

Republic of Ecuador

EDICT OF GOVERNMENT

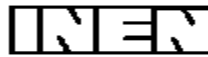
In order to promote public education and public safety, equal justice for all, a better informed citizenry, the rule of law, world trade and world peace, this legal document is hereby made available on a noncommercial basis, as it is the right of all humans to know and speak the laws that govern them.



NTE INEN 1529-1 (1999) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos. Preparación de medios de cultivo y reactivos

BLANK PAGE





INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 1 529-1:99

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS.

Primera Edición

MICROBIOLOGICAL CONTROL OF FOODS. PREPARATION OF CULTURE MEDIA AND REAGENTS.

First Edition

DESCRIPTORES: Alimentos, medios de cultivo, reactivos, ensayos microbiológicos.
AL 01.05-317
CDU: 614.31:579.67'24
CIU: 9320
ICS: 07.100.30

ÍNDICE DE SUSTANCIAS

	Pág.	
5.2	PCA	4
5.2.2	Agar eosina azul de metileno (EMB)	5
5.2.3	Agar citrato de Simmons	5
5.2.4	Agar cristal violeta-rojo neutro bilis (VRB)	5
5.2.5	Agar sal levadura de Davis	6
5.2.6	Agar Baird Parker	6
5.2.7	Agar bismuto sulfito (según Wilson y Blair)	7
5.2.8	Agar verde-brillante rojo-fenol	8
5.2.9	Agar fenilalanina	8
5.2.10	Agar hierro lisina	8
5.2.11	Agar hierro triple azúcar	9
5.2.12	Agar nutritivo semisólido	9
5.2.13	Agar SS	9
5.2.14	Agar Wort	10
5.2.15	Agar con 35% de sacarosa y 10% de glucosa	10
5.2.16	Agar patata dextrosa	10
5.2.17	Agar xilosa – lisina – desoxicolato (XLD)	11
5.2.18	Agar SPS	11
5.2.19	Agar TSN	12
5.2.20	Agar triptosa sulfito cicloserina (TSC)	13
5.2.21	Medio (SIM)	14
5.2.22	Tubos CPT para el diagnóstico del <i>Clostridium perfringens</i>	14
5.2.23	Medio tioglicolato fluido	14
5.2.24	Medio de transporte Stuart	14
5.3.1	Caldo verde brillante bilis lactosa	15
5.3.2	Caldo urea	15
5.3.3	Caldo carbohidrato con púrpura de bromocresol	15
5.3.4	Caldo lisina decarboxilasa	16
5.3.5	Caldo MR-VP	16
5.3.6	Caldo selenita sistina	16
5.3.7	Caldo soya triptica	17
5.3.8	Caldo tetracionato (Muller Kauffmann)	17
5.3.9	Caldo RV verde malaquita cloruro magnesio (Rappaport-Vassiliadis)	18
5.3.10	Caldo tristona (Ljutov)	19
5.3.11	Caldo tristona	19
5.3.12	Caldo nutritivo	19
5.3.13	Caldo lactosa	19
5.3.14	Caldo GN de enriquecimiento, según Hajna	19
5.3.15	Caldo extracto de malta	20
5.3.16	Caldo dextrosa bromocresol (BCP). Para enlatados de baja acidez	20
5.3.17	Caldo de hígado. Para enlatados de baja acidez	20
5.4.1	Agua peptonada	20
5.4.2	Agua peptonada tamponada	21
5.4.3	Solución fisiológica	21
5.4.4	Solución salina peptonada	21
5.4.5	Agua peptona sal al 5%	21
5.4.6	Agua peptona sal al 15%	21
5.4.7	Solución de sacarosa al 20%	21
5.4.8	Solución de citrato sódico al 2%	22
5.4.9	Solución de fosfato dipotásico al 2%	22
5.4.10	Solución de Ringer diluida al ¼	22
5.4.11	Diluyente para hisopos de alginato	22
5.4.12	Solución de gelatinasa al 5%	22
5.4.13	Solución de ácido clorhídrico	23
5.4.14	Solución de hidróxido de sodio	23
5.4.15	Reactivos para la prueba de Voges Proskauer	23
5.4.16	Reactivo de Kovacs	23

	Pág.	
5.4.17	Reactivo para β -galactosidasa	24
5.4.17.2	Solución ONPG	24
5.4.18	Solución de rojo de metilo	24
5.4.19	Solución de cloruro férrico al 10%	24
5.4.20	<i>Textigitol aniónico 7</i>	24
5.4.21	<i>Tritón X-100</i>	24
5.4.22	Mezcla desinfectante	25
5.4.23	Alcohol yodado	25
5.4.24	Solución de hipoclorito de sodio	25
5.4.25	<i>Vaspar</i>	25
5.4.26	Solución de ácido tartárico al 10%	25
5.4.27	Compuesto obturante	25
5.5.1	Solución de verde brillante al 10%	25
5.5.2	Solución púrpura de bromocresol al 0,2%	26
5.5.3	Solución de cristal violeta al 1%	26
6.1	Coloración de Gram	26
6.1.1.1	Cristal violeta fenicada (según Nicolle)	26
6.1.1.2	Fucsina fenicada (según Ziehl)	26
6.1.1.3	Lugol	26
6.1.1.4	Alcohol acetona	27
6.2	Coloración de esporos (Wirtz-Conklin)	27
6.2.1.1	Verde malaquita al 5%	27

Norma Técnica Ecuatoriana Voluntaria	CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	NTE INEN 1 529-1:99 1999-02
<p style="text-align: center;">1. OBJETO</p> <p>1.1 Esta norma da instrucciones generales y procedimientos específicos para la preparación de medios de cultivo, diluyentes y reactivos, a partir de sus componentes básicos.</p> <p style="text-align: center;">2. ALCANCE</p> <p>2.1 En esta norma, a más de las instrucciones generales para preparar los medios de cultivo y reactivos, se describen las fórmulas de los medios de cultivo, diluyentes, reactivos y colorantes, incluyendo los métodos de coloración, prescritos en los métodos de ensayo microbiológico establecidos en la NTE INEN 1529 para el control microbiológico de los alimentos.</p> <p style="text-align: center;">3. DEFINICIONES</p> <p>3.1 Medio de cultivo. Es cualquier sustancia nutritiva, sólida o líquida, que pueda ser utilizada en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, adicionada o no de sustancias enriquecedoras, selectivas, indicadoras y tamponantes.</p> <p>3.2 Agar. Medio de cultivo sólido con un contenido de agar-agar mayor del 1%</p> <p>3.3 Caldo. Es un medio de cultivo líquido, exento de agar.</p> <p>3.4 Medio base. Medio de cultivo que para ser utilizado, es necesario completar su formulación.</p> <p>3.5 Medio completo. Medio de cultivo que tiene todos sus componentes y está listo para el uso sin que haya necesidad de completar su formulación.</p> <p>3.6 Medio diferencial. Es un medio de cultivo sólido que contiene sustancias indicadoras, y en el cual, ciertas especies bacterianas forman colonias típicas.</p> <p>3.7 Medio de enriquecimiento no selectivo. Es un medio de cultivo exento de sustancias selectivas e indicadoras.</p> <p>3.8 Medio de enriquecimiento selectivo. Es un medio de cultivo líquido al que se ha adicionado una o más sustancias selectivas que limitan el desarrollo de especies bacterianas no deseadas, pudiendo o no, contener sustancias indicadoras.</p> <p>3.9 Medios para identificación bioquímica. Son medios de cultivo que contienen sustancias que evidencian la utilización metabólica de un substracto específico por el microorganismo.</p> <p>3.10 Medio selectivo diferencial. Es un medio de cultivo sólido que contiene sustancias selectivas e indicadoras que limitan el desarrollo de ciertas especies bacterias pero, permiten el crecimiento de otras, las cuales forman colonias típicas.</p> <p>3.11 Medio semisólido. Medio de cultivo con un contenido de agar-agar menor del 1%</p> <p>3.12 Agar-agar. Sustancia seca extraída de varias especies de algas que forma una gel.</p> <p>3.13 Agua estéril. Es el agua destilada o desmineralizada y esterilizada a 121°C por 20 minutos.</p> <p style="text-align: right;"><i>(Continúa)</i></p> <hr/> <p>DESCRIPTORES: Alimentos, medios de cultivo, reactivos, ensayos microbiológicos.</p>		

3.14 Agua de hidratación. Es el agua destilada, bidestilada o desmineralizada que se utiliza en la preparación del medio de cultivo.

3.15 Sustancias enriquecedoras. Son sustancias tales como: vitaminas, aminoácidos esenciales, sales minerales, ácidos grasos u otras sustancias nutritivas que se agregan al medio de cultivo en forma pura o como componente de algún otro ingrediente a fin de mejorar la calidad nutritiva del medio de cultivo original u obtener nuevas propiedades.

3.16 Sustancias indicadoras. Son sustancias naturales o sintéticas que cambian de color de acuerdo al pH de la solución en la que se encuentran.

3.17 Sustancias tamponantes. Son sustancias que amortiguan los cambios de pH que causarían la dilución o la adición de ciertas cantidades de bases o ácidos fuertes.

3.18 Sustancia selectiva. Sustancia química o biológica que inhibe o reduce la multiplicación de un microorganismo o grupo de microorganismos.

4. MATERIAL Y EQUIPO

4.1 Material de uso corriente en un laboratorio de microbiología y en especial:

4.1.1 Frascos o botellas de capacidad adecuada.

4.1.2 Tubos de ensayo de capacidad adecuada.

4.1.3 Tubos Durham.

4.1.4 Erlenmeyers.

4.1.5 Pipetas graduadas, de uso bacteriológico, de 1 cm³ de capacidad nominal, 5 cm³ y 10 cm³, con divisiones de 0,1 cm³ y una salida de 2 mm a 3 mm.

4.1.6 Probetas graduadas.

4.1.7 Dispensadores de capacidad adecuada.

4.1.8 Espátulas.

4.1.9 Planchas de calentamiento.

4.1.10 Destilador de vidrio para agua.

4.1.11 Baño de agua con control de temperatura de exactitud requerida.

4.1.12 Balanza con una graduación mínima de 0,01 g.

4.1.13 Potenciómetro para medir pH, con capacidad de lectura próxima a 0,01 unidad de pH a 25°C, permitiendo lecturas con una exactitud de $\pm 0,1$ unidad de pH.

4.1.14 Autoclave.

4.1.15 Equipo de esterilización por filtración.

(Continúa)

5. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

5.1 Generalidades.

5.1.1 Para que la preparación de los medios de cultivo sea más uniforme y aumente la reproducibilidad de los resultados se deben utilizar componentes básicos deshidratados o medios de cultivo deshidratados. Los medios deshidratados deben prepararse siguiendo rigurosamente las instrucciones del fabricante.

5.1.2 Para preparar los medios de cultivo y reactivos deben utilizarse sustancias químicas de calidad p.a.

5.1.3 Utilizar agua destilada libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos presentes. Si el agua destilada se prepara a partir de agua clorada, neutralizar el cloro antes de la destilación. Es preferible, utilizar un destilador de vidrio.

5.1.4 Preparar los medios de cultivo en recipientes de acero inoxidable o de vidrio resistente al calor, limpios y secos. La cantidad de medio por prepararse o esterilizarse no debe exceder el 1/3 de la capacidad del recipiente.

5.1.5 Utilizar balanzas con una graduación mínima de 0,01 g.

5.1.6 Añadir los componentes en las cantidades indicadas y los que entran en pequeñas cantidades, añadirlos en soluciones acuosas filtradas o, si son poco solubles en el agua, como soluciones alcohólicas o alcalinas. Los indicadores de pH adicionar en solución alcohólica sus sales, y en solución alcalina los ácidos.

5.1.7 Dejar los componentes o los medios deshidratados en contacto con el agua durante 15 minutos, para que se humecten.

5.1.8 Las sustancias termosensibles preparar a parte, esterilizar por filtración, tindalización, baño de agua hirviendo y añadirlos en condiciones asépticas al medio base esterilizado en autoclave; por ejemplo, el sulfito sódico, la suspensión de yema de huevo, algunos hidratos de carbono, etc.

5.1.9 Los medios que contienen agar calentar agitándoles constantemente hasta que el agar se disuelva completamente. Los caldos calentar, solo, si no se disuelven completamente a temperatura ambiente, luego, se les enfría hasta aproximadamente la temperatura ambiente y los agares, hasta alrededor de 50°C. Utilizar planchas de calentamiento y evitar calentamientos innecesarios.

5.1.10 Si el medio contiene precipitados propios o material sin disolver y éstos pueden interferir con el uso que se piensa dar al medio, si es caldo, clarificarlo ya sea por centrifugación o sedimentación y, si es agar, por filtración a través de una capa de algodón colocado sobre una gasa o a través de un papel para filtración rápida.

5.1.11 Ajustar el pH del medio de cultivo a un valor predeterminado de manera que después de esterilizado sea el deseado. Utilizar un potenciómetro que permita lecturas con una exactitud de $\pm 0,1$ unidad de pH y una solución de NaOH o HCl 1N, o de ácido láctico al 10%

5.1.12 Distribuir el medio en tubos y/o frascos en las cantidades necesarias, de modo que después de esterilizado el volumen final sea el deseado $\pm 2\%$. Los tubos y frascos de dilución deben mantenerse protegidos contra la evaporación.

5.1.13 En los tubos destinados a observar la producción de gas colocar tubos Durham invertidos.

5.1.14 Los medios que necesitan ser esterilizados en autoclave, hacerlo inmediatamente y solo hervir los que no necesitan. Los tiempos y temperaturas generalmente utilizados para la esterilización son los siguientes: 121°C durante 15 minutos y 115°C durante 20 minutos. Los caldos carbohidrato si se esterilizan por el calor, deben tratarse a 121°C durante 5 minutos o a 115°C durante 10 a 12 minutos. Controlar su esterilidad de la siguiente manera:

(Continúa)

5.1.14.1 Medios líquidos. Tomar al azar tres tubos o frascos e incubarlos 72 h a 30°C y a otros tres tubos o frascos, 5 días entre 15°C y 22°C. Los medios destinados al cultivo de microorganismos termófilos y termófilos deben incubarse a 55°C por 72 h. Si el medio líquido presenta evidencias de crecimiento, la prueba es positiva. Los que presentan indicios dudosos de crecimiento sembrar una asa del medio en una placa de agar e incubarlo de acuerdo a los tiempos y temperaturas señaladas. Registrar el número de tubos o frascos positivos de cada grupo de tres.

5.1.14.2 Medios sólidos. Tomar al azar tres tubos o frascos e incubarlos de acuerdo a lo señalado en 5.1.14.1. La prueba es positiva si el medio presenta desarrollo de colonias. No se deben utilizar los medios que den prueba positiva.

5.1.15 Preparar las placas de medio destinadas a cultivos por siembra en superficie distribuyendo en placas Petri estériles el medio inmediatamente después de preparado y esterilizado. Estas placas pueden permanecer a temperatura ambiente por máximo 2 días y si se colocan en fundas impermeables a la humedad, y en refrigeración por no más de una semana. Desechar las placas que presentan indicios de contaminación.

5.1.16 Las placas preparadas según se indica en 5.1.15 deben secarse inmediatamente antes de su inoculación. El secado puede realizarse de las siguientes formas:

5.1.16.1 Colocando la placa destapada y en posición invertida en un horno de convección o en un incubador a 50°C, durante 30 minutos.

5.1.16.2 Dejando la placa tapada y con la superficie del agar hacia arriba, en un incubador a 37°C durante cuatro horas.

5.1.16.3 Dejando la placa tapada, con la superficie del agar hacia arriba, en la mesa del laboratorio a temperatura ambiente por 16 horas.

5.1.17 Los medios de cultivo preparados y estériles pueden ser mantenidos en refrigeración, entre 3°C y 5°C, por no más de un mes a partir de su esterilización y en condiciones que impidan o retrasen cualquier cambio en su composición.

5.1.18 Los medios con agar nunca se deben fundir sobre la llama. Una vez fundidos se deben utilizar en un tiempo no mayor de 3 horas y no se fundirán más de una vez.

5.2 Preparación de medios de cultivo sólidos - AGARES

5.2.1 Agar para recuento en placa (PCA)

Composición:

Tripton (peptona de caseína)	5,0 g
Extracto de levadura	2,5 g
D(+) glucosa	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$. Calentar hasta la ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución. Distribuir de la manera adecuada y esterilizar 15 minutos a 121°C.

(Continúa)

5.2.2 Agar eosina azul de metileno (EMB)*Composición:*

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	5,0 g
Fosfato dipotásico	2,0 g
Eosina amarilla (solución acuosa al 2%)	20,0 cm ³
Azul de metileno (solución acuosa al 0,25%)	26,0 cm ³
Agar	15,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes, excepto los colorantes, en el agua destilada, dejar en reposo 15 minutos. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,1 \pm 0,1$ y llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta su completa disolución. Añadir la solución de eosina amarilla y la de azul de metileno, mezclar bien y distribuir de la manera adecuada (generalmente en volúmenes de 100 a 200 cm³). Esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.2.3 Agar citrato de Simmons*Composición:*

Fosfato de magnesio (7H ₂ O)	0,2 g
Fosfato mono-amónico	1,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Citrato sódico (2H ₂ O)	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Azul de bromotimol (solución acuosa al 0,2%)	40,0 cm ³
Agar	15,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar, dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,9 \pm 0,1$. Añadir la solución de azul bromotimol, calentar hasta la ebullición agitando frecuentemente para conseguir la completa disolución. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

5.2.4 Agar cristal violeta-rojo neutro-bilis (VRB)*Composición:*

Peptona	7,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Lactosa	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Sales biliares	1,5 g
Rojo neutro (solución alcohólica al 1%)	3,0 cm ³
Cristal violeta (solución acuosa al 0,05%)	4,0 cm ³
Agar	15,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua, añadir el agar y la solución de cristal violeta. Dejar en reposo 15 minutos y ajustar el pH de manera que sea $7,4 \pm 0,1$ el pH final. Llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta su completa disolución y verter en las placas. Para mantener la efectividad del medio EVITAR ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE.

(Continúa)

5.2.5 Agar sal levadura de Davis

Composición:

Nitrato de amonio	1,0 g
Sulfato de amonio	1,0 g
Fosfato disódico (anhidro)	4,0 g
Fosfato monopotásico	2,0 g
Cloruro de sodio	1,0 g
D(+) glucosa	10,0 g
Extracto de levadura (polvo)	1,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver todas las sales en 1 litro de agua destilada, añadir el agar, dejar 15 minutos en reposo a temperatura ambiente. Agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución. Distribuir en cantidades adecuadas, esterilizar 15 minutos a 115°C. El pH del medio después de esterilizado es de 6,6. Inmediatamente antes de verter el medio en las placas, a 1 litro de medio estéril, fundido y temperado aproximadamente a 50°C, añadir 57 cm³ de una solución estéril de ácido cítrico al 10% (esterilizada por filtración) para ajustar el pH a 3,5, y una vez ajustado, no calentar nuevamente el medio. Se puede substituir la acidificación utilizando soluciones estériles de antibióticos.

5.2.6 Agar Baird Parker

5.2.6.1 Medio base

Composición:

Triptona	10,0 g
Extracto de carne	5,0 g
Extracto de levadura	1,0 g
Piruvato de sodio	10,0 g
Glicina	12,0 g
Cloruro de litio.6H ₂ O	5,0 g
Agar	20,0 g
Sulfametacina sódica (cuando necesario)	55,0 mg
Agua destilada	1,0 litro

Preparación del medio base. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, añadir el agar, dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,8 \pm 0,2$. Agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución, distribuir a razón de 90 cm³ por frasco y esterilizar 15 minutos a 121°C. Puede conservarse más de un mes a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.2.6.2 Preparación de las soluciones

a) Solución de telurito potásico al 1%

Composición:

Telurito potásico	1,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Con un mínimo de calentamiento, disolver el telurito potásico en agua y esterilizar por filtración. La solución puede mantenerse en refrigeración entre 0 y 5°C durante varios meses.

(Continúa)

b) Solución de piruvato sódico al 20%

Composición:

Piruvato sódico	20,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el piruvato sódico en una parte de agua. Completar el volumen y esterilizar por filtración. Almacenar la solución entre 0 y 5°C por no más de un mes.

c) Solución de sulfametacina sódica

Composición:

Sulfametacina sódica	0,2 g
Solución de hidróxido de sodio 0,1N	10,0 cm ³
Agua destilada para completar	100,0 cm ³

Preparación. Disolver la sulfametacina sódica en la solución de hidróxido de sodio y completar con agua hasta 100 cm³. Cuando se sospeche que la muestra de alimento contiene bacterias del género **Proteus** se puede añadir, antes de la esterilización, 27,5 cm³ de esta solución a cada litro de medio base.

d) Emulsión de yema de huevo

Preparación. Utilizar huevos frescos de gallina, con la cáscara intacta y libres de antibióticos. Limpiar con cepillo, jabón y agua ligeramente tibia, sumergir en etanol al 70% (v/v) y dejarlos unas horas. Flamear y asépticamente retirar con una pipeta estéril todas las claras, y las yemas colocar dentro de una probeta graduada estéril. A 50 cm³ de yema añadir 50 cm³ de solución fisiológica estéril y mezclar en una licuadora a pocas revoluciones, para evitar la formación de espuma. Utilizar la emulsión inmediatamente después de su preparación.

En el comercio existe preparada.

5.2.6.3 Preparación del medio completo

Composición:

Medio base	90,0 cm ³
Solución de telurito potásico al 1%	1,0 cm ³
Solución de piruvato sódico al 20%	5,0 cm ³
Emulsión de yema de huevo	5,0 cm ³

Preparación. A 90 cm³ del medio base fundido y enfriado hasta aproximadamente 50°C, asépticamente, añadir cada una de las soluciones previamente calentadas (45°C) mezclando bien después de cada adición e inmediatamente distribuir en placas, pues, no se puede almacenar el medio completo.

5.2.6.4 Preparación de las placas de agar. Inmediatamente después de preparado el medio completo, distribuir aproximadamente 20 cm³ del medio en placas Petri estériles y dejar solidificar. El medio debe estar densamente opaco y las placas claras no se utilizan. Las placas sin secar se pueden almacenar entre 0 y 5°C por no más de 24 horas. Antes del uso, secar las placas según se indica en el numeral 5.1.16

5.2.7 Agar bismuto sulfito (según Wilson y Blair)

(Continúa)

Composición:

Extracto de carne	5,0 g
Peptona o polipeptona	10,0 g
D(+) glucosa	5,0 g
Fosfato disódico	4,0 g
Sulfato ferroso	0,3 g
Indicador bismuto sulfito	8,0 g
Verde brillante (solución acuosa al 1%)	2,5 cm ³
Agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar, dejar en reposo 15 minutos. Ajustar el pH de manera que sea $7,6 \pm 0,2$ el pH final, adicionar la solución de verde brillante. Con agitación frecuente calentar hasta la ebullición. Se forma un precipitado que no llega a disolverse, agitar delicadamente para suspender el precipitado, e inmediatamente, distribuir 20 cm³ del medio en placas Petri estériles. Preparar el medio un día antes de su uso y guardarlo en refrigeración, pues, la selectividad del medio disminuye 48 horas después de su preparación. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Secar las placas según 5.1.16

5.2.8 Agar verde-brillante rojo-fenol*Composición:*

Extracto de levadura	3,0 g
Proteosa peptona o polipeptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
Rojo fenol (solución acuosa al 0,2%)	40,0 cm ³
Verde brillante (solución acuosa al 0,25%)	5,0 cm ³
Agar	20,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,9 \pm 0,2$. Añadir las soluciones de rojo fenol y verde brillante. Con agitación frecuente llevar a ebullición hasta su disolución. En cantidades adecuadas esterilizar 12 minutos a 121°C (un calentamiento mayor disminuye la selectividad del medio). Distribuir aproximadamente 20 cm³ del medio en placas Petri estériles. Secar las placas según 5.1.16

5.2.9 Agar fenilalanina*Composición:*

Extracto de levadura	3,0 g
DL-fenilalanina *	2,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	12,0 g
Agua destilada	1,0 litro

* ó 1 g de L-fenilalanina

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,3 \pm 1$. Llevar a ebullición y agitar frecuentemente hasta su disolución. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

(Continúa)

5.2.10 Agar hierro lisina*Composición:*

Peptona o gelisato	5,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
D(+) glucosa	1,0 g
L-lisina	10,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Tiosulfato sódico (Na ₂ S ₂ O ₃)	0,04g
Púrpura de bromocresol (solución acuosa al 1%)	2,0 cm ³
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,7 \pm 0,2$. Juntar la solución de púrpura de bromocresol, llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta su disolución. Distribuir en tubos y tapar de modo que se mantengan condiciones de aerobiosis durante su uso. Esterilizar 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada, de suerte que se obtengan columnas de medio de 4 cm y un sesgo de 2 cm.

5.2.11 Agar hierro triple azúcar*Composición:*

Extracto de carne	3,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Peptona	15,0 g
Proteosa peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sacarosa	10,0 g
D(+) glucosa	1,0 g
Citrato férrico amónico	0,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Tiosulfato sódico	0,5 g
Rojo fenol (solución acuosa al 0,2%)	12,0 cm ³
Agar	12,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, adicionar la solución de rojo fenol y ajustar el pH de modo que después de esterilizado sea $7,4 \pm 0,1$. Llevar a ebullición y agitar frecuentemente hasta su disolución. Distribuir en tubos y tapar de manera que se mantengan condiciones de aerobiosis durante su utilización. Esterilizar 15 minutos a 121°C. Dejar enfriar los tubos en posición inclinada, de forma que se obtengan columnas de medio de 4 cm y un sesgo de 5 cm, aproximadamente.

5.2.12 Agar nutritivo semisólido*Composición:*

Extracto de carne	3,0 g
Peptona o gelisato	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agar	4,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de modo que después de esterilizado sea $7,4 \pm 0,2$. Llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta su disolución. Distribuir en tubos con tapa de rosca y tapar dejando la tapa floja $\frac{1}{4}$ de vuelta. Esterilizar 15 minutos a 121°C. Ajustar las tapas para guardarlos.

5.2.13 Agar SS*Composición:*

Extracto de carne	5,0 g
Polipeptona o proteose peptona	5,0 g
Lactosa	10,0 g
Sales biliares	8,5 g
Citrato sódico	10,0 g
Tiosulfato sódico	8,5 g
Citrato férrico	1,0 g
Verde brillante (solución acuosa al 0,1%)	0,33 cm ³
Rojo neutro (solución alcohólica al 1%)	2,5 cm ³
Agar	13,5 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos. Ajustar el pH de modo que sea $7,0 \pm 0,1$ el pH final, adicionar las soluciones de verde brillante y rojo neutro, y agitando frecuentemente, llevar a ebullición hasta su disolución. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Distribuir aproximadamente 20 cm³ del medio en placas Petri estériles. Secar las placas según 5.1.16

5.2.14 Agar Wort*Composición:*

Extracto de malta	15,0 g
Peptona	0,78 g
Maltosa	12,75 g
Dextrina	2,75 g
Glicerol	2,35 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Cloruro de amonio	1,0 g
Agar	20,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $4,8 \pm 0,2$. Con agitación frecuente llevar a ebullición hasta disolver. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Para ajustar el pH a 3,5, inmediatamente antes de verter el medio en las placas, añadir a un litro de medio, aproximadamente 12 cm³ de ácido láctico al 10% ó 9 cm³ de ácido tartárico al 10% esterilizados por filtración. Evitar cualquier calentamiento prolongado o repetido del medio.

5.2.15 Agar Wort con 35% de sacarosa y 10% de glucosa*Composición:*

Componentes del agar Wort para 1 litro de medio (ver 5.2.14)

Sacarosa	350,0 g
D(+) glucosa	100,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver 350 g de sacarosa y 100 g de glucosa en 1 litro de agua destilada, en este jarabe disolver los componentes del agar Wort. Esterilizar a 108°C por 20 minutos. Evitar cualquier calentamiento prolongado o repetido del medio. Se recomienda prepararlo inmediatamente antes del uso.

(Continúa)

5.2.16 Agar patata dextrosa*Composición:*

Patatas peladas	200,0 g
D(+) glucosa	20,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Pelar las patatas, cortar en pequeños cubos y hervir en 1 litro de agua destilada por 1 hora. Filtrar y completar el filtrado a 1 litro. Añadir la glucosa y el agar, dejar 15 minutos en reposo a temperatura ambiente, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $5,6 \pm 0,1$. Agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución. Distribuir en frascos a razón de 100 cm³ y esterilizar 15 minutos a 121°C. Para ajustar el pH a 3,5, inmediatamente antes de verter el medio en las placas, añadir 14 cm³ de una solución estéril de ácido tartárico al 10% a 1 litro de medio temperado aproximadamente a 50°C. Una vez ajustado el pH a 3,5 NO CALENTAR NUEVAMENTE EL MEDIO.

5.2.17 Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD)*Composición:*

Extracto de levadura	3,0 g
L(+) lisina	5,0 g
D(+) xilosa	3,5 g
Lactosa	7,5 g
Sacarosa	7,5 g
Desoxicolato de sodio	2,5 g
Citrato férrico amónico	0,8 g
Tiosulfato de sodio	6,8 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Rojo fenol (solución acuosa al 0,2%)	40,0 cm ³
Agar	15,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, adicionar el agar y dejar en reposo 15 minutos, ajustar el pH de manera que sea $7,4 \pm 0,1$ el pH final, añadir la solución de rojo fenol y, agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta disolver. NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Inmediatamente, distribuir alrededor de 20 cm³ del medio en placas Petri estériles. Secar las placas según 5.1.16.

5.2.18 Agar SPS**5.2.18.1 Medio base***Composición:*

Petona	15,0 g
Extracto de levadura	10,0 g
Citrato férrico	0,5 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación del medio base. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$ y, agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución. Esterilizar 15 minutos a 121°C. El medio base, preparado, puede almacenarse por meses.

(Continúa)

5.2.18.2 Preparación de las soluciones

a) Solución de sulfito de sodio al 10%

Composición:

Sulfito de sodio (Na ₂ SO ₃ .7H ₂ O)	10,0	g
Agua destilada	100,0	cm ³

Preparación. Disolver el sulfito de sodio y esterilizar por filtración.

b) Solución de sulfato de polimixina B al 0,2%

Composición:

Sulfato de polimixina B	0,2	g
Agua destilada	100,0	cm ³

Preparación. Disolver el sulfato de polimixina B y esterilizar por filtración.

c) Solución de sulfadiazina sódica al 1,2%

Composición:

Sulfadiazina sódica	1,2	g
Agua destilada	100,0	cm ³

Preparación. Disolver la sulfadiazina sódica y esterilizar por filtración.

5.2.18.3 Preparación del medio completo*Composición:*

Medio base	1,0	litro
Solución de sulfito de sodio al 10%	5,0	cm ³
Solución de sulfato de polimixina B al 0,2%	5,0	cm ³
Solución de sulfadiazina sódica al 1,2%	10,0	cm ³

Preparación. Inmediatamente antes del uso, a 1 litro de medio base fundido y enfriado hasta aproximadamente 50°C, asépticamente, añadir cada una de las soluciones mezclando bien después de cada adición. Distribuir asépticamente volúmenes de 25 cm³ en tubos de 200 mm x 24 mm o en placas Petri. EVITAR CUALQUIER RECALENTAMIENTO DEL MEDIO COMPLETO.

5.2.19 Agar TSN**5.2.19.1 Medio base***Composición:*

Triptona	15,0	g
Extracto de levadura	10,0	g
Citrato férrico	0,5	g
Agar	13,5	g
Agua destilada	1,0	litro

Preparación del medio base. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea 7,2 ± 0,2 y agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución. Esterilizar 15 minutos a 121°C. El medio base, preparado, puede almacenarse por meses.

5.2.19.2 Preparación de las soluciones

- a) Solución de sulfito de sodio al 10% (ver 5.2.18.2 literal a)
 b) Solución de sulfato de polimixina B al 0,2% (ver 5.2.18.2 literal b)
 c) Solución de sulfato de neomicina al 1%

Composición:

Sulfato de neomicina	1,0	g
Agua destilada	100,0	cm ³

Preparación. Disolver el sulfato de neomicina y esterilizar por filtración.

5.2.19.3 Preparación del medio completo*Composición:*

Medio base	1,0	litro
Solución de sulfito de sodio al 10%	10,0	cm ³
Solución de sulfato de polimixina B al 0,2%	10,0	cm ³
Solución de sulfato de neomicina al 1%	5,0	cm ³

Preparación. Inmediatamente antes del uso, a 1 litro del medio base fundido y enfriado hasta aproximadamente 50°C, asépticamente, añadir cada una de las soluciones mezclando bien después de cada adición. Distribuir asépticamente volúmenes de 25 cm³ en tubos de 200 mm x 24 mm o en placas Petri, estériles. EVITAR CUALQUIER RECALENTAMIENTO DEL MEDIO COMPLETO.

5.2.20 Agar triptosa sulfito cicloserina (TSC)**5.2.20.1 Medio base***Composición:*

Triptosa	15,0	g
Extracto de levadura	5,0	g
Soitona	5,0	g
Citrato férrico amónico	1,0	g
Metabisulfito de sodio	1,0	g
Agar	15,0	g
Agua destilada	1,0	g

Preparación del medio base. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, añadir el agar y dejar 15 minutos en reposo a temperatura ambiente. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,6 \pm 0,1$. Agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta obtener una completa disolución. Esterilizar 15 minutos a 121°C. El medio base, preparado, puede almacenarse por meses.

5.2.20.2 Solución de D-cicloserina

- a) Tampón fosfato 0,05 M (pH 8,0)

Composición:

Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	8,7	g
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	0,48	g
Agua destilada	1,0	litro

(Continúa)

Preparación. Disolver los componentes en el agua. Chequear el pH y, si es necesario, ajustar a 8.

b) Solución de D-cicloserina al 5%

Composición:

D-cicloserina	5,0 g
Tampón fosfato pH 8,0 (ver 5.2.20.2 literal a)	100,0 cm ³

Preparación. Sin calentar, disolver la D-cicloserina en el tampón fosfato y esterilizar por filtración.

5.2.20.3 Preparación del medio completo

Composición:

Medio base	1,0 litro
Solución de D-cicloserina al 5%	10,0 cm ³

Preparación. Inmediatamente, antes del uso, a 1 litro de medio base fundido y enfriado hasta aproximadamente 50°C, asépticamente, añadir los 10 cm³ de la solución de D-cicloserina, mezclar bien. Distribuir asépticamente volúmenes de 25 cm³ en tubos de 200 mm x 24 mm o en placas Petri, estériles. EVITAR CUALQUIER RECALENTAMIENTO DEL MEDIO COMPLETO.

5.2.21 Medio SIM

Composición:

Peptona de casína	20,0 g
Peptona de carne	6,6 g
Citrato férrico amónico	0,2 g
Tiosulfato de sodio	0,2 g
Agar	3,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, añadir el agar y dejar 15 minutos en reposo a temperatura ambiente. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea 7,3. Llevar a ebullición agitando frecuentemente hasta disolver. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.2.22 Preparación de tubos CPT para el diagnóstico de Clostridium perfringens.

En tubos de ensayo estériles, asépticamente, distribuir agar triptosa sulfito cicloserina fundido hasta obtener una capa de 2 cm de alto. Colocar los tubos en refrigeración hasta que el agar se solidifique. Proceder de igual manera para formar sobre esta capa la capa central con agar al 2% y finalmente, con el medio SIM, la capa superficial.

5.2.23 Medio tioglicolato fluido

Composición:

Peptona de caseína	15,0 g
Extracto de levadura	5,0 g
D(+) glucosa	5,0 g
L(+) cisteína	0,5 g
Cloruro de sodio	2,5 g
Tioglicolato de sodio	0,5 g
Resazurina sódica (solución acuosa al 0,1%)	1,0 cm ³
Agar	0,8 g
Agua destilada	1,0 litro

(Continúa)

Preparación. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,1 \pm 0,1$. Con agitación frecuente llevar a ebullición hasta disolver, distribuir en tubos con tapón de rosca, esterilizar 15 minutos a 121°C y enfriar rápidamente. Inmediatamente antes de su uso, calentar los tubos en baño de agua hirviendo durante 10 minutos para eliminar el oxígeno disuelto y enfriar con rapidez en agua de grifo. El medio no debe presentar coloración rosa. Desechar los tubos si esta coloración no se elimina por ebullición (una sola vez). Se recomienda utilizarlo recién preparado.

5.2.24 Medio de transporte de Stuart

Composición:

Tioglicolato de sodio	1,0 g
Glicerofosfato de sodio (solución acuosa al 20%)	50,0 cm ³
Cloruro de calcio (solución acuosa al 1%)	10,0 cm ³
Azul de metileno (solución acuosa al 0,1%)	2,0 cm ³
Agar	3,0 g
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver el tioglicolato en el agua destilada, añadir el agar, llevar a ebullición agitando frecuentemente y ajustar el pH a 7,2. Añadir las soluciones de glicerofosfato de sodio y de cloruro de calcio, mezclar y ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,4 \pm 0,1$. Añadir la solución de azul de metileno, mezclar y colocar en corriente de vapor por unos minutos. Distribuir en tubos con tapas de rosca llenándolos por completo. Ajustar bien las tapas y esterilizar 20 minutos a 115°C . Inmediatamente antes de su uso, los tubos con las tapas ligeramente aflojadas calentar en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos, ajustar nuevamente las tapas y enfriarlos con rapidez en agua corriente. El medio no debe presentar coloración azul. Si esta coloración no se elimina por ebullición (una sola vez), desechar los tubos. Se recomienda utilizarlo recién preparado.

5.3 Caldos

5.3.1 Caldo verde brillante bilis lactosa

Composición:

Peptona	10,0 g
Lactosa	10,0 g
Bilis de buey purificada	20,0 g
Verde brillante (solución acuosa al 0,1%)	13,3 cm ³
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

Preparación. Disolver la peptona y la lactosa en aproximadamente 500 cm³ de agua destilada y adicionar la bilis disuelta en 200 cm³ de agua. Añadir agua destilada hasta 950 cm³ y ajustar el pH a 7,4. El pH después de esterilizado debe ser $7,2 \pm 0,1$. Añadir la solución de verde brillante, ajustar el volumen a 1 litro, agitar y, si es necesario, filtrar por algodón. Para preparar el medio de doble concentración utilizar el doble de la fórmula. Distribuir volúmenes de 10 cm³ en tubos que contengan tubos Durham invertidos. Tapar los tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C .

5.3.2 Caldo urea

Composición:

Urea	20,0 g
Extracto de levadura	0,1 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	9,1 g
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	9,5 g
Rojo fenol (solución acuosa al 0,2%)	5,0 cm ³
Agua destilada	1,0 litro

(Continúa)

Preparación. SIN CALENTAR, disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, adicionar la solución de rojo fenol y esterilizar por filtración. El pH final del medio es de $6,8 \pm 0,1$. Asépticamente, distribuir en tubos estériles.

5.3.3 Caldo carbohidrato con púrpura de bromocresol

Composición

Peptona	10,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Púrpura de bromocresol (solución acuosa al 1%)	3,0 cm ³
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,8 \pm 0,1$. Adicionar la solución de púrpura de bromocresol y la cantidad deseada del carbohidrato seleccionado (la concentración de carbohidratos que generalmente se emplea es del 1%), agitar para disolver. Si la adición del carbohidrato acidifica el medio, corregir el pH con hidróxido de sodio 0,1N para restaurar el color. Distribuir en tubos que contengan tubos Durham invertidos. Esterilizar 10 minutos a 121°C.

5.3.4 Caldo lisina-descarboxilasa

Composición:

L-lisina	5,0 g
Peptona	5,0 g
D(+) glucosa	1,0 g
Extracto de levadura	3,0 g
Púrpura de bromocresol (solución acuosa al 1%)	2,0 cm ³
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en 1 litro de agua destilada, si es necesario, calentar suavemente agitando para conseguir su disolución. Ajustar el pH de modo que después de esterilizado sea $6,6 \pm 0,1$ y adicionar la solución de púrpura de bromocresol. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.5 Caldo MR-VP

Composición:

Peptona	7,0 g
D(+) glucosa	5,0 g
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	5,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Calentando delicadamente, disolver los componentes en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,9 \pm 0,1$. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.6 Caldo selenito cistina

5.3.6.1 Medio completo

Composición:

Triptona	5,0 g
Lactosa	4,0 g
Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)	10,0 g
Sodio selenito (NaHSeO ₃)	4,0 g
L-cistina (solución al 0,1%)	10,0 cm ³
Agua destilada cantidad suficiente para completar	1,0 litro

5.3.6.2 Solución de L-cistina al 0,1%*Composición:*

L-cistina	0,1 g
Hidróxido de sodio 1N	15,0 cm ³
Agua destilada para completar	100,0 cm ³

Preparación. Disolver la L-cistina en hidróxido de sodio 1N estéril, ajustar el volumen a 100 cm³ con agua destilada estéril. ESTERILIZAR POR FILTRACION.

5.3.6.3 *Preparación del medio completo.* Disolver los componentes en el agua destilada, calentar hasta su disolución. Ajustar el pH de manera que sea $7,0 \pm 0,1$ el pH final. Calentar 10 minutos en baño de agua hirviendo, NO ESTERILIZAR EN AUTOCLAVE. Enfriar, y aseptícamente añadir 0,1 cm³ de la solución de L-cistina por cada 10 cm³ de medio y distribuir volúmenes de 10 cm³ en tubos ó 100 cm³ en frascos, estériles. Utilizar el mismo día en que se prepara.

5.3.7 Caldo soya tríptica (TSB)*Composición:*

Triptona	17,0 g
Fitona(peptona de soya)	3,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
D(+) glucosa	2,5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Calentando suavemente, disolver los componentes en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,2 \pm 0,2$. Distribuir volúmenes adecuados en tubos y/o frascos y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.8 Caldo tetracionato (Muller Kauffmann)**5.3.8.1** Medio base*Composición:*

Extracto de carne	0,9 g
Peptona de carne	4,5 g
Extracto de levadura	1,8 g
Cloruro de sodio	4,5 g
Carbonato de calcio	25,0 g
Agua destilada	900,0 cm ³

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada, calentar hasta que los componentes solubles se disuelvan. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,6 \pm 0,2$. Esterilizar 20 minutos a 121°C.

5.3.8.2 Preparación de soluciones

a) Solución de tiosulfato de sodio

Composición:

Tiosulfato de sodio	40,7 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el tiosulfato de sodio en un poco de agua, completar el volumen final. Esterilizar 20 minutos a 121°C.

(Continúa)

b) Solución de yodo

Composición:

Yodo resublimado	20,0 g
Yoduro de potasio	25,0 g
Agua destilada estéril	100,0 cm ³

Preparación. En un mortero estéril, triturar el yoduro de potasio juntamente con el yodo, añadir un mínimo de agua destilada estéril. Continuar triturando y añadiendo poco a poco el agua hasta su completa disolución. Ajustar el volumen a 100 cm³ y guardar en la oscuridad, en un frasco ámbar bien cerrado.

c) Solución de verde brillante

Composición:

Verde brillante	0,5 g
Agua destilada estéril	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el verde brillante en agua destilada estéril, dejar por lo menos un día en la oscuridad para que se autoesterilice. Conservar en frasco oscuro.

d) Solución de bilis

Composición:

Bilis desecada	9,5 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Añadir la bilis al agua y llevar a ebullición, hasta su completa disolución. Esterilizar 20 minutos a 121°C.

5.3.8.3 Preparación del medio completo*Composición:*

Medio base	900,0 cm ³
Solución de tiosulfato de sodio	100,0 cm ³
Solución de yodo	20,0 cm ³
Solución de verde brillante	2,0 cm ³
Solución de bilis	50,0 cm ³

Preparación. A 900 cm³ del medio base, asépticamente, añadir la solución de tiosulfato y la de bilis, mezclar bien después de cada adición. Inmediatamente antes del uso, añadir la solución de yodo y de verde brillante, después de estas adiciones no volver a calentar. Asépticamente, distribuir el medio completo en volúmenes de 100 ó de 10 cm³ en frascos estériles de 500 cm³ de capacidad o en tubos de 150 mm x 16 mm. Tener cuidado para repartir homogéneamente el precipitado que eventualmente puede formarse.

5.3.9 Caldo RV verde malaquita cloruro magnésico (Rappaport-Vassiliadis)*Composición:*

Peptona de soya	4,5 g
Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl ₂ .6H ₂ O)	29,0 g
Cloruro de sodio	8,0 g
Fosfato dipotásico	0,4 g
Fosfato monopotásico	0,6 g
Verde malaquita (solución acuosa al 1,8%)	2,0 cm ³
Agua destilada	1,0 litro

(Continúa)

Preparación. Disolver la peptona, el cloruro de sodio, los fosfatos en 900 cm³ de agua destilada, calentar hasta su disolución (hacer esta solución en el día de preparar el medio). Disolver el cloruro de magnesio en 100 cm³ de agua (esta solución se puede guardar en un frasco oscuro, a temperatura ambiente). Mezclar estas dos soluciones y ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $5,2 \pm 0,1$. Añadir 2 cm³ de la solución de verde malaquita y distribuir el medio completo en volúmenes de 100 cm³ ó de 10 cm³ en frascos estériles de 500 cm³ capacidad o en tubos de 150 mm x 16 mm. Esterilizar 15 minutos a 115°C. El medio de cultivo preparado se puede almacenar en refrigeración durante siete meses, mínimo.

5.3.10 Caldo triptona (Ljutov)

Composición:

Triptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
DI-triptofano	1,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,5 \pm 0,1$. Distribuir volúmenes adecuados en tubos. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.11 Caldo triptona

Composición:

Triptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua destilada, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,2 \pm 0,1$. Distribuir volúmenes adecuados en tubos. Esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.12 Caldo nutritivo

Composición:

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,9 \pm 0,1$. Distribuir en la forma necesaria y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.3.13 Caldo lactosa

Composición:

Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Lactosa	5,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $6,9 \pm 0,2$. Distribuir en la forma necesaria y esterilizar 15 minutos a 121°C.

(Continúa)

5.3.14 Caldo GN de enriquecimiento, según Hajna*Composición:*

Triptosa	20,0 g
D(+) glucosa	1,0 g
D(-) manita	2,0 g
Citrato de sodio	5,0 g
Desoxicolato de sodio	0,5 g
Fosfato dipotásico	4,0 g
Fosfato monopotásico	1,5 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,2$. Distribuir de la manera necesaria y esterilizar 15 minutos a 116°C o en vapor de agua durante 30 minutos. Evitar cualquier sobrecalentamiento.

5.3.15 Caldo extracto de malta*Composición:*

Extracto de malta	15,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver el extracto de malta en un litro de agua destilada, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $4,7 \pm 0,2$. Distribuir en tubos. Esterilizar 15 minutos a 121°C .

5.3.16 Caldo dextrosa púrpura de bromocresol (BCP). Para enlatados de baja acidez.*Composición:*

D(+) glucosa	10,0 g
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Púrpura de bromocresol (solución acuosa al 1,6%)	2,0 cm^3
Almidón soluble	1,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,2$. Distribuir en tubos y esterilizar 15 minutos a 121°C .

5.3.17 Caldo de hígado. Para enlatados de baja acidez*Composición*

Hígado de res, picado	500,0 g
Peptona	10,0 g
Fosfato dipotásico	1,0 g
Almidón soluble	1,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Picar el hígado, hervir una hora en un litro de agua destilada. Enfriar y ajustar el pH a 7,0, hervir 10 minutos más. Filtrar en gasa y presionar para extraer el líquido restante. Añadir los demás ingredientes y ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$. Completar hasta 1 litro con agua destilada. Filtrar en papel para filtración rápida (en este momento, se pueden guardar separadamente el caldo, y el hígado en el congelador, para uso posterior). En tubos de 160 mm x 16 mm distribuir los pedacitos de hígado hasta 2,5 cm de altura y añadir de 10 a 12 cm^3 de caldo, en cada tubo. Esterilizar 20 minutos a 121°C . Para mantener condiciones de anaerobiosis se puede adicionar 0,1% de tioglicolato de sodio.

5.4 Diluyentes y reactivos

5.4.1 Agua peptonada al 0,1%

Composición:

Peptona	1,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver la peptona en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$. Distribuir en frascos o en tubos, de modo que después de esterilizado el volumen sea de $\pm 2\%$ del deseado; o, si los recipientes tienen marcado el volumen, después de esterilizado a 121°C por 15 minutos, asépticamente, reajustarlo con una pipeta.

5.4.2 Agua peptona tamponada

Composición:

Peptona	10,0 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Fosfato disódico hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	9,0 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	1,5 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los ingredientes en 1 litro de agua destilada. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$. Distribuir según convenga y esterilizar 20 minutos a 121°C .

5.4.3 Solución fisiológica

Composición:

Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver el cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada. Distribuir según convenga. Esterilizar 15 minutos a 121°C .

5.4.4 Solución salina peptonada

Composición

Peptona	1,0 g
Solución fisiológica	1,0 litro

Preparación. Disolver la peptona en 1 litro de solución fisiológica. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea $7,0 \pm 0,1$. Distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121°C .

5.4.5 Agua peptona sal al 5%

Composición:

Peptona	0,1 g
Cloruro de sodio	5,0 g
Agua destilada	100,0 cm^3

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada. Distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121°C .

(Continúa)

5.4.6 Agua peptona sal al 15%*Composición:*

Peptona	0,1 g
Cloruro de sodio	15,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver los componentes en el agua destilada. Distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.4.7 Solución de sacarosa al 20%*Composición:*

Sacarosa	20,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver la sacarosa en el agua destilada. Distribuir según convenga y esterilizar 20 minutos a 108°C.

5.4.8 Solución de citrato sódico al 2%*Composición:*

Citrato sódico (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O)	2,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el citrato en el agua destilada calentando entre 45°C y 50°C. Ajustar el pH a 7,5 ± 0,1 y esterilizar por filtración. Asépticamente, distribuir volúmenes adecuados en tubos o frascos estériles.

5.4.9 Solución de fosfato dipotásico al 2%*Composición:*

Fosfato dipotásico	2,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el fosfato en el agua destilada. Ajustar el pH, distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121°C. Para la dilución primaria de la caseína ácida, caseína láctica y del suero ácido en polvo, el pH debe ser 8,4 ± 0,1; para los caseinatos, quesos, quesos procesados y crema ácida, debe ser de 7,5 ± 0,1.

5.4.10 Solución Ringer diluida al ¼*Composición:*

Cloruro de sodio	2,25 g
Cloruro de potasio	105,0 mg
Cloruro de calcio anhidro	0,06 g
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	0,05 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver los componentes en el agua. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea 6,9 ± 0,1. Distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.4.11 Diluyente para hisopos de alginato*Composición:*

Hexametáfosfato sódico o calgón [(NaPO ₃) ₆]	1,0 g
Solución Ringer diluida al ¼	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el hexametáfosfato sódico o calgón en la solución Ringer al ¼. Ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea 7,0 ± 0,1. Distribuir según convenga y esterilizar 20 minutos a 121°C. En el comercio existe este reactivo en tabletas, reconstituir según las instrucciones del fabricante.

5.4.12 Solución de gelatinasa al 5%*Composición:*

Gelatinasa	5,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Suspender la gelatinasa en el agua destilada, centrifugar 10 minutos a 9 500 rpm y esterilizar por filtración utilizando membranas 0,45 mm.

5.4.13 Solución de ácido clorhídrico 1N*Composición:*

Acido clorhídrico (d = 1,19 g/cm ³)	89,0 cm ³
Agua destilada, cantidad necesaria para	1,0 litro

Preparación. Llevar a 1 litro con agua destilada.

5.4.14 Solución de hidróxido de sodio 1N*Composición*

Hidróxido de sodio	40,0 g
Agua destilada	1,0 litro

Preparación. Disolver en el agua destilada.

5.4.15 Reactivos para la prueba de Voges Proskauer (VP)**5.4.15.1** Solución alcohólica de α-naftol al 6%*Composición:*

α-naftol	6,0 g
Etanol al 96% v/v	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el α-naftol en el etanol

5.4.15.2 Solución de hidróxido de potasio al 40%*Composición*

Hidróxido de potasio	40,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el hidróxido de potasio en el agua destilada.

(Continúa)

5.4.15.3 Solución de creatina al 0,5%*Composición:*

Creatina monohidratada	0,5 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver la creatina en el agua.

5.4.16 Reactivo de Kovacs*Composición.*

p-Dimetilaminobenzaldehído	5,0 g
Acido clorhídrico (d = 1,19 g/cm ³)	25,0 cm ³
Alcohol isoamílico	75,0 cm ³

Preparación. Disolver el aldehído en el alcohol amílico, añadir el ácido clorhídrico gota a gota y dejar reposar 12 horas (color dorado).

5.4.17 Reactivo para β-galactosidasa**5.4.17.1** Solución tampón*Composición:*

Fosfato monosódico (NaH ₂ PO ₄)	6,9 g
Hidróxido de sodio solución 0,1N	3,0 cm ³
Agua destilada, cantidad necesaria para completar	50,0 cm ³

Preparación. Disolver el fosfato monosódico en aproximadamente 30 cm³ de agua. Ajustar el pH a 7,0 ± 0,1 con aproximadamente 3 cm³ de solución de hidróxido de sodio. Añadir agua hasta completar 50 cm³. Almacenar en refrigeración.

5.4.17.2 Solución de ONPG*Composición:*

o-Nitrofenil β-D-galactopiranosida (ONPG)	80,0 mg
Agua destilada	15,0 cm ³

Preparación. Disolver el ONPG en el agua calentando hasta 50°C. Enfriar la solución.

5.4.17.3 Reactivo completo*Composición:*

Solución tampón	5,0 cm ³
Solución ONPG	15,0 cm ³

Preparación. A la solución de ONPG añadir la solución tampón. El reactivo completo almacenar a 4°C por no más de un mes. En el comercio existen discos impregnados con ONPG, utilizarlos según las indicaciones del fabricante.

5.4.18 Solución de rojo de metilo*Composición:*

Rojo de metilo	0,04 g
Etanol al 95% v/v	60,0 cm ³
Agua destilada, cantidad necesaria para completar	100,0 cm ³

(Continúa)

Preparación. Disolver el rojo de metilo en el etanol y llevar a 100 cm³ con agua. Ajustar el pH a 6,4 ± 0,1. El color de la solución es anaranjado.

5.4.19 Solución de cloruro férrico al 10%

Composición:

Cloruro férrico	10,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. disolver el cloruro férrico en el agua.

5.4.20 *Texgitol aniónico 7.* Tergitol-7 (marca comercial registrada) es un agente humectante aniónico. Este reactivo es un sulfato de sodio derivado del 3,9 dietil - tridecanol -6

5.4.21 *Tritón X-100.* Tritón X-100 es la marca comercial registrada del etanol octilfenoxi-polietoxi que es una preparación no iónica. Es un agente humectante, detergente, dispersante, limpiador casero e industrial (fabricación de textiles, desengrasado de lanas), agente emulsificante de insecticidas y hervicidas.

5.4.22 Mezcla desinfectante

Composición:

Etanol al 96% v/v	60,0 cm ³
Acido clorhídrico (d = 1,19 g/cm ³)	10,0 cm ³
Agua destilada	30,0 cm ³

Preparación. Mezclar los componentes.

5.4.23 *Alcohol yodado.* Utilizado para desinfectar los envases metálicos de los productos enlatados destinados al análisis microbiológico.

Composición:

Yoduro de potasio	10,0 g
Yodo metálico	10,0 g
Etanol al 70% v/v	500,0 cm ³

Preparación: En un mortero triturar el yoduro de potasio juntamente con el yodo, añadir un mínimo de alcohol, continuar triturando y añadiendo el alcohol hasta su completa disolución. Con el alcohol ajustar el volumen a 500 cm³ y guardar en la oscuridad, en un frasco ámbar bien cerrado.

5.4.24 *Solución de hipoclorito de sodio.* Es conveniente utilizarlo para desinfectar los envases metálicos de los productos enlatados destinados al análisis microbiológico.

Composición:

Hipoclorito de sodio	5,25 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el hipoclorito de sodio en el agua.

5.4.25 *Vaspar.* Fundir y mezclar entre sí cantidades iguales de vaselina sólida y parafina. Distribuir en frascos de boca ancha con tapa de rosca y esterilizar 15 minutos a 121°C.

(Continúa)

5.4.26 Solución de ácido tartárico al 10%*Composición:*

Acido tartárico	10,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Diluir el ácido tartárico y esterilizar por filtración.

5.4.27 *Compuesto obturante.* Fundir y mezclar entre sí una parte de parafina, una de cera de abejas y dos de gelatina blanca de petrolatum. Distribuir en frascos de boca ancha con tapa de rosca y esterilizar 15 minutos a 121°C.

5.5 Colorantes**5.5.1** Solución de verde brillante al 1%*Composición:*

Verde brillante	1,0 g
Agua destilada estéril	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el verde brillante en agua destilada estéril y diluir hasta 100 cm³. Debido a que algunos lotes de verde brillante son inusualmente tóxicos, antes de utilizar, se debe controlar la toxicidad de todos los baches utilizando microorganismos conocidos, para pruebas positivas y negativas. Utilizar solo los que dan resultados satisfactorios.

5.5.2 Solución de púrpura de bromocresol al 0,2%*Composición:*

Púrpura de bromocresol	0,2 g
Agua destilada estéril	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el púrpura de bromocresol en agua destilada estéril y completar el volumen a 100 cm³.

5.5.3 Solución de cristal violeta al 1%*Composición:*

Cristal violeta o violeta de genciana	1,0 g
Agua destilada estéril	100,0 cm ³

Preparación. Disolver la violeta de genciana en el agua destilada estéril y completar el volumen a 100 cm³.

6. COLORACIONES**6.1 Coloración de Gram****6.1.1** Reactivos**6.1.1.1** Cristal violeta fenicada (según Nicolle)*Composición:*

Cristal violeta o violeta de genciana	1,0 g
Etanol al 95% v/v	10,0 cm ³
Fenol fundido	2,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

(Continúa)

Preparación. En un mortero, disolver el colorante en alcohol. Mezclando siempre juntar poco a poco el ácido fénico fundido, para obtener una mezcla bien homogénea. Añadir el agua, poco a poco, lavando el mortero. Dejar 24 horas en reposo y filtrar. Para la coloración de Gram se usa no diluida.

6.1.1.2 Fucsina fenicada (según Ziehl)

Composición:

Fucsina básica	1,0 g
Etanol al 95% v/v	10,0 cm ³
Fenol fundido	5,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Seguir las instrucciones indicadas en 6.1.1.1 para la preparación de la violeta fenicada. Diluir 10 veces para la coloración de Gram.

6.1.1.3 Lugol

Composición:

Yodo	5,0 g
Yoduro de potasio	10,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. En un mortero, triturar el yoduro de potasio juntamente con el yodo y añadir un mínimo de agua destilada, continuar triturando y añadiendo el agua destilada poco a poco hasta su completa disolución. Ajustar el volumen a 100 cm³ y guardar en la oscuridad en un frasco ámbar bien cerrado. Diluir 15 veces para la coloración de Gram.

6.1.1.4 Alcohol acetona

Composición:

Etanol al 95% v/v	250,0 cm ³
Acetona p.a	250,0 cm ³

Preparación. Mezclar y guardar en un frasco.

6.1.2 Procedimiento. Utilizar cultivos con no más de 24 h de incubación.

6.1.2.1 Preparar un frotis fino en una lámina limpia y desengrasada.

6.1.2.2 Secar el frotis a temperatura ambiente o en estufa y fijar pasando rápidamente la lámina, tres o cuatro veces, sobre la llama de un mechero de Bunsen.

6.1.2.3 Desengrasar los frotis de los alimentos grasos sumergiendo las láminas en xilol de uno o dos minutos, escurrir, lavar con alcohol metílico, escurrir y secar.

6.1.2.4 Cubrir el frotis con la solución de violeta de genciana fenicada durante un minuto.

6.1.2.5 Escurrir el colorante y cubrir durante un minuto con lugol diluido 15 veces (ver 6.1.1.3).

6.1.2.6 Lavar con agua corriente.

6.1.2.7 Diferenciar con alcohol acetona hasta que los enjuagues sean claros.

6.1.2.8 Lavar con agua corriente.

6.1.2.9 Cubrir el frotis con fucsina fenicada diluida (10 veces), durante 30 segundos.

(Continúa)

6.1.2.10 Lavar con agua, escurrir, secar la lámina con papel filtro o en estufa y examinar. Las bacterias Gram positivas se tiñen de morado; las Gram negativas, de rosado.

6.1.2.11 Utilizar un microscopio equipado con objetiva de inmersión en aceite (95 - 100X) y una ocular 10X, ajustar la luz para obtener una buena iluminación de la lámina.

6.2 Coloración de esporos (Wirtz-Conklin)

6.2.1 Reactivos

6.2.1.1 Verde malaquita al 5%

Composición:

Verde malaquita	5,0 g
Agua destilada	100,0 cm ³

Preparación. Disolver el verde malaquita en el agua destilada, filtrar y guardar en un frasco.

6.2.1.2 Fucsina fenicada (según Ziehl). Utilizar la misma de la coloración de Gram (ver 6.1.1.2).

6.2.2 Procedimiento

6.2.2.1 Preparar el frotis según lo indicado en 6.1.2.1 a 6.1.2.3.

6.2.2.2 Cubrir la lámina con verde malaquita al 5% y calentar hasta la emisión de vapores, añadir más colorante y volver a calentar. Repetir la operación durante 10 minutos.

6.2.2.3 Lavar con agua corriente

6.2.2.4 Cubrir el frotis con fucsina fenicada diluida 10 veces, durante 0,5 a 1 minuto.

6.2.2.5 Lavar con agua corriente y secar.

6.2.2.6 Observar al microscopio con lente de inmersión.

Los esporos se tiñen de verde y los cuerpos bacterianos y detritos, de rojo.

(Continúa)

APÉNDICE Z

Z.1 DOCUMENTOS NORMATIVOS A CONSULTAR

Esta norma no requiere de otras para su aplicación

Z.2 BASES DE ESTUDIO

Norma internacional ISO 6579:93(E) *Microbiology - General Guidance on Methods for the detection of Salmonella (Third edition)*. International Organization for Standardization. Geneve 1993.

Norma internacional ISO 8261 *Milk and milk products - Preparation of test samples and dilutions for microbiological examination (First edition)*. International Organization for Standardization. Geneve, 1989.

Norma internacional ISO 3100-2:88 *Meat and meat products Sampling and preparation of test samples - Part 2: Preparation of test samples for microbiological examination (First edition)*. International Organization for Standardization. Geneve, 1988.

Norma internacional BS 5763: Part 0:1986 ISO 7218- 1985 *Microbiological examination of food and animal feeding stuffs. Part 0. General laboratory practices*. British Standards Institution. London, 1985.

Norma internacional BS 4285: Section 1.2:1984 *Microbiological examination for dairy purposes. Part 1. Guide to general procedures. Section 1.2 Diluents, media and apparatus and their preparation and sterilization*. British Standards Institution. London, 1984.

Merck. *Manual de medios de cultivo*. Alemania, 1994.

APHA. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Third edition. Splittstoesser Don F., Vanderzant Carl. Washington - DC, 1992.

Mossel, D.A.A. Moreno García, B. *Microbiología de los alimentos, 1ra. Edición Española*. Acribia. Zaragoza - España.

ICMSF. *"Microorganismos de los Alimentos 1. Técnicas del análisis microbiológico"*. Acribia. Zaragoza - España.

Instituto Ecuatoriano de Normalización, INEN - Baquerizo Moreno E8-29 y Av. 6 de Diciembre
Casilla 17-01-3999 - Telfs: (593 2)2 501885 al 2 501891 - Fax: (593 2) 2 567815

Dirección General: E-Mail: furresta@inen.gov.ec

Área Técnica de Normalización: E-Mail: normalizacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Certificación: E-Mail: certificacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Verificación: E-Mail: verificacion@inen.gov.ec

Área Técnica de Servicios Tecnológicos: E-Mail: inencati@inen.gov.ec

Regional Guayas: E-Mail: inenquayas@inen.gov.ec

Regional Azuay: E-Mail: inencuenca@inen.gov.ec

Regional Chimborazo: E-Mail: inenriobamba@inen.gov.ec

[URL:www.inen.gov.ec](http://www.inen.gov.ec)

