 0.25. estéril.
- Estufa a 35-37°C.

3.2.3.3 Método

- Montar el equipo de filtración asépticamente.
- Colocar un filtro de membrana, con la rejilla hacia arriba, entre las dos
- Poner la muestra en el embudo y conectar la bomba de vacío.
- Cuando haya pasado toda la muestra adicionar solución Ringer al 0.25, con objeto de lavar.
- Desconectar la bomba de vacío.
- Poner un disco de papel absorbente en placa de Petri estéril y adicionar con una pipeta el medio de cultivo hasta saturación.
- Levantar la parte superior del embudo y retirar el filtro asépticamente.
- Colocar el filtro, con la rejilla hacia arriba, sobre el disco que tiene el medio de cultivo, procurando que no queden bolsas de aire entre ambos.

- Incubar a 35-37°C.
- Contar las colonias crecidas sobre la superficie del filtro.
- Expresar el resultado como unidades formadoras de colonia colonias (ufc)/mL

3.2.4 VALORACIÓN TURBIDIMETRICA DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

3.2.4.1 Fundamento

La valoración turbidimétrica del crecimiento microbiano en un medio de cultivo se basa en que un cultivo bacteriano actúa como una suspensión coloidal, bloqueando y reflejando la luz que pasa a través de él. Por tanto, al aplicar la turbidimetría, es decir la medida del porcentaje de absorción de luz, a una suspensión bacteriana, se puede estimar el número de células presentes. La turbidez se suele expresar **como densidad óptica** (D. O.), la cual es directamente proporcional a la concentración de células.

$D. O. = \log 100 - \log \text{ de la lectura en el espectrofotómetro.}$
--

3.2.4.2 Elaboración de la curva patrón, para un determinado microorganismo relacionando la turbidez (D. O.) con el número de células.

3.2.4.2.1 Material

- El necesario para hacer diluciones del cultivo hasta la 10^{-8}
- Agar para recuento en placa (cantidad suficiente para sembrar de 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8})
- Cinco tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo estéril.
- Fotocolorímetro, pipetas y placas de Petri.

3.2.4.2.2 Método

- Hacer un recuento en placa, sembrado de las diluciones 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} e incubando a la temperatura óptima del microorganismo.
- Hacer diluciones al 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 del medio de cultivo en los tubos con caldo nutritivo. El quinto tubo se utilizará después.
- Con el caldo nutritivo del quinto tubo se ajusta el fotocolorímetro a 100 por 100 de transmisión.
- Determinar la densidad óptica del cultivo puro y de las otras cuatro diluciones.

- Representar en unos ejes de coordenadas las densidades ópticas de las diversas diluciones y relacionarlas con el recuento en placa obtenido.

3.3 DILUCIONES DE ALIMENTOS PARA SU EXAMEN MICROBIOLÓGICO.

3.3.1 Fundamento

Debido a la alta 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 podremos estudiarlas, contarlas y llegar al aislamiento e identificación de los gérmenes existentes.

a) Alimentos líquidos.

Material.	Método.
<ul style="list-style-type: none"> • Pipetas de 10 mL estériles. • Botes de dilución con 90 mL de agua de peptona al 0.1% estériles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mezclar bien el total de la muestra. • Tomar 10 mL de la muestra con pipeta estéril. • Poner en frasco de dilución con 90 mL de diluyente estéril. La dilución obtenida es al 1/10. Se desecha la pipeta. • Tomar 10 mL de la dilución anterior con nueva pipeta estéril. • Poner en bote de dilución con 90 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 antes de 30 minutos después de hacer las diluciones.

b) Alimentos sólidos con partículas de pequeño tamaño (harina, pienso, etc....)

Material.	Método.
<ul style="list-style-type: none"> • Recipientes y cucharilla, estériles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar asépticamente (en recipiente estéril) 10 g. de la muestra

<ul style="list-style-type: none"> • Balanza. • Botes de dilución (de 100 mL) estériles. • Botes de dilución con 90 mL de agua de peptona al 0.1%, estériles. • Pipetas de 10 mL estériles. 	<ul style="list-style-type: none"> • Echar en bote de dilución estéril (sin diluyente). • Completar hasta 100 mL con diluyente estéril. • Agitar la suspensión 25 veces. Si el sólido es soluble o parcialmente soluble se completa de nuevo hasta 100 mL si es necesario. La dilución queda al 1/10. • Por el mismo procedimiento que en los líquidos hacer diluciones a 1/100. 1/1000. etc.
---	---

c) *Alimentos sólidos (carne, pescado, etc.)*

Material.	Método.
<ul style="list-style-type: none"> • Pipetas de 10 mL estériles. • Botes de dilución con 90 mL (ó 450) de agua peptona al 0.1 p.100 estériles. • Homogeneizador con recipiente estéril. • Tijeras y pinzas. • Mechero de alcohol. • Balanza. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pesar asépticamente 10 g. (mejor 50) de alimento • Poner en el recipiente del homogeneizador con 90 mL (ó 450) de diluyente estéril. • Homogeneizar durante 2 minutos a 8000 rpm. La dilución es al 1/10 • Por el mismo procedimiento que en líquidos hacer las restantes diluciones.

Importante

Mantener en frigorífico el recipiente del homogeneizador y el diluyente antes de su utilización; el proceso de homogeneización produce una elevación de temperatura y puede variar la carga microbiana.

3.4 MICROORGANISMOS MARCADORES: RECUENTO TOTAL (en placa) DE MICROORGANISMOS EN LOS ALIMENTOS

3.4.1 MICROORGANISMOS VIABLES MESÓFILOS Y PSICRÓFILOS

3.4.1.1 Fundamento

En general los recuentos bacterianos bajos están asociados con alimentos seguros. La mayoría de los alimentos industrializados (excepto, por ejemplo, los

productos fermentados) deben ser considerados como inadecuados para el consumo cuando contienen un gran número de microorganismos aun cuando estos microorganismos no sean conocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. Algunos microbiólogos han estimado el recuento bacteriano como uno de los mejores indicadores del grado de alteración de los alimentos.

3.4.1.2 Material

- El necesario para hacer disoluciones de la muestra (ver protocolo de disoluciones).
- Placas de Petri y pipetas de 10 mL y 1 mL, estériles.
- Agar triptosa-glucosa-extracto de levadura (Plate count agar) fundido, en el baño termostático a 45°C, estéril.
-

3.4.1.3 Preparación del medio, incubación y expresión de resultados

- Hacer disoluciones de la muestra al 1/10. 1/100.etc, según estime el grado de contaminación.
- Poner 1mL de cada disolución decimal en placas de Petri (por duplicado).
- Añadir 15 mL de medio de cultivo (fundido, a 45°C en un baño termostático) y dar movimientos circulares y de vaivén para que se distribuya la muestra uniformemente.
- Incubar:
 - una serie de placas a 20°C/ 3 días (psicrófilos), invertirlas,
 - otra serie de placas a 35°C/ 2 días (mesófilos), i nvertirlas.
- Pasado el período de incubación contar las placas que tengan entre 30 y 300 colonias.
- Expresar el resultado en ufc/g de alimento. Para ello se cuenta el duplicado y se halla la media, multiplicándose por la inversa del factor de dilución en el que se realizó el recuento.
- También es adecuado expresar el resultado calculando el logaritmo del valor anterior log ufc/g.

3.4.2 RECUENTO TOTAL DE HONGOS FILAMENTOSOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

3.4.2.1 Fundamento

Generalmente la presencia de mohos y levaduras está aumentada en los alimentos cuyo pH es de 4.5 o menos, tales como jugo de tomate, mahonesa, conservas de frutas, bebidas acidificadas, etc., y otros como helados, mantequilla, leche condensada, quesos, azúcar, etc.

3.4.2.2 Material

- -Placas de Petri.
- -Pipetas estériles de 1 y 10 mL.
- -Frasco de 100 mL de agua destilada estéril.
- -Agar OGYE.
- -Suplemento antibiótico: oxitetraciclina.

3.4.2.3 Preparación de medios y suplementos

El medio:

- -Disolver 32.5g en 500 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1 L de capacidad.
- -Llevar a ebullición mediante calentamiento en placa calefactora con agitación.
- -Trasvasar la mezcla a un bote Pyrex de 1 L de capacidad e introducir en el autoclave a 121°C durante 20 min.
- -Atemperar el medio a 50 °C en un baño termostático.

El suplemento antibiótico

- -Se prepara añadiendo 10 mL de agua destilada estéril al vial de antibiótico.
- -Cuando el medio de cultivo se utiliza y se encuentra atemperado a 50°C se disuelve en la proporción de 10 mL del vial en 500 mL de medio o la proporción adecuada.
- -Repartir el medio en botes de Pyrex de 100 mL de capacidad previamente esterilizados.

3.4.2.3 Método de siembra, incubación y expresión de resultados

- Poner 1 mL de la dilución en la placa de Petri.
- Añadir 15-20 mL del medio previamente fundido.
- Homogenizar con movimientos giratorios y en cruz con cuidado de no manchar con el agar la tapa de la placa de Petri. Dejar solidificar.

- Incubar a 25 °C (temperatura ambiente) durante 5 días realizando lecturas a los 3 días para observar el crecimiento de las colonias y efectuar un primer contaje. A partir del segundo día seleccionar las placas que tengan entre 30 y 300 colonias.
- Expresar el resultado como unidades formadoras de colonias (ufc)/g de alimento.

3.4.3 MICROORGANISMOS MARCADORES: INVESTIGACION Y RECUENTO DE FORMAS ESPORULADAS Y VEGETATIVAS DE CLOSTRIDIUM SULFITO REDUCTORES

3.4.3.1 Fundamento

Los microorganismos *anaerobios obligados* (*Bacillus*, *Clostridium*...) sólo pueden crecer a bajos potenciales redox, y algunos únicamente crecerán en ausencia de oxígeno. Suelen encontrarse en la parte interna de los alimentos no procesados y juntamente con los anaerobios facultativos constituyen los principales microorganismos de la alteración. Su valoración en los alimentos nos sirve como indicador de contaminación telúrica remota por la presencia de esporas resistentes. El número máximo de esporas, es decir, el "número total de esporos", se puede determinar usando tratamientos térmicos de la muestra del orden de los 70-80°C durante 10-15 minutos, con lo que conseguimos destruir las formas vegetativas y revivificar tan solo los esporos. Al hacer recuento hay que partir del principio de que una espora da lugar a una colonia en el medio de cultivo.

3.4.3.2 Material

- Pipetas de 1 mL
- Placas de Petri estériles
- Botes pyrex de 100 mL.

3.4.3.3 Preparación del medio

- *Agar SPS (Agar sulfito- polimixina - sulfadiazina)*
- Se disuelven 20 g en 500 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1L de capacidad y se hierve la mezcla hasta disolver el medio en placa calefactora con agitación. Pasar a botes de Pyrex de 100 mL.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- El medio resultante es de color claro y amarillento.

3.4.3.4 Método

- Sacar el medio del frigorífico y fundir mediante calentamiento en microondas. Atemperar a 45-50°C en un baño termostático.
- Poner 1 mL. de cada dilución en placa de Petri, estéril.
- Añadir 10-15 mL. de agar SPS, y dar movimientos circulares y de vaivén para que el inóculo se distribuya uniformemente. Dejar solidificar.
- Incubar a 46°C durante 24-28 horas
- Contar las colonias negras crecidas y expresar el resultado como ufc de colonias por gramo o mL. de alimento.

3.4.3.5 Interpretación.

El medio utilizado es selectivo para gérmenes sulfito- reductores. El sulfito sódico, por la acción sulfito reductora de la mayor parte de *los Clostridium*, se reduce a sulfuro. El sulfuro, al reaccionar con el citrato de hierro, da lugar a sulfuro de hierro, que se manifiesta formando un precipitado negro alrededor de las colonias. La sulfadiazina sódica es selectiva e inhibe el crecimiento de gérmenes Gram negativos.

3.4.4 INVESTIGACION Y RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS TOTALES

Identificación de colonias típicas en medio sólido

3.4.4.1 Preparación del medio

- *VRBG: Agar biliado rojo violeta glucosa.*
- -Se disuelven 19 g en 500 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1L de capacidad y se hierve la mezcla hasta disolver el medio en placa calefactora con agitación.
- -No resulta necesario ni deseable una esterilización.
- -Trasvasar a botes de pyrex de 100 mL de capacidad previamente esterilizados.
- -Conservar en el frigorífico hasta el momento de su utilización.

3.4.4.2 Método

- Sacar el medio del frigorífico y fundir mediante calentamiento en microondas. Atemperar a 45-50°C en un baño termostático.
- Poner 1 mL. de cada dilución en placa de Petri, estéril.
- Añadir 10-15 mL. de agar VRBG, y dar movimientos circulares y de vaivén para que el inóculo se distribuya uniformemente. Dejar solidificar.

- Añadir 4-5 mL. del mismo medio sobre la superficie solidificada, para evitar el crecimiento en superficie.
- Incubar 18-24 horas a 37°C.
- Contar las colonias típicas y expresar el resultado como ufc de colonias por gramo o mL. de alimento.

3.4.4.3 Interpretación.

Las sales biliares y el cristal violeta que forman parte del medio inhiben el crecimiento de la flora competitiva. Todas las *Enterobacteriaceae* fermentan la glucosa con producción de ácido, lo que se pone de manifiesto por un viraje al rojo y la precipitación de las sales biliares alrededor de las colonias. Las colonias de color rojo violeta rodeadas de un halo de precipitación también violeta, se consideran *Enterobacteriaceae*.

3.4.5 INVESTIGACION Y RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS LACTOSA POSITIVA (COLIFORMES)

3.4.5.1 Fundamento

Para la detección de Enterobacterias lactosa positivas (coliformes) se aprovechan ciertas características que las diferencian de otras *Enterobacteriaceae* como, por ejemplo, su capacidad para fermentar la lactosa con producción de ácido y gas en presencia de sales biliares.

3.4.5.2 Material

- El necesario para hacer diluciones de la muestra.
- Pipetas de 1 y 10 mL, estériles.
- Tubos.
- -Ser-O-Tap.
- -Campanas Durham.
- -Caldo lactosado con bilis y verde brillante (BBGB).
- Estufa a 37°C Y A 45°C

3.4.5.3 Preparación del medio:

- *BGBL* o *BGVB*: Caldo lactosado biliado verde brillante.

- Agregar 40 g a 1 litro de agua destilada en un Erlenmeyer de 1,5 L de capacidad.
- Se preparan tres series (una por cada dilución decimal) de cinco tubos por cada alimento, añadiendo 10 mL del medio en cada tubo. Introducir una campana de Durham en cada tubo. Tapar con Ser-O-tap.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 min. Comprobar que ha desaparecido el gas de todas las campanas de Durham.

3.4.5.4 Método e interpretación

- Seguir la técnica del número más probable (NMP) como se describe a continuación:
- En cada uno de los tubos de la primera serie se vierte 1 mL de la dilución de la muestra 1/10.
- En cada uno de los tubos de la segunda serie se vierte 1 mL de la dilución de la muestra 1/100.
- En cada uno de los tubos de la tercera serie se vierte 1 mL de la dilución de la muestra 1/1000.
- Incubar las tres series a una temperatura entre 30 y 37°C haciendo lecturas a las 24 y 48h.
- La reacción es positiva cuando se produce desprendimiento de gas en la campana Durham, por lo menos en 1/10 parte de su volumen, como consecuencia de la fermentación de la lactosa con formación de ácido y gas en presencia de sales biliares a la temperatura indicada.
- Con el número de tubos positivos en cada serie, se recurre a la tabla del NMP donde se obtendrá el recuento por gramo o mililitro de muestra.
- Si la misma técnica la realizamos en paralelo e incubamos posteriormente a 45°C seleccionamos el grupo de “Coliformes fecales”, que contienen una alta proporción de *E. coli*. Por lo que se pueden utilizar como indicadores de una contaminación fecal del alimento.

3.4.6 RECUENTO DE ENTEROCOCOS

3.4.6.1 Fundamento

Los Enterococos pueden tener un papel significativo como indicadores de prácticas de limpieza y desinfección deficientes en las industrias alimentarias, debido a

su gran resistencia a la desecación, a las temperaturas elevadas y bajas y a los detergentes y desinfectantes.

3.4.6.2 Material

- El necesario para realizar diluciones decimales.
- Pipetas de 1 mL.
- Placas de Petri estériles.
- Botes pyrex de 100 mL.

3.4.6.3 Preparación del medio

- *Agar KAA (Agar Kanamacina Aesculina Azida)*
- Se disuelven 24 g en 500 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 1L de capacidad y se hierve la mezcla hasta disolver el medio en placa calefactora con agitación. Pasar a botes de pyrex de 100 mL.
- Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.4.6.4 Método

- Atemperar el medio una vez fundido en un baño a 50°C.
- Poner 1 mL de cada dilución en una placa de Petri, estéril.
- Añadir 15 a 20 mL de medio KAA
- Realizar movimientos rotatorios y homogenizar.
- Incubar 24 horas a 37°C
- Contar las colonias típicas (pequeñas, de color gris oscuro con halo negro, como consecuencia de la hidrólisis de la esculina) y expresar el resultado como ufc de colonias por gramo o mL. de alimento.

3.5. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AGUAS POR FILTRACIÓN

3.5.1. Fundamento

La presencia de bacterias patógenas en el agua destinada al consumo humano es un riesgo siempre presente, que se incrementa en las áreas de mayor densidad de la población. La técnica de filtración por membrana (MF) se basa en hacer pasar la muestra de agua problema a través de un filtro de membrana microporosa, en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Se utilizan membranas que tienen

un tamaño de poro de 0.45 micras ya que la mayoría de los microorganismos tienen un tamaño superior (diámetro).

La normativa para abastecimiento y control de calidad de agua potable de consumo público establece como análisis microbiológicos a realizar las determinaciones de: coliformes totales, coliformes fecales, gérmenes totales, estreptococos fecales y clostridios sulfito-reductores. El número de determinaciones se establece para cada tipo de análisis, si este es mínimo, normal o completo.

3.5.2. Material

- Recipiente estéril para toma de muestras
- Sistema de filtración
- Fuente de vacío
- Membranas de filtración de 0.45 micras de diámetro de poro.
- Pinzas de acero con bordes biselados
- Placas Petri.
- Mechero
- Medio Slanetz y Bartley (Merck 1.05262.0500) para análisis de Enterococos fecales
- Agar Chromocult Coliform (Merck: 1.0426.0100) para análisis de *E. coli* y Coliformes.

3.4.5. Preparación del medio de cultivo Slanetz y Bartley.

- Pesar 41.5 g/litro de agua
- Esterilizar por calor durante 20 minutos en corriente de vapor
- Enfriar rápidamente
- No autoclavar
- Dispensar en placas. (El medio tiene un color pálido amarillo-marrón, aunque pueden aparecer tintes rojizos)

3.4.6. Preparación del medio de cultivo Chromocult.

- Este medio se emplea para la detección simultánea de coliformes totales y *E. coli* en agua y alimentos
- Disolver 26.5g/litro de agua calentando en agua hirviendo o en autoclave con corriente de vapor

- Agitar aproximadamente durante 35 min. (Puede quedar turbio pero no tiene efectos significativos)
- No introducir en autoclave.
- Dispensar en placas de petri.

3.4.7. Procedimiento

- Limpiar con alcohol la superficie del portafiltros.
- Colocar un filtro de membrana sobre el soporte con la ayuda de unas pinzas de acero previamente flameadas con alcohol.
- Situar un embudo sobre el soporte hasta que esté fijo.
- Verter la muestra de agua problema en el embudo (100ml) y aplicar el vacío hasta que el líquido se haya filtrado.
- Romper el vacío y extraer el embudo. Con las pinzas flameadas se extrae el filtro del soporte.
- Se coloca el filtro dentro de una placa Petri sobre el medio de cultivo, con la cuadrícula hacia arriba, procurando que no se formen burbujas entre la membrana y el medio de cultivo.
- Las placas se llevan a incubar en posición invertida en la estufa: Coliformes totales y *E.coli*: 24 horas a 37°C; Estreptococos fecales: 48 horas a 37°C.
- Colonias características: Las colonias de *E. coli* son azul oscuro a violeta y los coliformes totales son de color salmón a rojo. Si aparecen colonias azul claro a turquesa o incoloras, puede tratarse de otras bacterias Gram negativas. Para confirmar *E. coli* puede cubrirse la colonia azul-violeta con una gota del reactivo de Kovacs. Si este reactivo da un color cereza-rojo después de algunos segundos, significa que son colonias indol positivo, que confirma la presencia de *E. coli*.
- Por otra parte los Estreptococos fecales en el medio Slanetz y Bartley producen colonias de color granate.
- Los resultados se expresan en número de microorganismos/100 ml de agua.