

## MICROBIOLOGÍA

### Normas Generales para el trabajo microbiológico.

La condición previa básica para un buen resultado microbiológico, es que se trabaje en condiciones estériles.

En la ejecución deben observarse las siguientes medidas de precaución:

1. El sector debe estar lo más limpio posible y el aire debe mantenerse en quietud, por lo tanto no debe haber puertas o ventanas abiertas.
2. El puesto de trabajo debe estar limpio y aséptico, es decir se debe lavar con una solución al 1 x 1000 de una base desinfectante de amonio cuaternario o con alcohol de 70°. Estos desinfectantes no deben entrar en contacto con los dedos o sustratos nutritivos o cultivos.
3. El puesto de trabajo debe estar correctamente iluminado e impedir la luz solar directa.
4. La ropa de trabajo debe estar limpia, de manera que se pueda trabajar con los antebrazos descubiertos.
5. Las manos y antebrazos deben ser previamente lavados con jabón antes de iniciar el trabajo. Es conveniente recoger el cabello durante el trabajo.
6. Los sustratos nutritivos, los líquidos diluyentes, etc., que se utilizan deben estar estériles.
7. Los instrumentos con los que se trabaje (incluido embudo y portafiltro) deben esterilizarse de la siguiente forma:

Se lavan con detergente bactericida y se secan con papel tisú, se embeben con alcohol de 70° y se colocan bajo campana de flujo laminar, se flamea con el mechero asegurándose que todo el conjunto haya tenido contacto con la llama. Se deja enfriar y se coloca la membrana estéril de 0,45 micrones.

#### 1. Control microbiológico mediante filtración e incubación.

Una vez esterilizado y armado el equipo de filtración se procede al filtrado de la muestra; tomando una alícuota de 200 ml y pasándola por membrana estéril de 0,45 micrones.

Se coloca la membrana utilizada en la filtración en una caja de Petri con pad de celulosa embebido en medio de cultivo Millipore 2T para recuento total.

Una vez cerrada la caja de Petri se coloca en estufa para incubarla a 32°C durante 48 Hs.

#### Observación:

Pasadas las 48 hs se observa el desarrollo de los microorganismos ( sobre raspado y observación al microscopio) y se informan las unidades formadoras de colonias de levaduras, bacterias o mohos, pegando las membranas en las planillas de Control de Calidad.

#### 2. Control microbiológico por observación:

##### Técnica para recuento por epifluorescencia. Acridina.

Pesar 0,01 gr de naranja de acridina y llevar a 100 ml con agua destilada que estuvo en ebullición 10 minutos, se filtra por 0,45 micrones y se mantiene estéril.

Tomar con jeringa Sartorius o similar 40 ml de vino si es de línea o 10 cc si es de vasija e instalar en uno de los extremos un

porta filtro para membrana de 13 mm con un poro de 0,6 micrones para vasija y 0,2 micrones para línea.

Con otra jeringa descartable de 5cc. o similar tomar 3 cc. de naranja de acridina, instalar filtro estéril de 0,2 micrones en cuyos extremos instalamos el filtro del vino. Se pasan 2 ml de acridina y se deja fijar por un minuto. Se puede hacer pasar 1-2 ml de isopropanol para arrastrar el exceso de colorante.

Dejar secar la membrana colocar en portaobjeto, agregar aceite de inmersión Merck, colocar un cubre objeto y colocar una gota de aceite sobre éste y observar en objetivo de 100 x 1,25

Se acomoda el portaobjeto al microscópico asegurando una correcta inmersión de la lente del objetivo. El recorrido de la membrana debe ser en zig-zag tomando 10 campos al azar, comenzando en el extremo inferior y luego observar el centro contando en cada campo.

### **Expresión del resultado:**

$n \times 25$  = número de microorganismos presentes.

$n$  = número de microorganismos observados en 10 campos.

25 = factor para expresar el número de microorganismos por litro.

### **3. Observación microscópica directa.**

La muestra debe ser centrifugada durante 10 minutos a 3.500 r.p.m., se debe eliminar el líquido sobrenadante. El fondo es agitado vigorosamente y una gota colocada sobre un portaobjeto y luego se le coloca un cubreobjeto sobre éste.

Se agrega una gota de aceite de inmersión y se observa con objetivo de inmersión.

### **4. Técnica de Eucresina.**

#### **Material:**

Membrana de policarbonato de 0,2 u de poro de 13 mm. de diámetro.

#### **Reactivos:**

Eucresina 2GNX : 0,006 g/l en tampón fosfato pH 7,4, filtrada con membrana de 0,45 u

#### **Técnica:**

Después de filtrar por membrana de 0,2 micrones 40 ml de vino fraccionado o 10 ml de vino de bodega tomado con jeringa aséptica se lava el filtrado con solución fisiológica estéril, esto es para eliminar residuo de azúcar o compuestos orgánicos que interfieran la observación.

En este punto se introduce en el embudo 2-3 ml de colorante.

Se aspira una parte y se deja en contacto 1 ml con la membrana durante un minuto, se pasa el resto del colorante lavando con 1 ml de alcohol isopropílico, se aspira para secar y luego se seca la membrana.

Se coloca en el portaobjeto la membrana sobre ella aceite de inmersión, luego el cubreobjeto y luego una gota de aceite.

Se lee por inmersión con objetivo de 10 x 1,25 contando los campos al azar tomados en zig-zag

### **Expresión del resultado:**

$n \times 25$  = número de bacterias o levaduras por litro.

$n$  = número de microorganismos

25 = factor para determinar el número de microorganismos por litro.

**Nota:** Si se desea realizar un estudio más completo se debe realizar cultivo específico y coloración sobre el desarrollo con tinción GRAHAM, o continuar con técnica específica para cada familia. (ver técnica membrana, GRAHAM, etc.).

## **5. Recuento de levaduras.**

### **Material:**

Cámara de Thoma o cuentaglóbulos.

### **Técnica:**

Se hace en un retículo que tiene 25 cuadrados de 16 cuadritos c/u o sea  $25 \times 16 = 400$  cuadrados. Se coloca una gota sobre el retículo y un cubreobjeto sobre la gota, se observa con objetivo de inmersión.

Cuando la cantidad de levaduras es considerable se cuentan 5 cuadrados.

Este valor se divide por 5 y se multiplica por 16 y ese valor por 25 y por 10.000 para llevarlos a cantidad de levaduras por mililitro.

La superficie indicada en la cámara se refiere al menor cuadrado que en ella exista (cuadraditos de 16) de donde la superficie de la cámara es de  $1 \text{ mm}^2$ .

### **Resultado:**

Cantidad de levaduras por mililitro =  $(n / 5) \times 16 \times 25 \times 10000$

$n$  = número de células contadas.

### **Recuento:**

Se toma 1 gr de levaduras secas y se lleva a 1 litro con agua. Luego se hace recuento varias veces para sacar el promedio. Supongamos haber contado 250 levaduras por cada 16 cuadraditos.

Este dato se multiplica por 25  
 $250 \times 25 = 6.250 \times \text{vol. de la cámara}$   
 $= 6.250.000 \text{ cel / ml.}$

Supongamos que contamos todo el retículo.

### **Expresión del resultado:**

$\text{cel / ml} = n \times 25 \times \text{volumen de la cámara.}$   
 $n$  = número de células contadas.