

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Actualización de pruebas de laboratorio microbiológicas para el control
de calidad en alimentos**

**Monografía previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

MÓNICA DEL CARMEN GAMBOA TERÁN

Quito, 2015

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Monografía de Licenciatura en Ciencias Biológicas, de la Sra. Mónica del Carmen Gamboa Terán ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Iliana Alcocer

Directora de la monografía

Quito, 27 de febrero del 2015

TABLA DE CONTENIDO

Contenido

1.	
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. DESARROLLO TEÓRICO	7
4.1 MICROORGANISMOS MARCADORES.....	8
4.1.1 Microorganismos Índices	8
4.1.2 Microorganismo Indicadores	8
4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO.....	10
4.3 TÉCNICAS DE SIEMBRA CONVENCIONALES.....	11
4.3.1 Siembra en SUPERFICIE	11
Este método se basa en distribuir la muestra o inóculo sobre una superficie de medio de cultivo preparada con anterioridad. Permitirá obtener luego de la incubación de la muestra a la temperatura adecuada, una serie de colonias visibles y contables que arrojará un recuento de microorganismos determinados en la muestra analizada.	11
4.3.2 Siembra por profundidad.....	12
4.3.3 Siembra generando ambientes anaerobios	13
4.3.4 Siembra en placas petrifilm	15
4.4 MEDIOS DE CULTIVO.....	16
4.4.1 Tipos de medios de cultivo y sustancias.....	17
4.4.2 Preparación de medios de cultivo (INEN 1529.1.1999).....	20
4.4.3 Control de esterilidad de los medios de cultivo (INEN 1 529-1 1999-02-4- 1998-026)	22
4.4.4 Preparación de medios de cultivo, REACTIVOS Y COLORANTES para el control de microorganismos marcadores en alimentos (INEN 1529.1.1999).....	24
4.5 TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO (INEN 1529-2.1999)	25
4.5.1 Definiciones generales	25
4.6 Toma de muestras (INEN 1529-2.1999)	35
4.6.1 Número de muestras de población que se deben tomar	38
4.6.2 Técnicas para la toma de muestras	38
4.6.3 Procedimiento para la toma de muestras	40
4.6.4 Envío de las muestras al laboratorio (INEN 1529-2.1999)	46
4.6.5 Recepción y almacenamiento de las muestras en el laboratorio (INEN 1529-2.1999).....	48
4.6.5 Recepción y almacenamiento de las muestras en el laboratorio (INEN 1529-2.1999)	50
4.6.6 Preparación de la unidad de muestra para el análisis (INEN 1529-2.1999)	52
4.6.7 Preparación de la suspensión inicial o dilución primaria y otras diluciones (INEN 1529-2.1999)	59
4.7 MESÓFILOS AEROBIOS.....	65
4.8 Enterobacteriaceae.	73
4.9 Coliformes totales y fecales	84

4.10	Mohos y Levaduras	99
4.11	MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	
	MARCADORES.....	113
4.11.1	PLACAS PETRIFILM	114
4.11.2	PRUEBAS BIOQUÍMICAS RÁPIDAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS MICROORGANISMOS MARCADORES	115
5.	CONCLUSIONES	119
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
7.	FIGURAS	124
8.	TABLAS.....	133
9.	ANEXOS	135

1. RESUMEN

Toda empresa alimenticia frente a la necesidad de entregar productos de calidad, cuenta con laboratorios de control que permiten valorar las características físicas, organolépticas, composición y carga microbiana de sus productos finales. De esta manera, cada país cuenta con una normativa para establecer los protocolos de todas las pruebas de laboratorio, que de forma certera permitan poner en el mercado alimentos no solo con las características organolépticas esperadas sino también certificar que estos productos sean seguros para el consumo humano. El objetivo de un análisis microbiológico en la industria de alimentos, es valorar la carga microbiana de cada producto, mediante un proceso analítico que resulte eficiente. La eficiencia en este caso se ve determinada por la obtención de resultados confiables, seguros, rápidos y sin dejar a un lado el costo y disponibilidad de las pruebas. Este trabajo ha realizado una revisión de los métodos de laboratorio utilizados en la industria alimenticia para el control de calidad microbiológico. Debido a que cada alimento cuenta con una distribución desigual de los microorganismos, las pruebas microbiológicas y los parámetros de los resultados dependerán del alimento que se esté analizando. Sin embargo de esto, existen pruebas básicas en el control de alimentos. Estas pruebas analizan microorganismos marcadores, que permiten determinar la calidad microbiológica de los alimentos procesados. La investigación realizada se concentra básicamente en la Normativa, en el caso de nuestro país, INEN para los recuentos de los microorganismos mencionados. Los resultados de este análisis han determinado que las técnicas convencionales establecidas por la normativa INEN se mantienen vigentes. En la actualidad existen además de los

procedimientos convencionales, varias pruebas rápidas utilizadas en el control de alimentos. Sin embargo de ello, a pesar de que las pruebas arrojan resultados de manera rápida y eficiente, tiene poca difusión y uso. Actualmente y en su mayoría, los laboratorios de control de calidad de las empresas alimenticias utilizan los métodos tradicionales de recuentos totales, mohos y levaduras, coliformes y *E.coli*. Las pruebas microbiológicas rápidas (como Petrifilm), son utilizadas para situaciones emergentes que determinen la necesidad de resultados emergentes. Esta realidad no necesariamente se la debe relacionar con el costo de la prueba; muchas veces los técnicos de laboratorio se mantienen con protocolos convencionales debido a que simplemente funcionan bien.

Palabras claves: Alimento, análisis, microbiología, calidad y eficiencia

2. ABSTRACT

All food company against the need to deliver quality products, has control laboratories that allow assessing the physical, organoleptic, composition and microbial load of their end products. Thus, each country has regulations to establish protocols for all laboratory tests that allow accurate so take the food market not only expected organoleptic characteristics but also certify that these products are safe for human consumption. The purpose of microbiological analysis in industrial food is to evaluate the microbial load of each product, through an analytical process that is efficient. The efficiency in this case is determined by obtaining reliable, safe, fast results without leaving aside the cost and availability of evidence. This work has conducted a review of the laboratory methods used in the food industry for microbiological quality control. Because each food has an uneven distribution of microorganisms, microbiological tests and parameters of the results depend on the food that is being analyzed. However this, there are basic tests on food control. These tests analyze microorganisms markers, for determining the microbiological quality of processed foods. The research conducted is basically concentrated in the Regulations, in the case of our country, INEN counts for the above microorganisms. The results of this analysis have determined that conventional techniques established by the rules INEN they still exist. At present there are in addition to the conventional methods, several rapid tests used in food control. But this, even though the tests give results fast and efficiently, has little dissemination and use. Currently and mostly laboratory quality control of food, companies use traditional methods of total counts, molds and yeasts, coliforms and *E.coli*. Rapid microbiological testing (as Petrifilm) is used in

emergency situations to determine the need for emerging results. This reality is not necessarily the be related to the cost of the test; often laboratory technicians are kept to standard protocols because they simply work well.

Keywords: Food, analysis, microbiology, quality, efficiency

3. INTRODUCCIÓN

Todo alimento naturalmente presenta microorganismos. Un alimento procesado, adicionalmente incorpora microorganismos durante su manipulación y procesado. El análisis microbiológico no mejora la calidad del alimento, sino que permite valorar la carga microbiana, señalando los posibles puntos de riesgo de contaminación o multiplicación microbiana.

Adicionalmente, los análisis realizados en el producto final permite determinar si todas las medidas de buena práctica de manufactura utilizadas en el proceso de fabricación, lograron obtener un producto que cumpla con la normativa de calidad de cada país y finalmente, que este producto pueda salir a la venta listo y de una manera segura para el consumo humano.

Basados en este principio la industria alimenticia se enfrenta al reto de trabajar con procesos de producción cada vez más actualizados y modernos que permitan aplicar estrictas normas de control de calidad y a la par, contar con análisis de control que arrojen resultados rápidos y confiables. Esto finalmente logrará que una empresa de alimentos mejore su productividad y rentabilidad.

Debido a esta necesidad en la industria alimenticia se han desarrollado varias técnicas microbiológicas aplicadas en los alimentos, que permiten determinar la calidad microbiana del producto analizado. Estas técnicas son tan variadas como alimentos procesados existan y están dirigidas principalmente a la

detección de microorganismos marcadores de la presencia de patógenos o microorganismos que cambien las características del producto.

Las técnicas convencionales para los análisis de alimentos como la siembra por vertido, por profundidad, determinación de número más probable, etc. Requieren de la preparación previa del material, medios de cultivo y muestra, pasar por la siembra y finalmente la obtención de resultados luego de las horas específicas de incubación para cada tipo de análisis.

El objetivo del presente estudio es realizar una revisión bibliográfica de las pruebas de laboratorio que actualmente se usan para el control microbiológico en alimentos; La investigación se ha basado en la normativa INEN vigente en nuestro país considerando adicionalmente que estas técnicas y sus protocolos están fundamentadas y hacen referencia a técnicas de uso global.

4. DESARROLLO TEÓRICO

La presencia de microorganismos en un alimento, no necesariamente implica un riesgo de salud para el consumidor debido a que como se había mencionado, muchos alimentos de manera natural pueden presentar una carga microbiológica “natural” que no tiene efectos negativos en la salud del consumidor.

Sin embargo, cuando se trata de un alimento procesado, confluyen varios factores dentro de la cadena de producción, que definitivamente pueden variar la carga microbiana del producto final. Por esta razón las pruebas de control microbiológico de los alimentos implican el análisis de todos sus componentes, es decir, desde la materia prima, materiales y equipos de la línea de fábrica, mano de obra, hasta llegar al producto final. Estos análisis permitirán seleccionar la materia prima utilizada, monitorear los procesos de fabricación, determinar los puntos de la línea de fábrica que pueden ser potencialmente peligrosos y finalmente liberar al mercado productos seguros para el consumo humano.

Todo esto en base a análisis de microorganismos marcadores que nos permitan determinar la calidad de los procesos y de los productos.

4.1 MICROORGANISMOS MARCADORES

En la industria alimenticia, sería poco práctico hacer análisis de todos los microorganismos patógenos posibles. La realidad de obtener resultados rápidos y confiables ha determinado que se utilicen microorganismos marcadores en la industrial de los alimentos. Estos microorganismos, de acuerdo a sus recuentos, podrían determinar la presencia de microorganismos causantes de intoxicaciones alimentarias.

Los microorganismos indicadores pueden ser de dos tipos: índices e indicadores.

4.1.1 MICROORGANISMOS ÍNDICES

La presencia en un análisis de estos microorganismos se podría relacionar con la presencia de otros microorganismos patógenos, ecológicamente relacionados. Por ejemplo la presencia de *E. coli* podría suponer también la presencia de *Salmonella* en determinados alimentos.

4.1.2 MICROORGANISMO INDICADORES

Estos microorganismos, en rangos mayores a los permitidos en cada alimento, evidenciarían problemas en el procesamiento de un alimento en general. Por ejemplo la presencia de *E. coli*, en rangos superiores a los permitidos en leche, y en análisis realizados consecutivamente en varios lotes,

podrían determinar problemas en la eficacia del proceso de pasteurización o, una contaminación posterior al tratamiento térmico o problemas al mantener la cadena de frío, posterior al procesamiento de la leche.

Una evaluación de microorganismos marcadores, como *E. coli*, en varias etapas de la cadena de producción o del producto final a liberar, que reproduzca, en varios lotes, recuentos dentro de los rangos permitidos en cada alimento, asegura la calidad microbiológica del alimento.

Por lo tanto, los microorganismos marcadores resultan de gran importancia en la valoración de la calidad microbiológica de un alimento. Un microorganismo puede ser índice o indicador o, funcionar como índice e indicador simultáneamente.

A pesar de que actualmente podemos detectar todo tipo de microorganismos patógenos, el uso de análisis de microorganismos marcadores sigue estando vigente probablemente debido al costo y la eficacia de las pruebas. Las principales pruebas de microorganismos marcadores son

- Aerobios mesófilos.
- Mohos y levaduras.
- Coliformes totales.
- *E. coli*.

4.2 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico en los alimentos corresponde básicamente a una serie de técnicas, con resultados tan variados como productos alimenticios existen, que permiten obtener un recuento del microorganismo analizado y, que buscan cumplir con los siguientes objetivos generales:

- Determinar la buena calidad de la materia prima utilizada
- Detectar o determinar prácticas no sanitarias
- Ubicar los puntos de riesgo o peligro de contaminación durante la línea de fábrica
- Determinar el tiempo de vida útil de un producto en el mercado
- Determinar si el producto final cumple con la normativa de cada país o estado

De esta necesidad surge el contar con protocolos de laboratorio que permitan estandarizar los procesos de análisis. Cada país cuenta con una normativa para los procesos de análisis en alimentos, muy similares entre sí, debido a que en general se trata de técnicas de laboratorio globalizadas.

La normativa INEN vigente en nuestro país por ejemplo, estandariza la metodología desde la preparación de los materiales de laboratorio, pasa por los procedimientos para cada prueba y finalmente estandariza los recuentos o valores de los recuentos permitidos para cada producto alimenticio y para cada microorganismo marcador.

4.3 TÉCNICAS DE SIEMBRA CONVENCIONALES

Los recuentos de bacterias viables se basan en el crecimiento de Unidades formadoras de colonias (ufc) en condiciones específicas como por ejemplo, la composición del medio y temperatura de incubación para cada análisis.

El recuento de las ufc se basa en la capacidad de células viables de dividirse y crecer formando colonias (de forma visible), sobre o en un medio de cultivo sólido. De esta manera existen varias técnicas de siembra utilizadas en la industria alimenticia:

4.3.1 SIEMBRA EN SUPERFICIE

Este método se basa en distribuir la muestra o inóculo sobre una superficie de medio de cultivo preparada con anterioridad. Permitirá obtener luego de la incubación de la muestra a la temperatura adecuada, una serie de colonias visibles y contables que arrojará un recuento de microorganismos determinados en la muestra analizada.

El procedimiento básicamente es el siguiente:

En una placa Petri bien rotulada e identificada verter aproximadamente 20 cm³ de agar diluido (el medio de cultivo dependerá de la prueba que se esté realizando).

Una vez que el agar colocado se encuentre solidificado estará listo para usarse en la siembra de la muestra. En este tipo de análisis el volumen de muestra diluida y bien homogenizada en agua de dilución (agua peptonada al 0.1%), no debe ser mayor a 0,1 ml.

Se coloca la muestra sobre el agar sólido, y con la ayuda de una asa estéril se distribuye la muestra sobre toda la superficie de la caja Petri. De esta manera la muestra queda sembrada. Las cajas Petri sembradas se invierten e incuban a la temperatura y tiempo adecuados, de acuerdo al análisis que se realice (ICMSF, 2000).

4.3.2 SIEMBRA POR PROFUNDIDAD

Este método se basa en colocar la muestra o inóculo sobre una caja Petri vacía y posteriormente se coloca el medio de cultivo. Ocasionalmente a este método de siembra se lo llamó “método de placa pobre”. Permitirá obtener luego de la incubación de la muestra a la temperatura adecuada, una serie de colonias visibles y contables que arrojará un recuento de microorganismos determinados en la muestra analizada.

El procedimiento básicamente es el siguiente:

En esta técnica se utiliza un volumen no mayor a 1 ml de muestra diluida y bien homogenizada en agua de dilución (agua peptonada al 0,1%).

En una placa Petri rotulada e identificada se depositará la muestra diluida, inmediatamente verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar (el medio de cultivo dependerá de la prueba que se esté realizando). El agar deberá encontrarse a una temperatura promedio de acuerdo al análisis, de alrededor de 45 °C. La adición del medio no debe pasar más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución de la muestra.

Cuidadosamente mezclar el inóculo de con el medio de cultivo realizando movimientos de vaivén (5 veces en sentido de las agujas del reloj y luego cinco veces en el sentido contrario).

Dejar que se solidifique el agar y una vez que el agar ha solidificado, invertir las cajas e incubar a la temperatura y tiempo adecuados, de acuerdo al análisis que se realice (ICMSF, 2000; Norma INEN 1529-13).

4.3.3 SIEMBRA GENERANDO AMBIENTES ANAEROBIOS

Este método se basa en distribuir la muestra o inóculo sobre una superficie de medio de cultivo preparada con anterioridad y, una vez que se encuentra

sembrada la muestra, colocar una nueva capa de agar líquido. Este método permitirá generar un ambiente anaeróbico y obtener luego de la incubación de la muestra a la temperatura adecuada, una serie de colonias visibles y contables que arrojará un recuento de microorganismos determinados en la muestra analizada.

El procedimiento básicamente es el siguiente:

En una placa Petri rotulada e identificada verter aproximadamente 20 cm^3 de agar diluido (el medio de cultivo dependerá de la prueba que se esté realizando).

Una vez que el agar colocado se encuentre solidificado estará listo para usarse en la siembra de la muestra.

En este tipo de análisis el volumen de muestra diluida y bien homogenizada en agua de dilución (agua peptonada al 0,1%), no debe ser mayor a 0,1 ml.

Se coloca la muestra sobre el agar sólido, y con la ayuda de una asa estéril se distribuye la muestra sobre toda la superficie de la caja Petri. De esta manera la muestra queda sembrada.

Inmediatamente verter en cada una de las placas sembradas aproximadamente 10 cm^3 de agar (el medio de cultivo dependerá de la prueba que se esté realizando). El agar deberá encontrarse a una temperatura promedio

de acuerdo al análisis, de alrededor de 45 °C. Esto generará un medio anaeróbico y permitirá el crecimiento de organismos anaerobios.

Dejar que se solidifique el agar y una vez que el agar ha solidificado, invertir las cajas e incubar a la temperatura y tiempo adecuados, de acuerdo al análisis que se realice.

4.3.4 SIEMBRA EN PLACAS PETRIFILM

Este método requiere el uso de placas que contienen un medio de cultivo selectivo listo para usar. Es un método rápido de pruebas microbiológicas de alimentos que aportan múltiples beneficios como ahorro en tiempo, trabajo, espacio de almacenamiento y gastos generales de operación.

El procedimiento básicamente es el siguiente:

Colocar la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior. Con una pipeta colocada de forma perpendicular a la placa Petrifilm, colocar 5 ml. de la muestra en el centro del film inferior.

Bajar el film superior con cuidado evitando introducir burbujas de aire. No dejarlo caer. Colocar el aplicador en el film superior sobre el inóculo. Distribuir la muestra ejerciendo una ligera presión sobre el mango del aplicador. No girar ni deslizar el aplicador. Levantar el aplicador y esperar de 2 a 5 minutos a que solidifique el gel.

Una vez que el gel ha solidificado incubar las placas sin invertir (se puede colocar en pilas de hasta 10 placas, a la temperatura y tiempo adecuados, de acuerdo al análisis que se realice. (Fuente 3M)

4.4 MEDIOS DE CULTIVO

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos marcadores en la industria alimenticia es obtener el crecimiento de estos microorganismos en sustancias y condiciones creadas y controladas en laboratorio. De esta manera un medio de cultivo es el conjunto de sustancias necesarias para el crecimiento de un microorganismo determinado, en las condiciones adecuadas, condiciones que pueden ser controladas y manejadas dentro de un laboratorio.

En la actualidad existen medios de cultivos y técnicas tan variadas, permitiendo así, en el caso de la microbiología aplicada en el control de alimentos, obtener resultados confiables y rápidos.

Un medio de cultivo adecuado para el control microbiológico en alimentos, debe tener como mínimo, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento, específicas o selectivas del microorganismo analizado.

La forma más usada de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añada a muchos medios de cultivo sustancias que aporten y cubran estas necesidades. Igualmente pueden ser necesarios ciertos carbohidratos y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio y sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica. Algunos medios de cultivo contienen colorantes que actúan como indicadores de ciertas actividades metabólicas o que inhiben de forma selectiva ciertos microorganismos.

De esta manera podemos diferenciar los siguientes medios y sustancias (INEN 1529.1.1999)

4.4.1 TIPOS DE MEDIOS DE CULTIVO Y SUSTANCIAS

Agar: Medio de cultivo sólido con un contenido de agar-agar mayor del 1%

Caldo: Es un medio de cultivo líquido, exento de agar.

Medio base: Medio de cultivo que para ser utilizado, es necesario completar su formulación.

Medio completo: Medio de cultivo que tiene todos sus componentes y está listo para el uso sin que haya necesidad de completar su formulación.

Medio diferencial: Es un medio de cultivo sólido que contiene sustancias indicadoras, y en el cual, ciertas especies bacterianas forman colonias típicas.

Medio de enriquecimiento no selectivo: Es un medio de cultivo exento de sustancias selectivas e indicadoras.

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.

Medios para identificación bioquímica: Son medios de cultivo que contienen sustancias que evidencian la utilización metabólica de un substrato específico por el microorganismo.

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.

Medio semisólido: Medio de cultivo con un contenido de agar-agar menor del 1%.

Agar-agar: Sustancia seca extraída de varias especies de algas que forma un gel.

Agua estéril: Es el agua destilada o desmineralizada y esterilizada a 121 °C por 20 minutos

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

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.

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

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.

Sustancia selectiva: Sustancia química o biológica que inhibe o reduce la multiplicación de un microorganismo o grupo de microorganismos (INEN 1529.1.1999).

4.4.2 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO (INEN 1529.1.1999)

Para que la preparación de los medios de cultivo sea lo más uniforme posible 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.

Para la preparación de los medios de cultivo y reactivos deben utilizarse sustancias químicas de calidad p.a.

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

Para la preparación de los medios de cultivo es recomendable el uso de recipientes de acero inoxidable o de vidrios resistentes al calor, limpios y secos. La cantidad de medio por prepararse o esterilizarse no debe exceder el 1/3 de la capacidad del recipiente.

Utilizar balanzas con una graduación mínima de 0,01 g. Añadir los componentes en las cantidades indicadas por el fabricante, y los se incorpora en pequeñas cantidades, se debe 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.

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

Las sustancias termo sensibles preparar a parte, esterilizar por filtración, tindalización, baño de agua hirviente 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.

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

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.

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%.

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.

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

Los medios que necesitan ser esterilizados en autoclave, hacerlo inmediatamente. Solo hervir los medios que no necesitan autoclavado. 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 (INEN 1529.1.1999).

4.4.3 CONTROL DE ESTERILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO (INEN 1 529-1 1999-02-4- 1998-026)

Medios líquidos. Tomar al azar tres tubos o frascos e incubarlos 72 horas 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 termodúricos deben incubarse a 55 °C por 72 horas. 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.

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

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.

Las placas preparadas de esta manera deben secarse inmediatamente antes de su inoculación. El secado puede realizarse de las siguientes formas:

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

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

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

Los medios de cultivos 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 cualquier cambio en su composición.

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 (INEN 1 529-1 1999-02-4- 1998-026).

4.4.4 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y COLORANTES PARA EL CONTROL DE MICROORGANISMOS MARCADORES EN ALIMENTOS (INEN 1529.1.1999)

La norma en referencia, a más de las instrucciones generales para preparar los medios de cultivo y reactivos, describe 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. Fórmulas de varios medios de cultivos reactivos y colorantes se incluyen en el Anexo 1.

4.5 TOMA, ENVÍO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO (INEN 1529-2.1999)

Los procedimientos establecidos en esta norma para la preparación de la muestra se refieren al tratamiento inicial al que se deben someter las muestras de alimento destinadas al análisis microbiológico, según se indica en la serie de NTE "INEN 1529 Control Microbiológico de los Alimentos", excepto en las NTE INEN 1529-1 y 1529-12.

4.5.1 DEFINICIONES GENERALES

Para los efectos de esta norma se adoptan las definiciones contempladas en cada una de las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) de Requisitos sobre alimentos y las que a continuación se detallan:

Lote: Es la cantidad de alimento producida y manipulada bajo condiciones que se suponen uniformes. En la práctica, esto generalmente significa un alimento producido en un batch, o cuando el proceso es continuo dentro de un período de tiempo definido y en un lugar determinado, por ejemplo, en una línea de producción determinada, en una autoclave u otra unidad crítica de tratamiento. Los diferentes lotes son identificados mediante códigos.

Partida: Es la cantidad de alimento, grande o pequeña, enviada a un determinado destinatario. Normalmente consiste en numerosas cajas de alimento procedente de uno o más lotes.

Toma de muestras: Es el acto de seleccionar y coger una determinada cantidad, o un número de recipientes o unidades de producción de un mismo lote de alimento, o de áreas de superficie que son o que entran en contacto con productos alimenticios.

Unidad de muestreo: Es la parte definible más pequeña de un lote (unidad de producción). Esto puede significar una lata, o un paquete. Cuando la producción es a granel y se envasa en cajas, bidones, barriles, sacos, etc., entonces la unidad de muestreo es arbitraria y puede depender del utensilio para tomar muestras. No se debe confundir esta unidad de muestreo con la unidad de muestra realmente utilizada en el análisis.

Unidad de muestra: Es la cantidad de material (tomada de la muestra de población) que realmente se utiliza en el análisis, es la unidad analítica. En general, para los ensayos microbiológicos se utiliza una unidad de muestra de 10 ó 25 gramos (g) ó cm^3 o sus múltiplos.

Muestra: Parte del conjunto (población) a partir de la cual se trata de estimar, mediante análisis o examen, las propiedades del conjunto. Se debe tener en cuenta que sólo puede someterse a análisis una parte (unidad de muestra) de la muestra de población

Muestra de población: Número total (una o más) de unidades de muestreo individuales tomadas de la población (idealmente, obtenidas de una forma aleatoria) que se destinan al análisis de acuerdo con un programa de muestreo determinado

La muestra de población y la unidad de muestra pueden ser lo mismo pero, de preferencia, la muestra de población debe ser considerablemente más grande que la unidad de muestra que habrá de analizarse y cada muestra de población proporciona sólo un resultado por cada análisis realizado. Por tanto, si se analiza más de una unidad de muestra de la misma muestra de población, los resultados se promedian.

Muestra selectiva (sesgada): Es la muestra de alimento, tomada para demostrar o documentar las condiciones insatisfactorias observadas por el inspector, o bien, para contar con una unidad del alimento que se sospecha insatisfactorio y someterlo al análisis microbiológico.

Muestra aleatoria: Conjunto de unidades de muestreo elegidas de la población de modo que cada unidad tenga la misma probabilidad de ser seleccionada, con lo que se excluye las subjetividades del que toma las muestras. Normalmente implica la utilización de la tabla de los números aleatorios.

Muestra representativa: Es aquella cuyas características son tan similares como posible a las de la población de la cual proceden.

Programa de muestreo: Es la relación de los criterios de aceptación que se aplicarán a un lote basado en el análisis, por métodos específicos, del número necesario de unidades de muestra.

Programa de atributos: Es el programa de muestreo en que cada unidad de muestra seleccionada se clasifica de acuerdo a las características de calidad del producto y en el que solo hay dos o tres grados de calidad. Por ejemplo: aceptable, rechazable; presente, ausente; aceptable, provisionalmente aceptable, rechazable; recuento bajo, recuento medio, recuento alto

En las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) de requisitos se utilizan programas de muestreo por atributos, de dos y tres clases. Un programa de muestreo de dos clases requiere de las siguientes especificaciones: "n", "c" y "m" y los de tres clases: "n", "c", "m" y "M", que se detallan a continuación.

Categoría: Serie de factores relacionados con la naturaleza y tratamiento de un alimento, enmarcados en 15 series (1 a 15 categorías), que determina por anticipado el peligro de la presencia de determinadas especies o grupos bacterianos en un alimento.

"n". Número de unidades de muestra de un lote que se deben analizar, para satisfacer las exigencias de un determinado programa de muestreo.

"**c**". Número máximo aceptable de unidades de muestra que pueden presentar una tasa microbiana comprendida entre "m" y "M". Cuando se encuentra un número superior a "c", se rechaza el lote.

"**m**". Valor (criterio) microbiológico aceptable de bacterias por gramo o cm^3 . Los valores superiores a "m" se aceptan provisionalmente o se rechazan.

"**M**". Valor (criterio) microbiológico utilizado solo en programas de tres clases, para separar la calidad rechazable de la provisionalmente aceptable. En cualquier unidad de muestra, los valores iguales a, o superiores a "M" no son aceptables.

Aceptación-rechazo: La decisión de aceptar o rechazar un lote, en base a un programa de muestreo asociado a un análisis microbiológico determinado, se aplica solo al propósito para el que se realizó dicho análisis (o varios de ellos).

Suspensión inicial (dilución primaria): Es la suspensión, solución o emulsión obtenida después que la cantidad del producto en análisis (o de la porción de muestra preparada para el ensayo) ha sido pesada o medida y luego mezclada, utilizando un homogeneizador cuando es necesario y observando las precauciones apropiadas, con un volumen de diluyente igual a nueve veces la unidad de muestra, para que los microorganismos presentes en la unidad de muestra se distribuyan lo más uniformemente posible y se permita que las partículas grandes, si las hay, se sedimenten.

En algunos casos puede necesitarse, especialmente para productos que dan una suspensión inicial 1+9 demasiado viscosa o demasiado espesa, añadir más diluyente. En algunos otros casos, cuando se necesita relacionar los resultados de los análisis con determinados criterios de especificación, puede ser necesaria una dilución primaria más concentrada que 1+9. Se deben tomar en cuenta estos factores para las operaciones subsiguientes y/o en la expresión de resultados.

Otras diluciones decimales: Las suspensiones, soluciones o emulsiones obtenidas mezclando un volumen específico de la dilución primaria con nueve veces el volumen del diluyente y repitiendo esta operación con cada dilución así preparada, hasta obtener una serie de diluciones decimales adecuadas para la inoculación del medio de cultivo (INEN 1529-2.1999)

4.5.2 EQUIPO, MATERIALES Y DILUYENTES (INEN 1529-2.1999)

El equipo y material utilizados en la toma de muestras deben ser de acero inoxidable u otro material de resistencia adecuada, que no produzca cambios en la muestra que puedan afectar los resultados de los exámenes subsiguientes. El equipo debe ser lo suficientemente robusto para evitar deformaciones en el uso y lo suficientemente leve que permita al operador moverlo en el producto, fácil y rápidamente. Si los utensilios o aparatos son soldados, la suelda debe resistir temperaturas de 180 °C. Todas las superficies deben ser lisas y libres de hendeduras, todas las esquinas deben ser redondeadas.

El equipo para tomar muestras debe cumplir con los requisitos específicos adecuados a cada producto, de la siguiente manera:

Los frascos para muestras y sus cierres, deben ser de un material resistente a esterilizaciones repetidas, inerte, impermeable al agua y a las grasas (acero inoxidable, vidrio y algunos plásticos). También se puede utilizar envases desechables de plástico, hojas de aluminio o fundas plásticas con cierres apropiados. De preferencia deben ser opacos y de capacidad y forma adecuadas para tomar la unidad de muestra deseada. Los frascos para productos sólidos, semisólidos o viscosos deben ser de boca ancha.

Todo el material y utensilios utilizados en la toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico deben estar perfectamente limpios, secos, envueltos individualmente y esterilizados por uno de los siguientes métodos físicos:

- Esterilización por calor húmedo. A presión de 15 libras/ pulgada² (autoclave): 121 °C durante 20 minutos, mínimo.
- Esterilización por calor seco. Aire caliente 170-175 °C, en el punto más frío, durante 1 hora, mínimo. Utilizar un horno con una eficiente circulación de aire para que haya la seguridad de que en todas las partes del horno se mantiene la temperatura fijada.

Si por alguna razón, es imposible la esterilización por estos dos métodos, utilizar los siguientes métodos alternos, que son secundarios, y se los recomienda

siempre que el material sea utilizado inmediatamente después de esterilizado y enfriado:

- Vapor fluente: 100 °C por una hora.
- Agua hirviendo: ebullición en agua por 20 minutos, mínimo.
- Inmersión en etanol al 96% (v/v) y flameado hasta que el etanol se consuma. Para materiales que resisten la llama directa.
- Combustión: exponer a la llama de un mechero de Bunsen o de alcohol hasta la incandescencia y enfriar. Para objetos que resistan la incandescencia (INEN 1529-2.1999).

Para abrir envases: tijeras, cuchillos, abridores de latas y de botellas, martillos, alicates, destornilladores, herramienta especial para abrir cajas de cartón, bisturís, etc.

Para tomar muestras: sierras; sondas especiales que penetren en el producto y corten un trozo cilíndrico; taladros; cucharas; cucharones de draga; pinzas; tenedores; torundas; plantillas de metal, con un cuadrado de superficie conocida recortado en el centro; fundas plásticas con cierre apropiado; papel aluminio; compuesto obturante, para cerrar los orificios dejados en los quesos al tomar las muestras.

Para tomar muestras congeladas: taladro eléctrico de alta velocidad, hacha, cincel.

Para controlar la temperatura: termómetro manual de cuadrante, para controlar la temperatura ambiente y del producto.

Para transportar muestras: refrigeradora portátil capaz de enfriar hasta 0 °C a 5 °C en poco tiempo. Nevera isotérmica con cierre hermético y material aislante entre la pared interna y la externa, para transportar muestras congeladas o refrigeradas.

Para etiquetar: etiquetas y marcadores.

Equipo para esterilización: autoclave u horno portátiles o, mechero de alcohol, y un agente desinfectante (alcohol al 70%).

Equipo para mantener muestras: refrigeradora, para almacenar muestras a 2 °C y congelador para almacenar a temperaturas menores de -20 °C.

Equipo para descongelar muestras: baño de agua, controlado termostáticamente con agitador, que opere 37 ± 1 °C y otro, a 45 ± 1 °C.

Frascos para muestras: frascos de boca ancha con tapa de rosca, envases desechables de plástico. Para el transporte de muestras deben ser de un material que absorba los golpes.

Equipo para homogeneizar muestras: homogeneizadores, vórtex, trituradores, "stomacher", molinos.

Equipo para medir el pH: pH metro, con compensación de temperatura y sensibilidad de 0,1 de unidad de pH.

Equipo para pesar muestras: Balanza con exactitud clase II y graduación mínima de 0,1 g.

Materiales varios: Erlenmeyers, probetas, tubos, pipetas, jeringuillas (INEN 1529-2.1999).

Diluyentes (INEN 1529-2.1999)

Agua peptona al 0,1%: para uso general.

Agua peptona tamponada: para *Salmonella*.

Agua peptona sal al 15%: para extremadamente halófilos.

Agua peptona sal al 5%: para halófilos moderados y halotolerantes.

Caldo TSB: para revitalización (Enriquecimiento).

Caldo reforzado para *clostridios*: para anaerobios.

Solución de calgón [hexametáfosfato sódico, $(\text{NaPO}_3)_6$] al 1% en solución Ringer diluida al $\frac{1}{4}$: diluyente para hisopos de alginato.

Solución de citrato sódico al 2%, pH $7,5 \pm 0,1$: para quesos, leches fermentadas, leche en polvo "roller".

Solución de fosfato dipotásico al 2%: para caseína ácida, caseína láctica y suero ácido en polvo el diluyente debe tener un pH de $8,4 \pm 0,1$ y $7,5 \pm 0,1$ para crema ácida, quesos, caseínatos.

Solución de fosfato tripotásico ($\text{K}_3\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 8% para ajustar el pH de las muestras.

Solución Ringer al 1/4: para mantequillas

Solución de sacarosa al 20%: para osmófilos.

Solución salina peptonada: para uso general.

4.6 TOMA DE MUESTRAS (INEN 1529-2.1999)

Las Normas Técnicas Ecuatorianas (NTE) hacen referencia a varios pasos a seguir tratando de considerar todos los posibles casos o escenarios frente a los cuales se deba realizar toma de muestras; sin embargo de ello, las siguientes instrucciones no son necesariamente aplicables para tomar muestras de rutina.

La toma de muestras debe realizar un agente autorizado o un agente independiente autorizado que ha recibido formación técnica apropiada. El o la agente debe actuar independientemente y no aceptar la interferencia de terceros. Bajo su responsabilidad puede recibir ayuda de otros. Cuando sea posible, se debe permitir a los delegados de las partes interesadas presenciar la toma de muestras. El agente y su(s) ayudante debe tomar las medidas adecuadas para prevenir cualquier contaminación tanto del envío del o los lotes como de las unidades de muestreo (por ejemplo, lavarse y desinfectarse las manos antes de manipular el material a muestrearse, vestir un delantal u overol blanco y limpio, usar mascarilla y gorro, trabajar observando rigurosamente todas las medidas previstas en el programa de la planta para la higiene y desinfección de los empleados).

Se sellará y etiquetará cada muestra. Fijar el sello de manera que sea imposible remover el contenido o la etiqueta sin destruir el sello. Las etiquetas deben ser de tamaño y calidad adecuadas para el propósito (por ejemplo una cartulina de color claro, un cartón a prueba de grasa y de agua y con un ojete reforzado). Escribir la información con tinta indeleble indicando, por lo menos, la naturaleza del producto, el número y código del lote, la fecha de la toma de muestras, el nombre y la firma del agente que tomó las muestras. Cuando sea necesario, se puede incluir información adicional tal como el propósito de la toma de muestras, la masa o volumen de la muestra, la marca de identificación de la unidad (caja, bidón, etc.) de donde se tomó la muestra.

Se tomarán todas las muestras, cuando menos, por duplicado y se conservarán en condiciones idénticas a las que tenían en el momento de la toma. De ser necesario, y cuanto antes, se debe poner una serie a disposición de la otra parte. Previo convenio de las partes, se recomienda la toma de series adicionales de muestras, las cuales, en caso necesario, deben guardarse para un arbitraje independiente. Una vez tomadas las muestras, enviar las muestras al laboratorio para su análisis.

Las muestras se deben acompañar de un informe de la toma de muestras firmado por el agente responsable de la toma y refrendado por posibles testigos. En el informe debe constar la siguiente información:

- Lugar, fecha y hora en que se realizó la toma de muestras.

- Nombre y dirección del agente que realizó la toma de muestras y de los posibles testigos.
- Método exacto de la toma de muestras (aleatorio en todo el lote, aleatorio en las partes accesibles o por otro método).
- Procedimiento exacto utilizado para tomar las muestras, si éste difiere de las instrucciones dadas en esta norma.
- Motivo de la toma de muestras.
- Naturaleza del alimento.
- Número y código del lote, códigos de los baches y el número y tamaño de las unidades que constituyen el lote.
- Tamaño y número de las muestras de población debidamente identificadas en relación al lote, bache y/o unidad (caja, bidón, etc.) del cual proceden.
- Lugar a donde se enviarán las muestras.
- Ensayos solicitados.
- Nombre y dirección del laboratorio que analizará las muestras.
- Temperatura del producto al momento de la toma de muestras.
- Origen del envío y lugar de destino.
- Si es posible, el nombre y la dirección del fabricante, importador, vendedor o comprador, según proceda.

Cuando convenga, se debe mencionar en el informe, además, cualquier condición o circunstancia relevante de la toma de muestras (por ejemplo, el estado de los envases y sus alrededores, la temperatura y humedad atmosféricas, la edad del producto, método de esterilización del material para tomar muestras), si la muestra es una mezcla de submuestras y cualquier información especial

referente al producto muestreado, por ejemplo, la dificultad para homogeneizar el producto (INEN 1529-2.1999).

4.6.1 NÚMERO DE MUESTRAS DE POBLACIÓN QUE SE DEBEN TOMAR

Se debe tomar un número de muestras de población equivalente al número "n" de unidades de muestra indicado en el programa de muestreo especificado, ya sea, en las respectivas NTE de requisitos o en un contrato, o según lo acordado entre las partes interesadas o según un programa diseñado para enfrentar una situación emergente (brote de intoxicación, por ejemplo) (INEN 1529-2.1999).

4.6.2 TÉCNICAS PARA LA TOMA DE MUESTRAS

La norma NTE hace referencia a varias generalidades que se detallan a continuación:

- Tomar las muestras en condiciones asépticas, con rapidez pero cuidadosamente, y de tal manera, para que la muestra sea representativa del producto que se quiere analizar.
- Antes de abrir un envase limpiar la zona apropiada con agua tibia y jabón y pasar alcohol al 70% sin flamear, o si es un envase de papel, retirar la parte externa. Abrir el envase asépticamente con instrumentos estériles. Para cada envase utilizar un instrumento estéril.

- Cuando sea posible, mezclar bien el producto hasta que esté homogeneizado y, cuando no lo es, asépticamente, tomar alícuotas de diferentes sitios del recipiente hasta completar una cantidad no inferior a 100 g ó cm³.
- Si se han de realizar diferentes tipos de análisis (microbiológicos, químicos, físicos y sensoriales), asépticamente tomar primero y por separado las unidades de muestra destinadas al análisis microbiológico. Para conservar estas muestras no se debe utilizar preservantes.
- Registrar la temperatura del aire de la sala de almacenamiento o del vehículo, tomar la muestra, luego, insertar el termómetro en el alimento del que se tomó la muestra y registrar su temperatura. Cuando el alimento está envasado en pequeños envases cerrados, registrar la temperatura del alimento en un envase adyacente en la misma caja de cartón o embalaje.

El tamaño de la muestra de población debe ser de 100 cm³ o gramos, mínimo. En muchos casos será el de la unidad de producción del lote como latas herméticamente cerradas conteniendo muchas veces la cantidad de alimento equivalente a la unidad de muestra, o envases muy pequeños de los que se necesitará tomar varios de ellos hasta completar los 100 g (INEN 1529-2.1999).

4.6.3 PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Productos en envases pequeños.

Los alimentos, sean éstos líquidos, pastosos, sólidos o pulverulentos envasados en pequeños recipientes deben tomarse en su propio envase original, sin abrir.

Las mantecas, margarinas, mantequillas que se encuentren en unidades de 250 o más g, dividir las en cuatro partes y tomar como muestras las dos cuartas partes opuestas. Si la unidad pesa menos de 250 g, tomar toda la unidad.

De los quesos pequeños y de las porciones de queso envueltas y empacadas en envases pequeños tomar como muestra un queso completo y de las porciones, un número suficiente de ellas para que la muestra no sea inferior de 100 g (INEN 1529-2.1999).

Productos a granel (bidones, tambores, etc.).

Productos líquidos

Evitando contaminar el contenido, mezclar los productos líquidos cuidadosamente con un cucharón estéril o mecánicamente, hasta que el producto esté totalmente mezclado; inmediatamente después de la mezcla, con un cucharón estéril y asépticamente transferir a un envase estéril una cantidad no

inferior a 100 cm^3 . Si es difícil obtener una buena homogeneización, de sitios apropiados del recipiente tomar varias submuestras de manera a obtener una muestra no inferior a 100 cm^3 y que sea representativa del envase.

Inmediatamente cerrar y etiquetar el frasco.

Para tomar una muestra de un ducto de salida, primero dejar pasar las primeras fracciones del producto para limpiar la salida con el flujo y luego tomar la muestra, no menos de 100 cm^3 .

En el caso de cremas, dar un número suficiente de golpes con el cucharón para asegurar una buena mezcla, sumergir el cucharón moviendo de un lado para otro con mucho cuidado para evitar la formación de espuma y de mantequilla. Tomar no menos de 100 cm^3 de muestra.

En el caso de leche condensada y evaporada mezclar muy cuidadosamente utilizando un agitador adecuado para raspar el material adherido a las paredes y al fondo del recipiente. Del contenido mezclado, trasladar de 2 a 3 litros a un recipiente más pequeño y agitarlo.

Tomar no menos de 100 cm^3 de muestra (INEN 1529-2.1999).

Productos sólidos

En el caso de productos sólidos, cuando la capa superficial no hace parte de la muestra, retirarla del área de muestreo con una espátula, cuchillo o cuchara

estériles, hasta no menos 5 mm de profundidad y tomar la muestra con otro instrumento estéril.

Si el producto es un polvo, la capa superficial se retira antes de mezclar. Si el alimento está formado por capas o extractos, separadamente y evitando contaminar las partes tomar muestras de cada una en la misma proporción en que se encuentran en el producto original.

En el caso de mantecas, margarinas, mantequillas a granel y el producto está en bloque, y para que la muestra no sea inferior a 100 g, realizar dos sondeos o más introduciendo una sonda verticalmente en el centro del bloque. Si el producto se encuentra en barriles, insertar la sonda diagonalmente a través de la masa del producto desde el borde del barril sin que penetre en la superficie del fondo.

En los dos casos, hacer girar la sonda una vuelta completa y retirar el material por completo. Sostener la punta de la sonda encima de la abertura del frasco estéril, y con un cuchillo o espátula transferir inmediatamente la muestra de la sonda en pedazos de aproximadamente 75 mm. Dejar una porción de aproximadamente 25 mm o más de largo para obturar el agujero dejado por la sonda.

No permitir que estos productos entren en contacto con papel o superficies absorbentes (porcelana) del agua o grasa.

Los productos congelados hasta el punto de resistir la presión de la sonda deben ser ablandados manteniéndoles por 24 horas a 10 °C (INEN 1529-2.1999).

Productos a granel congelados

Para muestrear estos productos utilizar brocas, saca bocados y otros instrumentos cortantes estériles. Los productos congelados deben mantenerse en su estado congelado hasta su llegada al laboratorio. Se debe evitar descongelar y congelar nuevamente la muestra.

La toma de muestras de piezas o bloques de alimentos de gran tamaño se puede realizar de la siguiente manera: sobre el alimento asegurar, con la copa hacia arriba, un embudo plástico estéril con el vástago recortado por donde se introduce la broca estéril de un taladro. Las virutas del alimento son conducidas a la superficie y se acumulan en la copa del embudo. Transferir estas virutas a un frasco estéril para muestras. Inmediatamente identificar la muestra y acondicionarla para su envío al laboratorio (INEN 1529-2.1999).

Toma de muestras de superficies vivas

Utilizando un hisopo humedecido, frotar la superficie de la palma de una mano, la superficie interna de los dedos y de las uñas

También se puede realizar mediante la técnica del lavado: colocar la mano dentro de una funda plástica, verter 50 cm³ de diluyente y frotar con el líquido las palmas, entre los dedos y uñas (INEN 1529-2.1999).

Toma de muestras de superficies inertes

Botellas, envases, recipientes, utensilios pueden muestrearse mediante lavado, y si es posible, con hisopo. Prestar especial atención a la porción de los utensilios que se introduce en la boca, por ejemplo, borde superior interno y externo de copas y vasos, porción cóncava de cucharas, etc. De los platos, la parte que entra en contacto con los alimentos.

La toma de muestras de superficies lisas puede realizarse con hisopo o con cilindros de agar. El cilindro de agar es un medio de agar estéril solidificado dentro de un tubo plástico estéril. Asépticamente, cortar uno de los extremos del cilindro, presionar la superficie de agar descubierta contra la superficie en estudio, con un escalpelo estéril cortar una rodaja y colocarla en una placa Petri, con la superficie sembrada hacia arriba. Identificar la muestra.

Las superficies lisas también se pueden muestrear utilizando un portaobjeto (INEN 1529-2.1999).

- Toma de muestras destinadas al análisis de bacterias anaerobias.

Evitar que las muestras que contienen bacterias anaerobias entren en contacto con el aire, por ejemplo, de los tejidos profundos no tomar muestras pequeñas. Si esto no es posible y si se utilizan hisopos, humedecer el hisopo en el medio de transporte de Stuart (medio reducido) y una vez tomada la muestra, colocar el hisopo en un tubo que contenga este medio (INEN 1529-2.1999).

Quesos grandes. En el caso de quesos grandes tomar de las diferentes partes suficientes submuestras, hasta completar una muestra de por lo menos 100 g. De los quesos maduros, retirar la envoltura externa y dejar intacta la interna (costra, cera, películas plásticas o de tela en los quesos sin corteza). Dependiendo de la forma, la masa, el tipo y el grado de madurez del queso, utilizar una de las siguientes técnicas:

Toma de muestras por medio de cortes. Si el queso tiene una base circular, con un cuchillo con hoja puntiaguda, hacer dos cortes radiales a partir del centro del queso, y si tiene un base rectangular, hacer dos cortes paralelos con los lados. El tamaño de la pieza obtenida debe ser de tal manera, que una vez eliminada la capa superior incomible, la porción comestible restante no sea inferior a 100 g.

Toma de muestras por medio de una sonda. En una de las superficies planas, por lo menos a 10 cm del borde, insertar oblicuamente hacia el centro una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro, una o varias veces. Insertar la sonda perpendicularmente por una de las superficies del queso hasta llegar, pasando por el centro, al lado opuesto.

Por la superficie vertical del queso, a igual distancia entre las dos superficies planas, insertar la sonda horizontalmente hasta el centro del queso. De los quesos contenidos en barriles, cajas u otros recipientes de dimensiones grandes, o de los quesos que forman cubos grandes compactos, la muestra puede tomarse insertando la sonda oblicuamente, desde arriba hacia abajo, por el contenido del recipiente. En el caso de quesos duros de grandes dimensiones, si el queso tiene envoltura interna, frotar con etanol al 70% (V/V) el sitio de muestreo e insertar una sonda estéril de 15 a 20 mm de diámetro. Girar la sonda una vuelta completa y retirar el pedazo.

Si no se necesita una muestra de la superficie, guardar la parte exterior (mínimo 2 cm) que contiene la envoltura interna para obturar el agujero(s) hecho en el queso y el resto del pedazo(s) con un escalpelo o un cuchillo estériles transferir asépticamente al frasco de muestra. Repetir este procedimiento hasta obtener una muestra no menor de 100 g. Con los tapones, obturar los agujeros con cuidado, y si es posible, cubrir con un compuesto sellante adecuado (INEN 1529-2.1999).

4.6.4 ENVÍO DE LAS MUESTRAS AL LABORATORIO (INEN 1529-2.1999)

Enviar las muestras al laboratorio lo más rápido posible y en condiciones que reduzcan al mínimo la posibilidad de cambio de su calidad microbiológica y evitar que durante el transporte las muestras sean expuestas a la luz solar directa.

Manipular y empaquetar las muestras de modo que una manipulación posterior no pueda cambiar su identidad ni sugerir ninguna duda acerca de su identidad.

Siempre que sea posible, se deben enviar las muestras al laboratorio en su envase original, sin abrir. Todas las muestras envasadas, para su envío deben empacarse con materiales que puedan absorber los golpes para evitar que sufran daños durante el transporte.

Los productos de vida comercial prolongada, no necesitan de precauciones especiales excepto, por ejemplo: evitar temperaturas por encima de 45 °C para los productos enlatados (latas en su estado normal) y ambientes húmedos para los productos en polvo.

Las latas hinchadas se deben refrigerar y enviarlas acondicionadas con mucho papel y material amortiguador y material refrigerante.

Los productos perecederos no congelados se enfrían hasta 0 a 5 °C, sea en un refrigerador o más rápidamente en un baño de hielo (en fundas plásticas) y se los envía en recipientes isotérmicos, cubiertos con una bandeja que contenga suficientes fundas plásticas con hielo picado o una mezcla de polialcoholes congelados, para mantener la temperatura de 0 a 5 °C hasta su llegada al laboratorio. No utilizar hielo suelto ya que si el envase se revienta o tiene fugas puede contaminar el producto. Si se utiliza hielo seco, acondicionar la muestra de manera que no entre en contacto con el hielo para evitar su congelamiento.

Productos congelados, las muestras de estos productos se deben recoger en recipientes preenfriados y colocarlos inmediatamente en un congelador, o en hielo seco. Enviar al laboratorio en un recipiente isotérmico, o en caja de cartón, con nieve carbónica (dióxido de carbono sólido). Evitar que las muestras congeladas, tomadas en fundas plásticas, entren en contacto directo con el hielo seco porque el plástico se torna friable y puede romperse. Utilizar papel u otro material adecuado para proteger la muestra. Como control que la muestra no se ha descongelado durante el transporte, colocar dentro del paquete un recipiente con trocitos de hielo que deben estar intactos a la llegada del paquete con las muestras.

Indicar claramente sobre el paquete si la muestra es perecible o no, la temperatura a que debe mantenerse, refrigerada en hielo seco, si es frágil, etc.

Enviar las muestras juntamente con el informe de la toma (INEN 1529-2.1999).

4.6.5 RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO (INEN 1529-2.1999)

Chequeo de las condiciones de las muestras. Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

Etiquetado e informe: Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras

Estado de los envases: Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

Control de la temperatura: Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento. Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5 °C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

Apego al programa de muestreo: Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado (INEN 1529-2.1999).

Almacenamiento de las muestras: Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

Productos congelados, a -20 °C, máximo hasta siete días.

Productos perecederos no congelados, entre 0 °C y 5 °C, por no más de 24 horas.

Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0 °C y 4 °C, hasta 12 horas (INEN 1529-2.1999).

4.6.5 RECEPCIÓN Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN EL LABORATORIO (INEN 1529-2.1999)

Chequeo de las condiciones de las muestras. Al recibir las muestras se debe observar los siguientes aspectos:

Etiquetado e informe: Chequear si cada muestra está debidamente sellada, etiquetada y acompañada de una copia del respectivo informe de la toma de muestras

Estado de los envases: Chequear cuidadosamente si el envase tiene defectos, tales como: fisuras, perforaciones, fugas, deformaciones; fracturas y tapas flojas en los de plástico; perforaciones en fundas plásticas.

Control de la temperatura: Anotar la temperatura de las muestras perecederas no congeladas. Las muestras congeladas deben llegar al laboratorio

en su estado congelado, controlar si no ha habido descongelamiento. Las muestras frescas perecederas deben tener una temperatura entre 0 a 5 °C. Anotar cualquier discrepancia en la hoja de registro.

Apego al programa de muestreo: Verificar que el número de las muestras de población está conforme con el programa de muestreo utilizado (INEN 1529-2.1999).

Almacenamiento de las muestras: Las muestras deben almacenarse protegidas de cualquier contaminación, de la luz solar directa o de otras fuentes de calor y a las temperaturas que se indican:

Productos congelados, a -20 °C, máximo hasta siete días.

Productos perecederos no congelados, entre 0 °C y 5 °C, por no más de 24 horas.

Productos estables: enlatados, productos deshidratados, etc., a temperatura ambiente en lugares secos y frescos, hasta siete días.

Productos misceláneos: enjuagues, hisopos, aguas de efluentes, entre 0 °C y 4 °C, hasta 12 horas (INEN 1529-2.1999).

4.6.6 PREPARACIÓN DE LA UNIDAD DE MUESTRA PARA EL ANÁLISIS (INEN 1529-2.1999)

La preparación de una sub-muestra en laboratorio busca que ésta sea tan representativa como sea posible de la población de la cual procede.

La norma NTE hace referencia a varias generalidades que se detallan a continuación:

Si es posible, realizar los ensayos de las muestras luego después de la recepción en el laboratorio. Las muestras deben manipularse asépticamente y de preferencia sin interrupciones, si éstas son inevitables, deben ser lo más cortas posible y el producto se debe mantener en refrigeración durante este período.

Antes de manipular la muestra limpiar el área de trabajo y sus proximidades, e inmediatamente desinfectar el área con etanol al 70% o con cualquier otro desinfectante.

En muchos casos la unidad de muestreo, sin preparación adicional alguna, puede utilizarse como unidad de muestra. Si se necesita mezclar dos o más unidades de muestreo para formar la unidad de muestra, transferir las unidades de muestreo a un recipiente estéril suficientemente grande y mezclar bien.

Antes de abrir cualquier envase, sean éstos rígidos o semi rígidos, limpiar externamente el envase con jabón o detergente y agua, secarlos con papel toalla y, en las proximidades de la tapa o en el área donde se va a abrir el envase

flamear (con o sin etanol al 70% v/v evitando sobrecalentamientos) o aplicar una mezcla desinfectante que se le deja secar sin aplicar calor; sin embargo, cuando el envase o el material del embalaje es muy delgado y no resiste el proceso de limpieza omitir este paso y desinfectar con mucho cuidado.

Cuando el envase puede removerse sin riesgo alguno de contaminar el producto, entonces, la limpieza y desinfección del envase no son necesarias. Todas las manipulaciones, durante y después de la abertura deben realizarse en condiciones tan asépticas como posible y de preferencia sin interrupciones; utilizar una cámara de flujo laminar vertical, si es posible. Durante cualquier interrupción se debe mantener el producto bajo refrigeración. El intervalo entre la agitación de la muestra y la remoción de la unidad analítica no debe ser mayor de tres minutos, y se debe tener cuidado para eliminar, incluso, cualquier espuma de la unidad analítica.

Abrir los envases de lata por la tapa no codificada, cuidando de no dañar el doble cierre.

Al tomar muestras de latas abombadas deben observarse las siguientes precauciones a fin de disminuir la salida violenta del contenido:

- Abrir las latas abombadas en sitios especiales y NUNCA deben abrirse en áreas destinadas a pruebas de esterilidad.
- Antes de abrir, refrigerar la lata lavada y seca.

- Colocar la lata en una bandeja poco profunda que contenga una mezcla desinfectante. Si se sospecha la presencia de *Clostridium botulinum*, la bandeja debe contener una solución saturada de carbonato de sodio.
- Desinfectar la lata frotando una mezcla desinfectante y dejando secarse, pero, NUNCA aplicando calor.
- Para tapar la lata, utilizar un embudo de vidrio que tenga el vástago largo y firmemente taponado con algodón hidrófilo, a través del cual pasa un varilla de acero con su extremidad inferior afilada (todo el aparato debe estar envuelto, y esterilizado). Cubrir la lata con el embudo y sobre la tapa de ésta hacer descansar el extremo afilado de la varilla, y luego, cuidadosamente, golpear la varilla.
- Abrir la lata después que la presión ha descendido, y según proceda, continuar con uno de los procedimientos indicados a continuación:

Líquidos

Si el espacio de cabeza es lo suficientemente grande, se debe mezclar el producto agitando el envase 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm. Se puede utilizar un homogeneizador estandarizado para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos.

Si el espacio de cabeza es pequeño, mezclar el producto invirtiendo el envase 25 veces y luego:

a) retirar una porción de líquido hasta que haya suficiente espacio de cabeza y entonces mezclar mediante agitación; o

b) transferir la muestra completa, o un parte de ella, a un envase estéril de tamaño adecuado y agitando mezclar bien. En el caso de muestras líquidas con gas, incorporar unas perlas de vidrio estériles y agitar.

Polvos

Seguir los procedimientos indicados anteriormente, utilizando una espátula estéril.

Productos congelados

Si las muestras están congeladas, utilizar una de los siguientes procedimientos:

Descongelarlas parcialmente en su recipiente original cerrado (o en el que llegó al laboratorio), por no más de 24 horas en un refrigerador entre 2 °C y 5 °C. Cuando se necesitan más de 24 horas para descongelar las muestras, se pueden colocar en un baño de agua a una temperatura menor de 37 °C y se les mantiene solo hasta que se fundan (máximo hasta 15 minutos, la temperatura debe

permanecer baja para evitar lesionar a los microorganismos) o, a temperatura ambiente por no más de 1 hora.

Si la muestra congelada puede picarse fácilmente, el descongelamiento no es necesario.

Con productos fácilmente descongelables (productos obtenidos con taladro, por ejemplo: jugos congelados, huevos congelados, etc.), se les descongela en un baño de agua o a temperatura ambiente.

Mantequilla, margarinas, mantecas y mayonesa

Colocar la muestra de mantequilla en el refrigerador ($4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$), hasta que se torne dura y se pueda cortar. Con utensilios estériles, dividir la muestra de mantequilla, margarina o manteca en tres partes y del centro de cada una de estas superficies (no contaminadas) que quedan expuestas, pesar la unidad analítica en un frasco y añadir el diluyente a $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, en un volumen necesario para completar, juntamente con la fase acuosa, dos veces la unidad analítica, por ejemplo: las mantequillas y margarinas que tengan una humedad de 16%, pesar 25 g de muestra y añadir 46 cm^3 de diluyente; si se pesan 50 g, añadir 92 cm^3 .

En el caso de las mantecas añadir un volumen igual a dos veces la muestra: 25 g de muestra y 50 cm^3 diluyente.

Colocar el frasco en un baño de agua a no más de 45 °C y, evitando un calentamiento excesivo, agitar hasta que la muestra y el diluyente se mezclen completamente.

Conservar el frasco en el baño de agua hasta que la materia grasa se separe de la fase líquida. Utilizar esta fase líquida para las determinaciones microbiológicas: 2 cm³ de este líquido corresponden a 1 g de muestra y 0,2 cm³ a 0,1 g.

Carnes y otros productos

Cuando por su naturaleza, el producto en análisis puede causar dificultades si se homogeneiza directamente, entonces, antes de manipular asépticamente proceder de la siguiente manera:

- **Picado:** Colocar el material en una superficie estéril, cortar en cubos de 1 cm³ y continuar con la trituración.
- **Trituración:** Colocar el material picado en un frasco estéril, adicionar el exudado que hubiere, mezclar, homogeneizar. Con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

Canales de aves y productos misceláneos

Anotar el peso de la muestra, colocar el canal en una funda plástica estéril y lavar con 300 cm³ de agua peptonada al 0,1% friccionando la superficie de la muestra durante 30 segundos. Aplicar este procedimiento a frutas secas, cereales, legumbres y ensaladas, lavando con una cantidad de diluyente 10 veces el peso de la muestra.

Hisopos o torundas

Al tubo que contiene el hisopo juntamente con el diluyente, agitarlo vigorosamente, haciendo 50 ciclos completos de 15 cm en 10 segundos golpeando contra la palma de la otra mano, para desprender los microorganismos de la superficie del hisopo. La dispersión obtenida se puede diluir decimalmente.

Productos formados por capas

Si el alimento está formado por capas o extractos, examinar una porción de 10 g del paquete completo o, separadamente, preparar una suspensión inicial de cada una de estas partes, dependiendo del propósito del ensayo (INEN 1529-2.1999).

4.6.7 PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN INICIAL O DILUCIÓN PRIMARIA Y OTRAS DILUCIONES (INEN 1529-2.1999)

La norma NTE hace referencia a varias generalidades que se detallan a continuación:

El tamaño de la unidad muestra generalmente es 10 g ó 10 cm³ o un múltiplo de 10 y, debe ser tal, que permita realizar todos los ensayos requeridos.

Para la detección de *Salmonella*, en general, preparar la suspensión inicial con una unidad de muestra de 25 g (cm³) y 225 cm³ del diluyente indicado en la NTE INEN 1529-15 (Método de detección de *Salmonella*) Si la unidad de muestra prescrita difiere de 25 g, utilizar la cantidad necesaria de diluyente para obtener una dilución de aproximadamente 1/10 (masa/volumen).

Con el objeto de reducir la sobrecarga de trabajo en el laboratorio, y cuando hay evidencias de que la mixtura de dos o más unidades de muestra no afecta el resultado para aquel alimento particular, existe la alternativa de preparar unidades de muestra compuestas. El tamaño máximo de una unidad de muestra compuesta es de 375 g (15 unidades de muestra de 25 g).

Por ejemplo, si es necesario analizar 10 unidades de muestra de 25 g, se mezclan las 10 unidades para formar una unidad de muestra compuesta de 250 g y se adicionan 2,25 litros del diluyente, (NTE INEN 1529-15). Alternativamente, se puede preparar una muestra compuesta transfiriendo alícuotas de 0,1 cm³ de

cada uno de los 10 cultivos de pre-enriquecimiento a un frasco que contenga 100 cm³ de caldo RV, o alícuotas de 10 cm³ a un frasco que contenga 1 litro de caldo selenito cistina o caldo tetracionato.

Mezclar la unidad de muestra o porción de ensayo con un volumen de diluyente igual a nueve veces el peso de la unidad analítica. Si se obtiene una suspensión inicial demasiado viscosa o espesa adicionar más diluyente. Esto se debe tener en cuenta para las operaciones subsiguientes y/o expresión de resultados.

Para evitar lesionar a los microorganismos por cambios súbitos de la temperatura, la temperatura de los diluyentes debe ser aproximadamente la misma de la muestra, a menos que haya otra indicación.

La preparación de la suspensión inicial de algunos tipos de productos necesita de cuidados especiales, tales como:

- Calentar a temperaturas inferiores de 45 °C por no más de 15 minutos en el caso de productos como el cacao en polvo, gelatina, productos en polvo, mantecas, mantequillas. Para los quesos utilizar el diluyente a 44 °C ± 1 °C.
- Neutralizar los alimentos ácidos con una solución estéril de fosfato tripotásico al 8%, antes de preparar la suspensión inicial.

- Reconstituir los productos deshidratados y revitalizar a los microorganismos lesionados por los procesos de elaboración y almacenamiento de los productos alimenticios.

Para productos grasosos o pulverulentos que forman grumos adicionar al diluyente un agente humectante.

Cuando se va a realizar recuento de esporas, a la suspensión inicial inmediatamente después de preparada, someterla a un tratamiento térmico (por ejemplo, 80 °C por 10 minutos) seguido de un enfriamiento rápido en un baño de agua helada (Ver Anexo 2) (INEN 1529-2.1999; Peñaloza y Gamboa, 1998).

- **Suspensión inicial o dilución primaria (1:10)**

Líquidos: Productos líquidos no viscosos (agua, leche, jugos, enjuagues, etc.) en los cuales los microorganismos se distribuyen homogéneamente o que fácilmente se los puede homogeneizar por medios mecánicos; fase líquida de mezclas heterogéneas que se considera que es lo suficientemente representativa de la muestra en conjunto (fase líquida de las grasa vegetales o animales) y productos líquidos viscosos.

Líquidos no viscosos, con una pipeta estéril transferir 10 cm³ a un frasco y añadir 90 cm³ de diluyente. Mezclar cuidadosamente esta solución agitando el frasco 25 veces en 10 segundos haciendo un arco de 300 mm, o aspirando 10 veces con una pipeta estéril, o utilizando un homogeneizador tipo "vortex" por 5 a

10 segundos. Seleccionar la velocidad de tal manera para que el líquido, en torbellino, suba hasta 2 ó 3 cm del borde del vaso.

Si se requieren otras diluciones, continuar según lo indicado posteriormente en otras diluciones.

En el caso de mantequillas y mantecas, de la fase líquida tomar 2 cm³ y añadir 8 cm³ de diluyente, para obtener la dilución 1:10. Para otras diluciones, continuar según lo indicado posteriormente en otras diluciones.

Enjuagues, la solución de enjuague obtenida constituye la dilución primaria, siempre que, para el enjuague se utilice el volumen adecuado de diluyente. Para otras diluciones, continuar según lo indicado posteriormente en otras diluciones.

En el caso de los líquidos viscosos y helados fundidos pesar 10 g de muestra en 90 cm³ de diluyente y mezclar bien mediante agitación (para pesar, se puede utilizar una cuchara o una pipeta, dependiendo de la consistencia de la muestra). Para otras diluciones, continuar según lo indicado posteriormente en otras diluciones (INEN 1529-2.1999).

Sólidos: Es importante notar que con algunos productos no es aconsejable utilizar el "stomacher" (por ejemplo, los que tienen elementos puntiagudos o cortantes, o aquellos que no se disgregan fácilmente), pudiéndose utilizar siempre que haya evidencia (datos publicados o ensayos comparativos) que los resultados

obtenidos no difieren significativamente de los obtenidos con un homogeneizador rotatorio.

Pesar con una precisión de 0,1 g en un frasco (si se utiliza homogeneizador rotatorio), o en una funda plástica (si se utiliza "stomacher") 10 g (o un múltiplo de 10 g) de la muestra de población o de la sub-muestra preparada. Añadir 90 cm³ de diluyente (o múltiplo de 90) a la temperatura adecuada (dilución 10-1).

Hacer funcionar el homogeneizador a baja velocidad y en pocos segundos pasar a la velocidad entre 15 000 a 20 000 rpm. Cuidar escrupulosamente que el tiempo de homogeneización a alta velocidad no exceda los dos minutos. Para productos blandos o que forman mucha espuma es suficiente un minuto.

Hacer funcionar el "stomacher" 1 ó 2 minutos, según la naturaleza del producto. Prestar atención al hecho que para determinados productos, en especial cereales, los tiempos de 1 y 2 minutos no son adecuados para microorganismos tales como los mohos y levaduras. En este caso el "stomacher" permite una mejor recuperación que el homogeneizador rotatorio. Hacer funcionar el "stomacher" por 10 minutos evitando separaciones, ya que se pueden perder algunos mohos y levaduras del líquido sobrenadante.

Si es necesario, dejar en reposo hasta 15 minutos para que las partículas grandes se sedimenten. Para preparar otras diluciones utilizar la capa superficial y si hay una capa de grasa, tomar de la parte acuosa (INEN 1529-2.1999).

Otras diluciones

Para las pruebas de presencia o ausencia de microorganismos en 0,1 cm³ ó 0,1 g de producto, no se necesita preparar diluciones posteriores.

Si la dilución primaria se homogeneizó con pipeta, utilizar la misma pipeta para transferir 1 cm³ de la suspensión inicial (dilución 10⁻¹) a otro tubo que contenga 9 cm³ de diluyente estéril a la temperatura adecuada, evitar que la pipeta entre en contacto con el diluyente y con otra pipeta estéril mezclar cuidadosamente. De esta manera se obtiene la dilución 10⁻².

Si es necesario, repetir lo indicado anteriormente, para la dilución 10⁻³ y siguientes diluciones, hasta obtener el número necesario de diluciones y alcanzar el número adecuado de microorganismos por cm³. Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración (INEN 1529-2.1999). El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y la mezcla de las diluciones con el medio de cultivo no debe ser mayor a 45 minutos. El tiempo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el inicio de la preparación de las siguientes diluciones no debe exceder los 30 minutos (INEN 1529-2.1999).

Revitalización

Los microorganismos presentes en los alimentos pueden estar lesionados o debilitados debido a los tratamientos que se utilizan en el procesado de

alimentos. Entre los tratamientos que lesionan a los microorganismos tenemos el calor, frío, desecación, liofilización, congelación, baja actividad de agua e irradiación. Los tratamientos químicos adversos como carencia de nutrientes, pH bajo, preservantes y exposición a desinfectantes.

El número de microorganismos que son detectados en los diferentes medios depende de la severidad y duración de las condiciones adversas, tipo de microorganismos presentes y la composición del medio utilizado, especialmente si es selectivo.

Se utilizará procesos de revitalización únicamente cuando sea necesario. Los procedimientos de revitalización están incluidos en las secciones pertinentes de las NTE INEN 1529 (INEN 1529-2.1999).

4.7 MESÓFILOS AEROBIOS

Este grupo de microorganismos es el más grande de los microorganismos marcadores en el control de alimentos. Corresponde a un amplio grupo de bacterias que se desarrollan en presencia de oxígeno libre que crecen en un rango de temperatura de entre 15 – 45 °C, con una temperatura mínima de 15 – 20 °C, una máxima de 45 °C y una óptima de 35 °C. Casi todos los agentes patógenos humanos son mesófilos, lo que hace relación si consideramos que la temperatura corporal de los humanos se mantiene en condiciones normales en una constante de 37 °C (Madigan *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014).

En un análisis de mesófilos aerobios, se estima un recuento total de microorganismos sin especificar de qué tipo de microorganismo se trata.

El análisis de mesófilos aerobios es el recuento de microorganismos marcadores en la industria de alimentos, más ampliamente utilizado. Entre sus varios usos se encuentra el de guiar o determinar la vida útil de un producto o alimento procesado. Puede reflejar además, la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima.

Un recuento bajo de aerobios mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

Sin embargo, un recuento elevado de microorganismos mesófilos aerobios puede significar: - Excesiva contaminación de la materia prima - Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración - La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos y, consecuentemente la inmediata alteración del producto. Un recuento de microorganismos mesófilos aerobio puede significar o permite determinar:

- La calidad (carga microbiana) de la materia prima
- Determinar la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección de toda la línea de producción, incluyendo la mano de obra.
- Determinar las temperaturas adecuadas durante el proceso de fabricación de un alimento

- Detectar el origen o puntos de contaminación durante la línea de fabricación
- Evaluar las cadenas de manejo del alimento procesado luego de que el producto sale a la venta (mantenimiento adecuado de las cadenas de frío)
- La vida útil de un alimento procesado
- La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos y por lo tanto, la inmediata alteración del producto

El recuento de mesófilos nos indica las condiciones de salubridad de algunos alimentos (Nore y Poveda *et al.*, 2008; Madigan *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014).

Los métodos convencionales utilizados para el recuento de flora aerobia mesófila son:

- Recuento en placa o método en placa de microorganismos aerobios o, recuento en placa por siembra en todo el medio (Revisado por Hartman, 1961; Angelotti, 1964).
- Recuento en placa de siembra por extensión en superficie (Reed & Reed, 1948; Campell & Konowalchuck, 1948; Gaudy & col., 1963; D.S. Clark, 1967).
- Recuento en placa por siembre de gotas en superficie (Miles & Misra, 1938; Sharpe & Kilsby, 1971).

Existen además otros métodos para el recuento de mesófilos aerobios:

- Método del número más probable (NMP) de gérmenes como cálculo estadístico del número de células viables.
- Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora.
- Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables.

Sin embargo de ellos, el recuento en placa es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (U.F.C.) en un alimento.

Metodología convencional (INEN 1529-5:2006)

La norma en referencia establece el método para cuantificar la carga de microorganismos aerobios mesófilos en una muestra de alimento destinado al consumo humano o animal. Lógicamente el alcance de este método de ensayo solo permitirá cuantificar la presencia de grupos de microorganismos aerobios mesófilos.

Este método se basa en la certeza de que un microorganismo vital presente en una muestra de alimento, al ser inoculado en un medio nutritivo sólido se reproducirá formando una colonia individual visible. Para que el conteo de las colonias sea posible se hacen diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y se inocula el medio nutritivo de cultivo. Se incuba el inóculo a 30 °C por 72 horas y luego se cuenta el número de colonias formadas. El conteo sirve para calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por centímetro cúbico de alimento.

Se debe considerar que el valor numérico obtenido puede no reflejar el número real de microorganismos vitales (viables) en la muestra debido a las siguientes condiciones específicas:

Las células microbianas suelen agruparse formando cadenas, grumos, racimos o pares y no separarse a pesar de la homogeneización y dilución de la muestra, por tanto, una colonia puede provenir de una célula individual o de un agrupamiento bacteriano.

Las células microbianas que han sufrido graves lesiones son incapaces de multiplicarse

Las condiciones inadecuadas de aerobiosis, nutrición y temperatura; la presencia de inhibidores (INEN 1529-5:2006).

Materiales y medios de cultivo

Materiales

Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 cm³ y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.

Cajas Petri de 90 mm x 15 mm

Erlenmeyer y/o frasco de boca ancha de 100 cm³, 250 cm³, 500 cm³ y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

Tubos de 150 mm x 16 mm

Gradillas

Contador de colonias

Balanza de capacidad no superior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad.

Baño de agua regulado a 45 °C ± 1 °C.

Incubador regulable (25 °C – 60 °C)

Autoclave.

Refrigeradora para mantener las muestras y medios de cultivo

Congelador para mantener las muestras a temperatura de -15 °C a -20 °C

Medios de cultivo

Agar para recuento en placa (Plate Count Agar)

Agua peptonada al 0,1 % (diluyente) (INEN 1529-5:2006).

Preparación de la muestra

Dependiendo del tipo de alimento se preparará la muestra según lo establecido en anteriormente según la INEN 1529-2.1999

Procedimiento

Para cada dilución el ensayo se hará por duplicado.

En cada una de las cajas Petri bien identificadas se depositará 1 cm³ de cada dilución.

Para cada depósito se usará una pipeta distinta y esterilizada.

Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar para recuento en placa–PCA, fundido y templado a 45 °C ± 2 °C.

La adición del medio no debe pasar de más de 45 minutos a partir de la preparación de la primera dilución (INEN 1 529-5 2006-01 -3- 2005-051).

Cuidadosamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo imprimiendo a la placa movimientos de vaivén: 5 veces en el sentido de las agujas del reloj y 5 veces en el contrario.

Como prueba de esterilidad verter agar en una caja que contenga el diluyente sin inocular. No debe haber desarrollo de colonias.

Dejar reposar las placas para que se solidifique el agar. Invertir las cajas e incubarlas a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 a 75 horas. No apilar más de 6 placas. Las pilas de placas deben estar separadas entre sí, de las paredes y del techo de la incubadora.

Pasado el tiempo de incubación seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 300 colonias y utilizando un contador de colonias, contar todas las colonias que hayan crecido en el medio, incluso las pequeñas, pero, se debe tener cuidado para no confundirlas con partículas de alimentos o precipitados, para esto, utilizar lupas de mayor aumento.

Las colonias de crecimiento difuso deben considerarse como una sola colonia si el crecimiento de este tipo de colonias cubre menos de un cuarto de la placa; si cubre más la caja no será tomada en cuenta en el ensayo.

Anotar el número de colonias y la respectiva dilución. (INEN 1529-5:2006)

Cálculos

Caso general (placas que contienen entre 15 y 300 colonias)

Calcular el número N de microorganismo por gramo o cm^3 de producto como la media ponderada de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\sum c}{V(n_1 + 0,1 n_2)d}$$

En donde: Σc = Suma de todas las colonias contadas en todas las placas seleccionadas:

V = Volumen inoculado en cada caja Petri;

n1 = Número de placas de la primera dilución seleccionada:

n2 = Número de placas de la segunda dilución seleccionada:

d = Factor de dilución de la primera dilución seleccionada (d = 1 cuando se ha inoculado muestra líquida sin diluir).

Redondear los resultados obtenidos a dos cifras significativas. Cuando la tercera cifra comenzando por la izquierda es menor que 5, mantener inalterada la segunda cifra. Si la tercera cifra es mayor o igual a cinco, incrementar en una unidad la segunda cifra. Expresar como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por 10x, donde x es la correspondiente potencia de 10 (INEN 1529-5:2006).

4.8 ENTEROBACTERIACEAE.

La familia Enterobacteriaceae comprende un grupo extenso de bacterias gramnegativas no formadoras de esporas en el que se incluyen bacilos con necesidades nutricionales sencillas. Casi todas son anaerobias facultativas. Son microorganismos ubicuitarios, lo que significa que es inevitable que puedan entrar en la cadena alimentaría. Algunas especies son responsables de toxi- infecciones como *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* verotoxigénica, etc. Otras son psicrófilas y se multiplican en condiciones de refrigeración (Alonso y Poveda, 2008).

Las propiedades metabólicas de Enterobacteriaceae, son muy útiles para caracterizar sus géneros constituyentes. Los miembros de esta familia, a menudo denominados enterobacterias o bacterias entéricas, producen grandes cantidades de gas durante la fermentación del azúcar como las especies del género de *Escherichia*.

Esta familia puede dividirse en dos grupos de acuerdo a los productos de su fermentación. La mayoría llevan a cabo una fermentación ácido – mixta y producen principalmente Lactato, Acetato, Succinato, Formionato y Etanol. De la fermentación butanodiólica, los productos principales son Butanol, Etanol y CO₂. Debido a que las bacterias entéricas son de aspecto tan similar, normalmente se usan pruebas químicas para identificarlas tras un examen preliminar de su morfología movilidad y crecimiento (Madigan *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014).

En los laboratorios de control de alimentos es ampliamente difundido el uso de sistemas miniaturizados que serán analizados posteriormente.

Las enterobacterias son un buen indicador de contaminación en alimentos procesados que han sufrido un tratamiento que elimine la flora microbiana vegetativa. Este indicador se puede aplicar desde la etapa del tratamiento hasta la etapa de distribución al consumidor final. En cambio, para los alimentos refrigerados las enterobacterias son un indicador global de higiene de los productos a la salida de la fábrica, pero no sirven de indicador durante la etapa de distribución porque, aunque existan recuentos elevados, eso no indica necesariamente una rotura de la cadena del frío.

Los métodos de detección de enterobacterias requieren de un enriquecimiento de la muestra en agua de peptona tamponada o en caldo tripticasa soya y, la detección de microorganismos oxidasa positivo a partir de un crecimiento posterior en un medio de agar bilis lactosa glucosa rojo neutro cristal violeta. Este tipo de procedimiento estimula el desarrollo de las enterobacterias presentes en la muestra. Entre los análisis existentes para determinar presencia de Enterobacterias se puede mencionar: Ausencia / Presencia; recuento por siembra en placa y pruebas confirmatorias (INEN 1 529-15:95).

Metodología convencional. Control microbiológico de los alimentos. Enterobacteriaceae. Recuento en placa por siembra en profundidad. (NTE INEN 1 529-13:98)

La norma en referencia establece el método de recuento en placa por siembra en profundidad para determinar el número de células viables de Enterobacteriaceae presentes en un gramo o centímetro cúbico de muestra. Este método es indicado para productos que contengan una alta carga de Enterobacteriaceae.

El Recuento de Enterobacteriaceae corresponde a la determinación del número de colonias típicas de Enterobacteriaceae que se desarrollan a partir de un gramo ó cm^3 de muestra, utilizando medios selectivos. Se basa en la capacidad de las Enterobacteriaceae, de producir ácidos a partir de la glucosa, y utiliza la técnica del recuento en placa por siembra en profundidad, en agar cristal

violeta-rojo neutro-bilis-glucosa (VRBG) o similar, y una temperatura de incubación de 37 ± 1 °C (NTE INEN 1 529-13:98).

Materiales y métodos

Materiales

- La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.
- Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.
- Incubador regulable, rango de temperatura de 25 a 70 ± 1 °C.
- Autoclave
- Balanza de capacidad no inferior a 2.500 g y de 0,1 g de sensibilidad.
- Contador de colonias
- Frascos de boca ancha de 250, 500 y 1000 cm³ con tapas de rosca autoclavables.
- pH-metro
- Erlenmeyer de 500 y 1000 cm³
- Papel Whatman No. 2 en cuadrados o tiras pequeñas (NTE INEN 1 529-13:98).

Medios de cultivo y reactivos

Hace referencia a la norma NTE INEN 1529-1, anteriormente descrita.

Preparación de medios de cultivo

Caldo triptona soya (CTS).

Medio glucosa sal

Agar nutritivo

Agar cristal violeta-rojo neutro-bilis-glucosa (VRBG).

Solución acuosa al 1% de dihidrocloruro de tetrametil - parafenileno - diamina.

Vaselina líquida estéril.

Preparación de la muestra

Dependiendo del tipo de alimento se preparará la muestra según lo establecido en anteriormente según la INEN 1529-2.1999

Procedimiento

Revitalización de las Enterobacteriaceae

Agitando de vez en cuando, mantener los tubos de las diluciones decimales a temperatura del laboratorio (20 a 25 °C), por dos horas. Aplicar esta etapa a alimentos que han sufrido tratamientos de conservación (químicos o físicos).

Realizar las diluciones en caldo soya triptona a partir de la suspensión madre (10⁻¹); utilizar una nueva pipeta estéril para cada dilución. (NTE INEN 1 529-13:98)

Siembra

Utilizando una pipeta estéril, de cada una de las diluciones decimales pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ en placas Petri adecuadamente identificadas.

Iniciar por la dilución de menor concentración e inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas aproximadamente 20 cm³ de agar "VRBG" previamente fundido y templado a 45 ± 2 °C.

Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas de reloj; repetir este proceso, pero en sentido contrario. Una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a 37 °C por 16 a 18 horas (NTE INEN 1 529-13:98).

Recuento de colonias y lectura

Pasado el tiempo de incubación, si es posible, seleccionar las placas de dos diluciones consecutivas que presenten entre 15 y 150 colonias características y examinar con luz transmitida. Contar todas las colonias púrpura, rodeadas generalmente de un precipitado también de color púrpura. Anotar el número de colonias y la respectiva dilución.

Si en la mitad o en más de la mitad de la superficie de las placas hay crecimiento invasivo desechar la placa.

Si menos de la mitad de la superficie está cubierta, contar las colonias en la parte clara y extrapolar de tal manera que el número corresponda a la superficie total de la placa.

Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra (NTE INEN 1 529-13:98).

Selección de colonias

Siempre que se requiere de ensayos confirmatorios, éstos deben ser realizados a partir de colonias previamente seleccionadas y purificadas.

Del total de colonias típicas, presuntas, seleccionar las bien aisladas, en un número equivalente a la raíz cuadrada, con un mínimo de cinco.

A cada una de estas colonias inocularlas individualmente, en tubos que contengan agar nutritivo inclinado o PCA.

Incubar a 37 °C por 24 ± 1 hora.

Hacer extensiones de éstos subcultivos, comprobar su pureza (solo bacilos Gram negativos) y utilizarlos para realizar pruebas complementarias (NTE INEN 1 529-13:98).

Pruebas complementarias

Prueba de la oxidasa: sobre un vidrio o dentro de una placa Petri colocar un cuadrado o tira de papel filtro, humedecerlo con unas gotas de la solución de dihidrocloruro de tetrametil para fenilendiamina.

Cuidadosamente, sobre este papel frotar un asa del cultivo haciendo una pequeña raya. Es positiva si aparece un color púrpura oscuro en 5 a 10 segundos. Las enterobacterias tienen reacción negativa (NTE INEN 1 529-13:98).

Prueba de la utilización de la glucosa: en un tubo de medio glucosa sal, con aguja sembrar por picadura el subcultivo en agar nutritivo; luego, cubrirlo con vaselina líquida estéril. Incubar a 37 °C por 24 horas.

La reacción es positiva si el color del medio cambia a amarillo. Las enterobacterias tienen reacción positiva (NTE INEN 1 529-13:98).

La mayoría de las cepas producen gas. Cuando se desea conocer otras propiedades de las cepas de enterobacterias aisladas se debe realizar las respectivas pruebas bioquímicas.

Cálculos

Calcular basándose en el número de colonias confirmadas en relación al número total de las colonias típicas contadas (presuntas enterobacterias) y si por lo menos, el 80% de las colonias típicas sometidas a las pruebas

complementarias son confirmadas como Enterobacteriaceae, tomar el número de colonias típicas contadas en como el número de enterobacterias por placa.

Cálculo del número (N) de unidades formadoras de colonias (UFC) de Enterobacteriaceae por centímetro cúbico ó gramo de muestra.

Utilizar la siguiente fórmula:

$$N = \frac{\text{número total de colonias contadas o calculadas}}{\text{Cantidad total de muestra sembrada}}$$

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

En donde:

ΣC = suma de las colonias de enterobacterias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10⁻²;

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa (NTE INEN 1 529-13:98).

Redondeo de números

El valor obtenido redondear a dos cifras significativas, de la siguiente manera:

Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menos de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes.

Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito.

Si el tercer dígito empezando por la izquierda es igual a cinco y es seguido de por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes.

Si el tercer dígito es igual a cinco y no le sigue otro (s) dígito (s), ó lo es solo por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero, conservarlo inalterado (NTE INEN 1 529-13:98; NTE INEN 52).

Presentación de resultados

Presentar el resultado como número N de unidades formadoras de colonias UFC de Enterobacteriaceae por cm^3 ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x , donde x es la respectiva potencia de 10.

Si no hay desarrollo de colonias de enterobacterias en las placas de la dilución más concentrada, presentar el resultado como número estimado (NE) de UFC de Enterobacteriaceae menor que ($< 1,0 \times 1,01$)

Si no hay desarrollo de colonias de enterobacterias en las placas sembradas con 1 cm^3 de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el

resultado de la siguiente manera: NE de UFC de Enterobacteriaceae/ $\text{cm}^3 = < 1,0$
 $\times 1,00$

Si las placas sembradas con la dilución menos concentrada (productos sólidos o líquidos) presentan más de 150 colonias, expresar el resultado de la siguiente manera: NE de UFC de Enterobacteriaceae/ cm^3 ó g = $>$ al valor obtenido \times "f" Indicar entre paréntesis la dilución utilizada.

Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores (NTE INEN 1 529-13:98).

Precisión del método

Repetibilidad del recuento de colonias y error personal.

Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y, del 10% cuando es realizado por otra persona.

El método de cálculo relacionando el número total de colonias contadas en las placas de dos diluciones consecutivas con el total de la muestra sembrada, aumenta la precisión del resultado. Sin embargo, solo por razones estadísticas, en el 95% de los casos los límites de confianza para la técnica del recuento en

placa varía de $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$, este intervalo se amplía para los recuentos de colonias menores de 15 por placa.

En la práctica, se puede encontrar una mayor variación, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas (NTE INEN 1 529-13:98).

4.9 COLIFORMES TOTALES Y FECALES

Las bacterias coliformes comprenden varios géneros de las Enterobacteriaceae, capaces de fermentar la lactosa a 35 °C con la producción de gas.

Se encuentran ampliamente difundidas en la naturaleza. También son habitantes normales del tracto intestinal de los humanos y de animales de sangre caliente y guardan una estrecha relación con bacterias que son patógenas o dañinas para el humano y capaces de generar enfermedades diarreicas que, dependiendo del colectivo, pueden desencadenar la muerte (Alonso y Poveda, 2008).

Dentro de los coliformes totales se puede distinguir dos grupos:

Los coliformes fecales (CF), que lógicamente provienen del tracto intestinal y se encuentran en grandes cantidades en las heces fecales de humanos y animales de sangre caliente y que, lógicamente, son los mejores indicadores de riesgo de infecciones humanas (Alonso y Poveda, 2008).

Los coliformes que se encuentran naturalmente en el suelo y el agua. (Mandigan *et al.*, 2004; Perdomo *et al.*, 2001).

Las coliformes pueden ser detectadas y cuantificadas con relativa facilidad mediante métodos simples de análisis, lo que las convierte en excelentes microorganismos indicadores de la higiene del agua y alimentos.

Las principales bacterias coliformes son *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. El hábitat natural de *E. coli* es el intestino del hombre y de los animales de sangre caliente y raramente se lo encuentra en otro lugar. *Enterobacter aerogenes* en cambio, esta asociada con la vegetación y solo ocasionalmente aparece en el intestino (Alonso y Poveda, 2008).

La presencia de estos microorganismos en alimentos indica definitivamente mala calidad higiénica en el proceso o, de las personas que manipulan el producto o, una recontaminación posterior al proceso de fabricación. Si bien estas bacterias no son generalmente patógenas, son indicadores de la presencia de microorganismos potencialmente patógenos y por lo tanto se los considera un indicador de normas sanitarias deficientes. (Perdomo *et al.*, 2001)

Escherichia coli

Esta especie comprende bacilos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos. Son de rápido crecimiento y amplia distribución. Si bien provienen del tracto intestinal del hombre y de los animales de sangre caliente, puede sobrevivir en otros nichos apropiados. Por lo tanto la presencia de este

microorganismo indica que existe una contaminación fecal (Alonso y Poveda, 2008).

Metodología convencional. Control microbiológico de los alimentos.

Determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable (NTE INEN 1529-6 (1990))

Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de microorganismos coliformes.

Coliformes (*coli aerogenes*). Son bacterias de forma bacilar, Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas móviles e inmóviles, no esporuladas que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermentan la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban a 30 ± 1 °C los productos refrigerados y a 35 ± 1 °C los productos que se mantienen a temperatura. Este grupo es utilizado como indicador del grado de higiene (Alonso y Poveda, 2008).

El recuento de coliformes permite determinar el número de coliformes viables por gramo o cm^3 de muestra de alimento (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Equipo y material de vidrio

Equipo usual en un laboratorio microbiológico. En particular

Pipetas serológicas de punta ancha de 1, 5 y 10 cm^3 graduadas en 1/10 de unidad.

Cajas Petri

Tubos de 150 x 16 mm y de 125 x 12 mm

Tubos Durhan de 50 x 6 mm

Erlenmeyer de 500 y 1 000 cm³

Frascos de boca ancha de 250, 500 y 1 000 cm³ con tapa de rosca autoclavable.

Asa de inoculación

Gradillas

Balanza de capacidad no inferior a 2 500 g y de 0,1 g de sensibilidad

Incubador regulable, rango de temperatura de 25 - 70 ± 1 °C

Autoclave

pH-metro (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Medios de cultivo y diluyentes

Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL); Norma INEN 1529-1

Agar eosina azul de metileno (EMB), Norma INEN 1 529-1.

Solución de Peptona al 0,1% Norma INEN 1 529-1

Preparación de la muestra

Dependiendo del tipo de alimento se preparará la muestra según lo establecido en anteriormente según la INEN 1529-2.1999.

Procedimiento

Inmediatamente después de realizadas las diluciones con una pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10-1 a cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ de caldo BGBL o similar (ver figura 1).

Con otra nueva pipeta estéril, transferir 1 cm³ de la dilución 10⁻² en cada uno de los tres tubos que contengan 10 cm³ del medio.

Proceder de igual manera con las otras diluciones.

Incubar los tubos a 30 ± 1 °C para productos refrigerados y 35 ± 1 °C para productos que se mantiene a temperatura ambiente por 48 horas.

Transcurridas las 48 horas anotar en cada dilución como presuntos positivos todos los tubos que presenten crecimiento con producción suficiente de gas como para llenar el fondo cóncavo del tubo Durhan es decir, el menisco llegaría hasta donde las paredes del tubo se hacen paralelas.

También se considera como presunto positivo si el tubo Durhan contiene menos gas del indicado, pero al golpear delicadamente al tubo de cultivo hay desprendimiento de burbujas. Solo la turbidez no es indicativo de una prueba positiva.

Agitar cada uno de los tubos presuntamente positivos y con un asa de inoculación a partir de cada uno de ellos sembrar por estría en la superficie de placas individuales secas de Agar; identificar las placas.

Invertir las placas e incubarlas a 30 ± 1 °C para productos refrigerados y 35 ± 1 °C para productos que se mantienen a temperatura ambiente por 24 ± 2 horas.

Si al término del período de incubación hay desarrollo de colonias lactosa positivas las cuales son negras o poseen centro oscuro con periferias

transparentes incoloras o bien colonias mucoides de color rosa naranja, confirman la presencia de coliformes. De cada dilución anotar el número de tubos positivos confirmados de coliformes (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Selección de diluciones

Elegir la dilución más alta en la que la presencia de coliformes es confirmada en tres tubos y las dos diluciones superiores más próximas. Por ejemplo, si las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} presentan resultados positivos confirmados en los tres tubos, la 10^{-3} presenta un tubo y 1 a 10^{-4} ninguno, anotar los resultados de la siguiente manera:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
3/3	3/3	1/3	0/3

Las diluciones elegidas serán la 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} cuya relación de tubos positivos es 3-1-0 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 43.

Si ninguna de las diluciones presenta tres tubos positivos confirmados seleccionar las tres diluciones más altas con algún tubo positivo. Por ejemplo, se tiene los siguientes datos:

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
2/3	2/3	1/3	1/3

Las diluciones que deben ser seleccionadas son las 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} , dando una combinación de tubos positivos de 2-1-1 que según la Tabla 1 le corresponde un NMP de 20 (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Cálculos

Cuando las tres diluciones decimales sucesivas son las 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} y se ha inoculado 3 alícuotas de 1 cm^3 de cada una de éstas, anotar la relación de tubos positivos confirmados y ver en la Tabla 1 el respectivo NMP/g ó cm^3 .

Para calcular el NMP/g ó cm^3 cuando se inocula tres alícuotas de 1 cm^3 de más de tres diluciones decimales sucesivas, multiplicar el NMP por el factor adecuado: 10, 100, 1000, etc. Por ejemplo, si los tubos seleccionados corresponden a las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , multiplicar por 100, multiplicar por 1 000 si las diluciones seleccionadas son 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y así sucesivamente.

Para el caso de productos con baja carga microbiana se puede utilizar soluciones más concentradas. En este caso, dividir el NMP para el factor adecuado.

Por ejemplo, si al inocular 3 alícuotas de 10 cm^3 de la dilución 10^{-1} , 3 alícuotas de 1 cm^3 de la 10^{-1} y 3 alícuotas de 1 cm^3 de la 10^{-2} se obtiene una relación de tubos positivos confirmados de 3-2-1, a esta relación le corresponde un NMP de 150 que dividido para 10 se obtiene un NMP de 15 coliformes/g ó cm^3 de muestra (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Errores del método

El NMP es realmente una estimación del número de bacterias existentes en cualquier muestra, y esta estimación está sujeta a errores inherentes al método, aunque esto no invalida la idoneidad de la prueba para detectar la contaminación.

Las combinaciones de tubos positivos de las categorías 3-4 y las que no figuran en la Tabla 1, son muy poco probables y no pueden servir de base para decidir, devolver y/o reprocesar el producto.

Cuando frecuentemente se obtengan combinaciones improbables, revisar cuidadosamente el método y eliminar todas las probables causas de error (mezcla deficiente de la muestra y/o diluciones, presencia de inhibidores en los alimentos, etc.) (NTE INEN 1529-6 (1990)).

Informe de resultado

Reportar: NMP de coliformes/g ó cm^3 de muestra.

Indicar el método de ensayo. Mencionar cualquier condición no especificada en esta norma o considerada como opcional, así como cualquier circunstancia que pueda haber influido en el resultado. Incluir todos los detalles de identificación de la muestra (NTE INEN 1529-6 (1990)).

**Metodología convencional. Control microbiológico de los alimentos.
Determinación de coliformes fecales y *E. coli* (NTE INEN 1529-8 (1990))**

Esta norma establece la técnica del número más probable para la determinación de coliformes fecales y las pruebas confirmatorias de *Escherichia coli* e identificación de las especies del grupo coliforme fecal.

Las Coliformes fecales es un grupo de coliformes que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes fermenta la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura entre 44 y 45,5 °C. Este grupo contiene una alta proporción de *E coli*, tipo I y II y que en general puede considerarse como equivalente a *E. coli*, siendo por ello útiles como indicadores de contaminación fecal en los alimentos (Alonso y Poveda, 2008).

E. coli es una especie bacteriana que a más de presentar las características del grupo coliforme fecal, produce indol a partir del triptofano; es positivo a la prueba del rojo de metilo y negativo a la de Voges Proskauer. No utiliza el citrato como única fuente de carbono (Alonso y Poveda, 2008).

Las cepas indol positivas se llaman *E. coli* Tipo I y se supone que su hábitat natural primario es el intestino.

El recuento de coliformes fecales permitirá la determinación del número de coliformes fecales por gramo o cm³ de muestra de alimento y la diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal.

El proceso para confirmar la presencia de *E. coli* y diferenciar las especies y variedades del grupo coliforme fecal se basa en un conjunto de pruebas bioquímicas conocidas como "IMVEC".

El IMVEC. Es una designación mnemónica de un grupo de cinco pruebas bioquímicas que consiste en:

I = Verificación de la producción de indol a partir del triptófano

M = Reacción del RM (rojo de metilo) para comprobar el descenso del pH del caldo glucosa tamponado

V = Reacción de VP (Voges-Proskauer); para comprobar la producción de acetoina a partir de glucosa.

E = Prueba de Eijkman, para comprobar la termotolerancia o crecimiento a $44 - 45,5 \pm 0,2$ °C.

C = Utilización del citrato como fuente de carbono (NTE INEN 1529-8 (1990)).

Equipo y materiales

Equipo usual en un laboratorio microbiológico en particular.

Placas porta objetos.

Baño de agua regulable a $44 - 45,5 \pm 0,2$ °C.

Medios de cultivo y reactivos

Caldo verde brillante bilis-lactosa (BGBL) o similar, Norma INEN 1 529-1

Caldo triptona; Norma INEN 1 529-1.

Agar eosina azul metileno (EMB); Norma INEN 1 529-1.

Agar de contage en placa (PCA); Norma INEN 1 529-1.

Caldo MR-VP; Norma INEN 1 529-1.

Reactivos de Kovacs; Norma INEN 1 529-1.

Solución de Rojo de metilo; Norma INEN 1 529-1.

Solución de Creatina al 0,5%; Norma INEN 1 529-1.

Solución alcohólica de α -naftol al 6%; Norma INEN 1 529-1

Solución de hidróxido de Potasio al 40%; INEN 1 529-1.

Agar citrato de Simons; Norma INEN 1 529-1.

Solución alcohol-acetona; Norma INEN 1 529-1.

Solución fenicada de cristal violeta al 1%; Norma INEN 1529-1.

Solución fenicada de fucsina básica al 1%; Norma INEN 1529-1.

Solución de lugol; Norma INEN 1529-1.

Procedimiento

Coliformes fecales

Simultáneamente con el ensayo confirmatorio de la Norma INEN 1 529-6 inocular dos o tres asas de cada uno de los tubos presuntamente positivos en un tubo conteniendo 10 cm³ de caldo BGBL y en otro que contenga aproximadamente 3 cm³ de caldo triptona (ver Figura 2). Incubar estos tubos a 45,5 \pm 0,2 °C (baño María) por 48 horas.

Al cabo de este tiempo anotar la presencia de gas en los tubos de BGBL y añadir dos o tres gotas del reactivo de Kovacs a los tubos de agua triptona. La reacción es positiva para el indol si en cinco minutos se forma un anillo rojo en la superficie de la capa de alcohol amílico; en la prueba negativa el reactivo de Kovacs conserva el color original. Los cultivos gas positivos en caldo verde brillante bilis-lactosa incubados a 30 ó 35 ° C y a 45,5 ° C y que producen indol a 45,5 ° C son considerados coliformes fecales positivos.

Confirmación de *E. coli* y diferenciación de las especies del grupo mediante las pruebas IMVIC

En situaciones que justifiquen el esfuerzo y sean necesarias la conformación de *E. coli* y la diferenciación de las especies del grupo coliforme fecal, se puede realizar los ensayos para indol, rojo de metilo, Voges Praskauer y citrato sódico (Pruebas IMViC), de la siguiente manera:

De cada tubo de caldo BGBL que sea positivo para coliformes fecales sembrar por estría un asa en una placa individual de agar eosina azul de metilo o agar VRB previamente seca e identificada. Incubar las placas invertidas a 35 – 37 °C por 24 horas.

Para confirmar la presencia de *E. coli*, de cada placa escoger 2 - 3 colonias bien aisladas y típicas (negra o nucleada con brillo verde metálico de 2 - 3 mm de diámetro) y sembrar en estría en tubos de agar PCA o agar nutritivo inclinado e incubar los cultivos a 35 – 37 °C por 24 horas.

Hacer extensiones a partir de los cultivos en agar PCA o nutritivo inclinado y teñirlos por el método de Gram, si se comprueba la pureza de los cultivos de sólo bacilos Gram negativos no esporulados, utilizar éstos para la prueba IMViC.

Prueba para indol

Sembrar en un tubo de agua triptona un asa de cultivo puro, incubar 24 horas a 35 – 37 ° C. Añadir al tubo 0,5 cm³ del reactivo de Kovacs.

La aparición de un color rojo oscuro en la superficie del reactivo, indica una prueba positiva. En la prueba negativa el reactivo conserva el color original.

Prueba del rojo de metilo (RM)

Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro incubar 24 horas a 35–37 °C, añadir a cada tubo aproximadamente 3 gotas de la solución de rojo de metilo, agitar; si el cultivo se torna rojo la prueba es positiva y negativa si hay viraje a amarillo.

Prueba de Voges-Proskauer (VP)

Sembrar en un tubo de caldo MR-VP un asa de cultivo puro e incubar 24 horas a 35 – 37 °C. Luego de este período, añadir los siguientes reactivos cuidando de agitar el tubo después de cada adición:

- solución de creatina al 0,5%. 2 gotas
- solución alcohólica de α -naftol al 6% 3 gotas
- solución de hidróxido de potasio al 40%: 2 gotas.

Observar dentro de 15 minutos. La aparición de un color rosado o rojo brillante, generalmente al cabo de cinco minutos el resultado es positivo.

Prueba para la utilización del citrato

Un asa del cultivo puro sembrar por estría en la superficie de la lengüeta de agar citrato inclinado e incubar 24 horas a 35 – 37 °C. La reacción es positiva si hay crecimiento visible que se manifiesta por lo general en el cambio de color del medio, de verde a azul.

Considerar como *E. coli* a los microorganismos que presentan las siguientes características: bacilos Gram negativos, no esporulados que producen gas de la lactosa y reacción IMVEC (Ver Tabla 2).

Cálculos

Coliformes fecales

Calcular la densidad de coliformes fecales sólo en base del número de tubos que a 45,5 °C presentan gas en el caldo BEGL e indol en el caldo triptona, de acuerdo

a Norma INEN 1 529-6, determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable

Para determinar el NMP de *E. coli* proceder de acuerdo a Norma INEN 1 529-6, determinación de microorganismos coliformes por la técnica del número más probable, basándose únicamente en todos los tubos que presentan bacilos con las características indicadas en la norma indicada.

Informe de resultados

Coliformes fecales. Reportar NMP de coliformes fecales/g ó cm³ de muestra.

E. coli. Reportar NMP de *E. coli*/g ó cm³ de muestra

4.10 MOHOS Y LEVADURAS

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente. Pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes de los equipos de una línea de fabricación. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto

pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc. (Camacho, A., *et. Al.*, 2009)

Los hongos y levaduras pueden utilizar ciertos sustratos como pectinas, carbohidratos como polisacáridos, ácidos orgánicos, proteínas y lípidos. También pueden causar problemas a través de: (a) síntesis de metabolitos tóxicos (micotoxinas), (b) resistencia al calor, congelamiento, antibióticos o irradiación y (c) habilidad para alterar sustratos no favorables permitiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Pueden también causar malos olores y sabores y la decoloración de las superficies de alimentos (Camacho *et. al.*, 2009).

Los hongos y las levaduras son microorganismos eucariotas, unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos de forma oval (0 – 5 μm) inmóviles que se dividen por diversos mecanismos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosa y se han convertido en organismos unicelulares (Tortora, 2007).

La mayoría de hongos en cambio, son filamentosos o pluricelulares y se caracterizan por estar formados por filamentos ramificados o hifas que forman un micelio. El crecimiento de los hongos filamentosos en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado. Generalmente todo alimento enmohecido se considera no apto para el consumo. La identificación y clasificación de los mohos

se basa en observaciones macroscópicas y microscópicas (Alonso y Poveda, 2008).

En comparación con la mayoría de las levaduras y de las bacterias, la mayoría de los mohos necesitan menor cantidad de humedad disponible. Un porcentaje total de humedad por debajo del 14 al 15 por ciento en la harina o en algunos frutos secos impedirá o retardará mucho el crecimiento de los mohos. Los mohos podrían considerarse mesófilos, es decir, que son capaces de crecer bien a temperaturas normales. La temperatura óptima de la mayoría se encuentra alrededor de los 25 a 30 °C, aunque algunos son psicrótrofos y algunos son termófilos. Son aerobios, esto es cierto por lo menos en los mohos que crecen en la superficie de los alimentos. Casi todos los mohos son capaces de crecer dentro de un amplio intervalo de pH (pH comprendido entre 2 y 8.5), aunque la mayoría crece mejor a pH ácido. Son capaces de utilizar muchos tipos de alimentos, que van desde sencillos a complejos. Poseen enzimas hidrolíticas, y de aquí que algunos se utilicen para la producción industrial de las amilasas, pectinasas, proteasas y lipasas (Camacho *et al.*, 2009).

Algunos géneros de mohos importantes en alimentos

Mucor: Intervienen en la alteración de algunos alimentos y se utilizan en la fabricación de otros. *M. rouxii* se utiliza para la sacarificación del almidón, para la maduración de quesos y para la fabricación de algunos alimentos orientales.

Rhizopus: La especie *R. stolonifer*, o moho del pan, es muy común e interviene en la alteración de algunos alimentos: bayas, frutas, hortalizas, pan, etc.

Aspergillus: Los aspergilos son mohos muy abundantes. Algunas especies intervienen en las alteraciones que experimentan los alimentos, mientras que otros son de utilidad para preparar determinados alimentos. *A. niger* se utiliza para la producción industrial de ácido cítrico y glucónico y de algunas enzimas. *A. flavus* se utiliza para la fabricación de ciertos alimentos orientales y en la obtención de enzimas (Madigan *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2014).

Se han reportado casi 50 especies de *Aspergillus* como productores de metabolitos tóxicos denominados en general micotoxinas. Las de mayor importancia son: las denominadas aflatoxinas (producidas por *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A. nomius*); la ocratoxina A producida por *A. ochraceus*, *A. carbonarius* y *A. niger*; sterigmatocistina producida principalmente por *A. versicolor*; el ácido ciclopiazónico producidas por *A. flavus* y *A. tamarii*. La citrinina, patulina y ácido penicílico también son producidas por especies de *Aspergillus*, las tóxicas tremorgénicas son producidas por *A. terreus* (territremas), *A. fumigatus* (fumitremorgenas) y *A. clavatus* (triptoquivalina) (Madigan *et al.*, 2012; Goering *et al.*, 2013; Murray *et al.*, 2014).

Las aflatoxinas son derivados de la difurancumarina. Las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 se producen en la naturaleza por los mohos ya mencionados. Las letras B y G se refieren a los colores de fluorescencia por sus nombres en inglés (azul y verde, respectivamente) observados bajo longitudes de onda en la región UV, y los subíndices 1 y 2 se refieren a sus patrones de separación cromatográficos.

Las aflatoxinas M1 y M2 se producen por la hidroxilación de las respectivas aflatoxinas B. La aflatoxina B1 tal vez sea el carcinógeno de hígado más potente para animales incluyendo al humano.

La ocratoxina A y la citrinina afectan la función renal. Las toxinas tremorgénicas afectan el sistema nervioso central.

Penicillium. Es otro género de mohos de frecuente incidencia y de importancia en los alimentos, *P. expansum* produce la podredumbre blanda de las frutas; *P. digitatum* y *P. italicum* producen la podredumbre de frutas cítricas. Las especies *P. camemberti*, *P. roqueforti* se utilizan en la maduración de quesos.

Se han reportado más de 80 especies de *Penicillium* como productores de micotoxinas.

Estas micotoxinas pueden dividirse en dos grupos: las que afectan la función hepática o renal, y las neurotoxinas.

Las principales micotoxinas producidas por *Penicillium* son, ocratoxina A, citrinina, patulina, ácido ciclopiazónico, citreoviridina, penitremo A, toxina PR y roquefortina y el ácido secalónico. De éstas la ocratoxina A es sin duda la más importante, es un carcinógeno renal y es producida por *P. citrinum*, *P. viridicatum*, *P. verrucosum*. La principal fuente de esta toxina es el pan de centeno o trigo, o a través de cerdos alimentados con estos cereales cuya carne es posteriormente consumida por humanos. (Camacho, A., *et. Al.*, 2009)

Algunos géneros de levaduras de importancia en alimentos son:

***Schizosaccharomyces*.** Levaduras de este género se han encontrado en frutas tropicales, en la melaza y en la miel.

***Saccharomyces*.** La especie *S. cerevisiae* se emplea en muchas industrias alimentarias, como en la fermentación del pan, fermentación de la cerveza, fermentación de los vinos, en la producción de alcohol, glicerol e invertasa.

***Kluyveromyces*.** *K. marxianus* (antes *Saccharomyces fragilis*) se utiliza en la obtención de productos lácteos por su capacidad de fermentar la lactosa.

***Zygosaccharomyces*.** Las levaduras de este género son importantes por su capacidad para crecer en medios con elevadas concentraciones de azúcar (osmófilas), intervienen en la alteración de la miel, jarabes y melazas, y también en la fermentación de la salsa de soya y de algunos vinos.

***Pichia*.** Crecen en la superficie de los líquidos formando una película. *P. membranafaciens* produce una película en la superficie de las cervezas y vinos.

***Debaromyces*.** Forman película en la superficie de las salmueras. *D. kloeckeri* crece en la superficie de los quesos y de los embutidos.

***Hanseniaspora*.** Estas levaduras tienen forma de limón y crecen en los zumos de frutas.

Torulopsis. Originan problemas en las fábricas de cervezas. *T. sphaerica* fermenta la lactosa, alterando productos lácteos. Otras especies alteran la leche condensada azucarada, los concentrados de zumos de frutas y los alimentos ácidos.

Candida. La especie *C. utilis* se cultiva para la obtención de proteína unicelular para incorporarla tanto a alimentos destinados al consumo humano como a piensos. La especie *C. krusei* se utiliza junto con los cultivos iniciadores de productos lácteos. *C. lipolytica* produce alteración de la mantequilla y margarina.

Brettanomyces. Producen grandes cantidades de ácido e intervienen en la fermentación de la cerveza belga de tipo “lambic”, de las cervezas inglesas y de los vinos franceses.

Trichosporon. Estas levaduras crecen mejor a temperaturas bajas, encontrándose en las fábricas cerveza y en la superficie de vacuno refrigerada.

Rhodotorula. Estas levaduras de color rojo, rosa o amarillo, pueden producir manchas en la superficie de los alimentos como en la superficie de las carnes, o zonas de color rosado en el sauerkraut. (Camacho, A., *et. Al.*, 2009)

Metodología convencional. Control Microbiológico de los Alimentos. Mohos y levaduras viables. Recuento en placa por siembra en profundidad (NTE INEN 1529-10 (1998))

Esta norma describe el método para cuantificar el número de unidades propagadoras de mohos y levaduras en un gramo ó centímetro cúbico de muestra. Se basa en el uso del método de recuento, en placa, por siembra en profundidad.

El recuento de mohos y levaduras viables es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22 °C y 25 °C.

Materiales y Medios de cultivo

Materiales

La vidriería debe resistir esterilizaciones repetidas y todo el material debe estar perfectamente limpio y estéril.

Placas Petri

Pipetas serológicas de boca ancha de 1; 5 y 10 cm³ graduadas en 1/10 de unidad.
(NTE INEN 1529-10 (1998))

Medio de cultivo

Agar sal-levadura de Davis o similar NTE INEN 1 529-1.

Preparación de la muestra

Dependiendo del tipo de alimento se preparará la muestra según lo establecido en anteriormente según la INEN 1529-2.1999

Procedimiento

Utilizando una sola pipeta estéril, pipetear, por duplicado, alícuotas de 1 cm³ de cada una de las diluciones decimales en placas Petri adecuadamente identificadas. Iniciar por la dilución de menor concentración.

Inmediatamente, verter en cada una de las placas inoculadas, aproximadamente 20 cm³ de agar sal-levadura de Davis (SLD) fundido y templado a 45 ± 2 °C. La adición del medio de cultivo no debe pasar más de 15 minutos, a partir de la preparación de la primera dilución.

Delicadamente, mezclar el inóculo de siembra con el medio de cultivo, imprimiendo a la placa movimientos de vaivén, 5 veces en una dirección; hacerla girar cinco veces en sentido de las agujas del reloj. Volver a Imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y hacerla girar cinco veces en sentido contrario a las agujas de reloj.

Utilizar una placa para el control de la carga microbiana del ambiente, la cual no debe exceder de 15 colonias/placa, durante 15 minutos de exposición. Este límite se utiliza siempre y cuando se mantengan prácticas adecuadas de limpieza y desinfección.

Como prueba de esterilidad del medio, en una placa sin inóculo verter aproximadamente 20 cm³ del agar.

Dejar las placas en reposo hasta que se solidifique el agar.

Invertir las placas e incubarlas entre 22 °C y 25 °C, por cinco días.

Examinarlas a los dos días de incubación y comprobar si se ha formado micelio aéreo. Las primeras colonias que se desarrollan son las de levaduras, que suelen ser redondas, cóncavas, estrelladas. La mayoría de las colonias jóvenes de levaduras son húmedas y algo mucosas, también pueden ser harinosas, blanquecinas y algunas cremosas y rosadas. En ciertos casos, apenas cambian al envejecer, otras veces se desecan y encogen. Las colonias de mohos tienen un aspecto algodonoso característico.

Cuando el micelio aéreo de los mohos amenace en cubrir la superficie de la placa, dificultando las lecturas posteriores; pasados dos días, realizar recuentos preliminares en cualquier placa que se pueda distinguir las colonias.

A los cinco días, seleccionar las placas que presenten entre 10 y 150 colonias y contarlas sin el auxilio de lupas. A veces pueden desarrollarse colonias

pequeñas, éstas son de bacterias acidófilas y, por tanto, deben excluirse del recuento. Las colonias de levaduras deben ser comprobadas por examen microscópico

Contar las colonias de mohos y levaduras en conjunto o separadamente. Si las placas de todas las diluciones contienen más de 150 colonias, contar en las placas inoculadas con la menor cantidad de muestra (NTE INEN 1529-10 (1998)).

Cálculos

Cálculo del número (N) de unidades propagadoras (UP) de mohos y/o levaduras por centímetro cúbico ó gramo de muestra. Calcular según la siguiente fórmula:

Número total de colonias contadas o calculadas

N =

Cantidad total de muestra sembrada

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1 m_2) d}$$

Donde:

$\sum C$ = suma de las colonias contadas o calculadas en todas las placas elegidas;

n_1 = número de placas contadas de la primera dilución seleccionada;

n_2 = número de placas contadas de la segunda dilución seleccionada;

d = dilución de la cual se obtuvieron los primeros recuentos, por ejemplo 10^{-2} ;

V = volumen del inóculo sembrado en cada placa (NTE INEN 1529-10 (1998)).

Redondeo

El valor obtenido redondear a dos cifras significativas de la siguiente manera (NTE INEN 52):

Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es menor de cinco, mantener inalterado el segundo dígito y reemplazar por ceros los restantes. Por ejemplo, si el valor calculado fuere 553 000, redondeado a 550 000 y expresar como $5,5 \times 10^5$.

Si el tercer dígito, empezando por la izquierda es superior a cinco, añadir una unidad al segundo dígito; por ejemplo, si el valor obtenido fue 10 954, redondearlo a 11 000 y expresar $1,1 \times 10^4$.

Si el tercer dígito empezando por la izquierda es cinco y es seguido de, por lo menos, un dígito, añadir una unidad al segundo dígito y reemplazar por ceros a los restantes. Por ejemplo, si el valor obtenido fue 31 554, redondearlo a 32 000 y expresar como $3,2 \times 10^4$.

Si el tercer dígito es cinco y no es seguido de otro (s) dígito (s) ó lo es únicamente por ceros, añadir una unidad al segundo dígito, si éste es impar; si es par ó cero conservarlo inalterado, ejemplo: 235 redondear a 240 y expresar como

$2,4 \times 10^2$, 24 500 redondear a 24 000 y expresar como $2,4 \times 10^4$ (NTE INEN 1529-10 (1998)).

Presentación de resultados

Presentar el resultado como número, N, de unidades propagadoras UP de mohos y/o levaduras / cm^3 ó g de muestra utilizando solo dos cifras significativas multiplicadas por 10^x (x es la respectiva potencia de 10). Las cifras significativas corresponden al primero y segundo dígitos (empezando por la izquierda) del número de las colonias calculadas.

Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la suspensión 10-1, presentar como número estimado (NE), de la siguiente forma:

NE de UP de mohos y/o levaduras/ cm^3 ó g = $< 1,0 \times 10^1$

Si no hay desarrollo de colonias en las placas sembradas con 1 cm^3 de muestra no diluida (producto original líquido), expresar el resultado de la siguiente manera:

NE de UP de mohos y/o levaduras/ cm^3 = $< 1,0 \times 10^0$

Si todas las placas sembradas presentan más de 150 colonias, calcular el resultado a partir de las placas sembradas con la dilución más alta y expresar de la siguiente manera:

NE de UP de mohos y/o levaduras/ cm^3 o g = > al valor obtenido $\times f$

f = factor de dilución (valor inverso de la dilución de la muestra). Indicar entre paréntesis la dilución utilizada. Este resultado sirve como guía para decidir el número de diluciones que se han de realizar en ensayos posteriores y, la decisión de aceptación o rechazo de una partida de alimentos debe basarse solo en valores N (NTE INEN 1529-10 (1998)).

Precisión de los resultados

Los resultados obtenidos por la misma persona al contar por segunda vez las colonias de una misma placa, no deben variar en más del 5% y del 10% cuando es realizado por otra persona.

Por razones estadísticas, el intervalo de confianza para este método varía, en el 95% de los casos, desde $\pm 16\%$ a $\pm 52\%$. En la práctica, es posible observar variaciones mayores, especialmente entre resultados obtenidos por diferentes analistas (NTE INEN 1529-10 (1998)).

Informe del Ensayo

En el Informe del ensayo indicar la norma de referencia, la temperatura de incubación, los resultados obtenidos y todas las condiciones operativas no especificadas en esta norma o aquellas consideradas como opcionales y los incidentes que puedan haber influenciado en el resultado. Además, se debe incluir

toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra (NTE INEN 1529-10 (1998)).

4.11 MÉTODOS RÁPIDOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS MARCADORES.

Los análisis convencionales de microorganismos marcadores en alimentos resultan en muchos casos largos y requieren gran cantidad de tiempo utilizado para la preparación de los materiales, medios de cultivo y reactivos. Frente a esta realidad es necesario contar con pruebas que arrojen resultados rápidos y permitan tomar decisiones de igual manera ágiles durante un proceso de fabricación o al momento de liberar productos que puedan salir a la venta.

Los métodos rápidos ofrecen la posibilidad de eliminar algunos de los pasos de un análisis convencional permitiendo que estos análisis se conviertan en herramientas eficientes dentro del proceso de fabricación de un alimento.

Estos análisis reúnen las siguientes características facilidad, uniformidad en los procesos y resultados rápidos confiables y seguros.

Corresponden a un grupo de técnicas microbiológicas, bioquímicas, fisiológicas que permiten un aislamiento efectivo, detección caracterización y enumeración más rápida de los microorganismos marcadores.

Entre las principales pruebas rápidas de uso más difundido podemos enumerar:

Pruebas microbiológicas rápidas para la identificación de algunos microorganismos marcadores

4.11.1 PLACAS PETRIFILM

Corresponde a un grupo de placas lista para usarse y diseñadas para ofrecer ahorro en tiempo, incremento en la productividad y eficiencia. Cuenta con una película rehidratante cubierta de nutrientes y agentes gelificantes. (Ver Figura No. 3)

Proporciona resultados en tres pasos:

- Inoculación
- Incubación
- Recuento

(Ver Figura No. 4)

Se encuentra disponible en la mayoría de pruebas microbiológicas de microorganismos marcadores como son aerobios, coliformes, *E. coli*, enterobacterias, prueba de alta sensibilidad de coliformes, recuento rápido de coliformes, mohos y levaduras, entre otros.

4.11.2 PRUEBAS BIOQUÍMICAS RÁPIDAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ALGUNOS MICROORGANISMOS MARCADORES

En los laboratorios de control de alimentos es ampliamente difundido el uso de sistemas miniaturizados API®. Son métodos rápidos que permiten la identificación de microorganismos a través de la realización de diferentes pruebas bioquímicas. Estos sistemas consisten en un dispositivo de plástico con varios microtubos que contienen diferentes medios de cultivo deshidratados o diferentes sustratos de enzimas de acuerdo al tipo de prueba que se requiere montar.

Entre algunas de las pruebas bioquímicas que pueden realizarse con estos sistemas están las pruebas de fermentación de carbohidratos, la determinación de la producción de H₂S, la determinación de la hidrólisis de la gelatina, entre otras.

En el mercado existe una variedad de galerías para ser utilizadas en la identificación de diferentes tipos de microorganismos, por ello aunque todos estos sistemas tienen el mismo fundamento, difieren en el número y tipo de pruebas que permiten realizar, ya que su selección está directamente relacionada con la actividad metabólica del género al que pertenece el microorganismo a identificar.

Entre algunos de los sistemas miniaturizados API® que actualmente se encuentran disponibles en el mercado existen los siguientes para la identificación de microorganismos marcadores:

API® 20E, que permite la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias y de otros bacilos gram negativos. Es una galería conformada por 20 microtubos (Apiweb®, 2010). Las posibilidades de resultados esperados se pueden evidenciar en la Figura 5.

API® 20 NE, que permite la identificación de bacilos gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias como por ejemplo *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, entre otros. Es una galería conformada por 20 microtubos (Apiweb®, 2010). Las posibilidades de resultados esperados se pueden evidenciar en la Figura 6

API® 20 A Con este sistema miniaturizado se pueden montar las pruebas bioquímicas que permiten la identificación de bacterias anaerobias. Es una galería conformada por 20 microtubos. Una vez inoculada la galería con la suspensión del microorganismo a identificar, el sistema requiere ser incubado en una jarra Gaspak® u otro sistema que provea condiciones de anaerobiosis. (Apiweb®, 2010). Las posibilidades de resultados esperados se pueden evidenciar en la Figura 7.

Existen además otros sistemas de pruebas bioquímicas como API® STAPH, para la identificación de microorganismos pertenecientes al género *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Kocuria*. Y otros como: el API® 20 STREP, el API® CAMPY, el API® CORYNE, el API® CANDIDA. (Apiweb®, 2010). (Ver Figuras 8 y 9).

Inoculación de los sistemas miniaturizados

Cada microtubo del sistema debe inocularse con una suspensión en solución salina al 0,85% de un cultivo puro del microorganismo a ser identificado. En algunos casos estos microtubos deben llenarse completamente con la suspensión, mientras que en otros se requiere del añadido de parafina líquida estéril, que proporciona las condiciones anaeróbicas necesarias (Apiweb®, 2010) (Ver Figura 10).

Interpretación de resultados

La presencia de enzimas y/o de productos metabólicos generados durante el periodo de incubación, reaccionan con los sustratos contenidos en los microtubos y desarrollan en los mismos una coloración que puede aparecer en forma espontánea o con el agregado de algún reactivo para su revelado.

La interpretación de los resultados se basa en la observación de las coloraciones desarrolladas, ésta se lleva a cabo mediante la comparación del color obtenido en cada microtubo con el que muestra una carta de colores guía. (Apiweb®, 2010).

De acuerdo a esa interpretación se puede establecer un resultado positivo (+) o negativo (-) (Ver Figura 11).

Después del periodo de incubación se compara con la carta de colores, los resultados obtenidos en cada microtubo. Estos resultados se colocan en la hoja de resultados que suministra el fabricante (ver Figura 11 y 12).

Los datos así obtenidos pueden transformarse en un código de 7 dígitos denominado “perfil numérico” que resulta de la suma de los valores correspondientes a las pruebas positivas asignados previamente en la planilla.

En algunos sistemas miniaturizados se recomienda la realización de pruebas bioquímicas opcionales, que permiten obtener dos dígitos adicionales. El código obtenido se corresponderá a un determinado género o especie de acuerdo a la información contenida en las bases de datos suministradas por el fabricante y que pueden encontrarse disponibles en forma impresa y/o electrónica (Apiweb®, 2010) (Ver Figura 12).

5. CONCLUSIONES

Las técnicas convencionales establecidas por la normativa INEN que se han analizado, corresponden a técnicas de laboratorio bastante descriptivas, que detallan procedimientos utilizados hace más de 20 años y que se mantienen vigentes en la actualidad.

A pesar de que existen en el mercado opciones de pruebas rápidas para la determinación de microorganismos marcadores, el uso de estas pruebas en los laboratorios de control de calidad de los alimentos, se encuentra limitado a acciones emergentes. No existe, salvo algunas excepciones, un uso cotidiano de estas pruebas.

A pesar de que las pruebas rápidas de laboratorio, pueden resultar mucho más eficientes al momento de obtener resultados; probablemente su costo o la poca difusión han relegado su uso.

Como es evidente, la Normativa analizada es una amplia descripción de los procedimientos de laboratorio. El considerar la simplificación de los procedimientos estandarizados en la Normativa, debería ser un reto para las futuras actualizaciones de estas normas. Si bien en ellas se detalla cada paso y procedimiento, resultaría tal vez más efectivo normas simples y claras.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso Nore L. y Poveda Sánchez J. **Estudio Comparativo en Técnicas de Recuento Rápido en el mercado y Placas Petrifilm™ 3M™ para el Análisis de Alimentos.** Disertación (Microbiólogo Industrial), Bogota, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana, 2008, 213 p

Apiweb® [CD-ROM] BioMérieux. 2010

Camacho, A. Giles, M, Ortegón, A. Palao, M. Serrano, B. y Velásquez, O **Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos.** Segunda edición Facultad de Química, UNAM. México. 2009

FAO, Departamento de Pesca. **Aseguramiento de calidad en los productos pesqueros.** [En línea] Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/t1768s/T1768S05.htm> [fecha de consulta: 8 de febrero de 2015]

Guía de Interpretación 3M Petrifilm, Placa [En línea] Disponible en: http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/Petrifilm_guias.pdf. 3M Petrifilm, <http://www.3m.com/cms/mx/es/0-253/kRecrFS/view.html>. [Fecha de consulta: 8 de febrero de 2015]

Goering, R. V, Dockrell, H. M, Zuckerman, M., Roitt. I. M, Chiodini. P. L. **Mims' Medical Microbiology**, 5ta. Ed. Elsevier Ltd. 2013. 565 p.

Internacional Comisión on Microbial Specifications for Food, **of the Internacional Union of Biological Societes.** (ICMSF) 2000. Microorganismos de alimentos: su significado y métodos de enumeración. Segunda edición, ed. Acribia S.A Zaragoza. España

Madigan, M. Martinko, J. y Parker, J. **Biología de los Microorganismos,** 10ma ed. Mc. México: Graw Hill , 2012 1011 p.

Murrar, P. R. Rosenthal, K. S y Pfaller, M. **Microbiología Médica,** 7ma ed. Barcelona, España: Elsevier, Inc.,2014. 872p.

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

NTE INEN 1529-2 (1999) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.
Toma, envío y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
Ecuador

NTE INEN 1529-5 (2006) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.
Determinación de la cantidad de Microorganismos Aerobios Mesófilos.
Ecuador

NTE INEN 1529-6 (1990) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.

Determinación de organismos coliformes por la técnica del número más probable. Ecuador

NTE INEN 1529-8 (1990) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.

Determinación de coliformes fecales y *E. coli*. Ecuador

NTE INEN 1529-10 (1998) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.

Mohos y Levaduras viables. Recuento en placa por siembra de profundidad. Ecuador

NTE INEN 1529-13 (1998) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.

Enterobacteriaceae. Recuento en placa por siembra en profundidad.
Ecuador

NTE INEN 1529-15 (1998) (Spanish): Control microbiológico de los alimentos.

Salmonella. Método de detección. Ecuador

Perdomo, H. Casanova, O. y Ciganda, V. Contaminación de agua subterránea con nitrato y coliformes en el litoral sudeste de Uruguay. **Agrociencia** Vol. 5:10-22 2001

Peñaloza W., Gamboa M., Spore Inactivation by Acid Heat Treatment of Food Materials. **R&D Report**, LA-RD980017: páginas 1-25, 1998.

3M. **Ficha Técnica Petrifilm, Placa Petri film para recuento de *E.coli* y Coliformes.** [En línea] Disponible en: <http://www.com/doc/59438406/FICHA-TECNICA-Petrifilm#scribd> [fecha de consulta: 8 de febrero de 2015]

7. FIGURAS

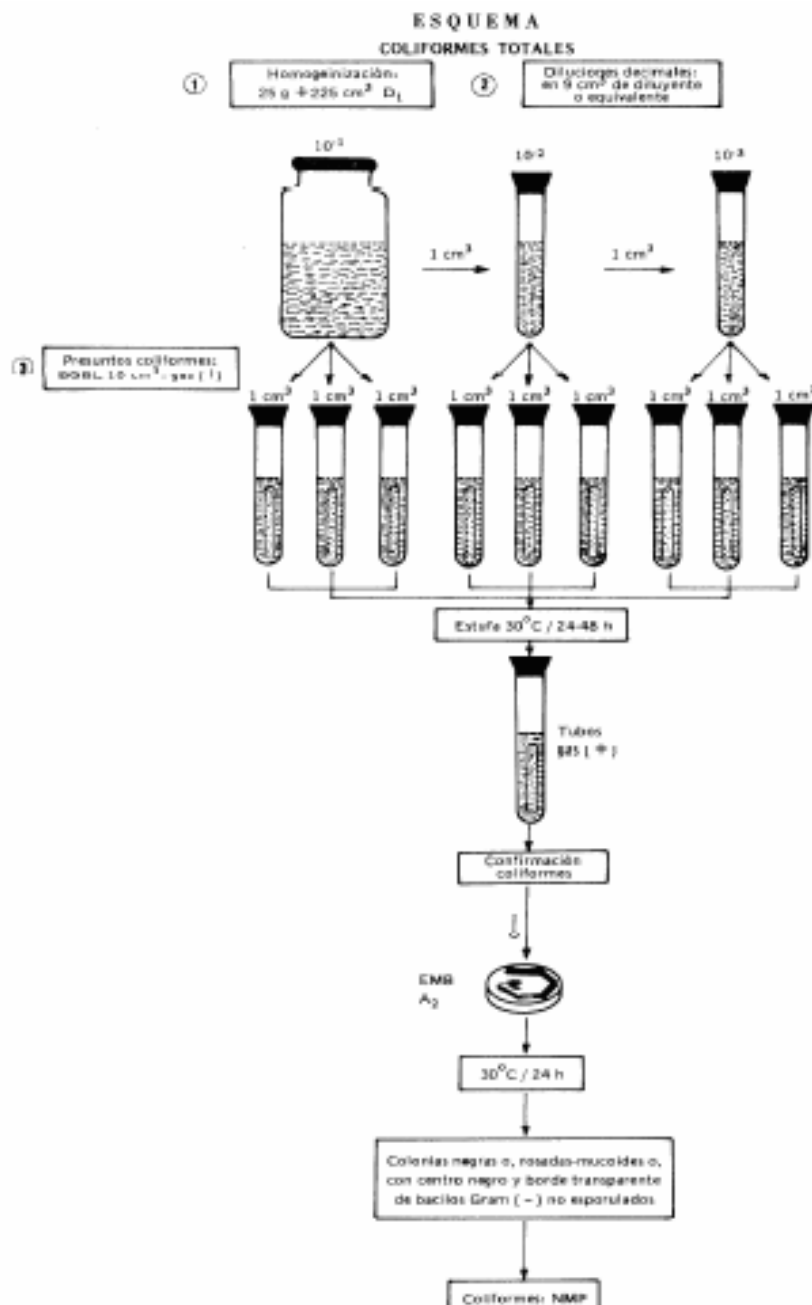


Figura 1. Esquema de Siembra de Coliformes totales

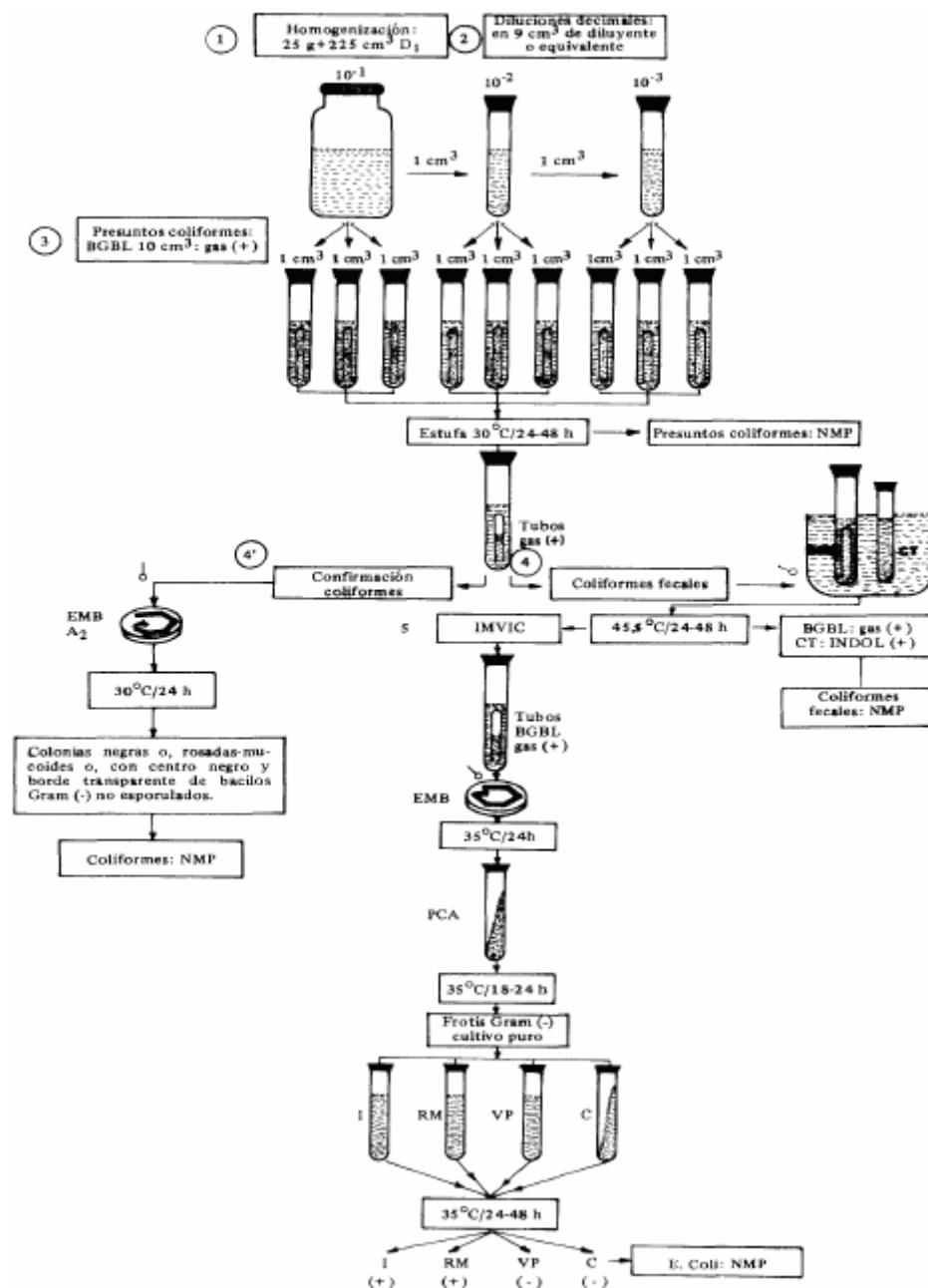


Figura 2. Esquema de siembra coliformes totales, fecales y *E. coli*

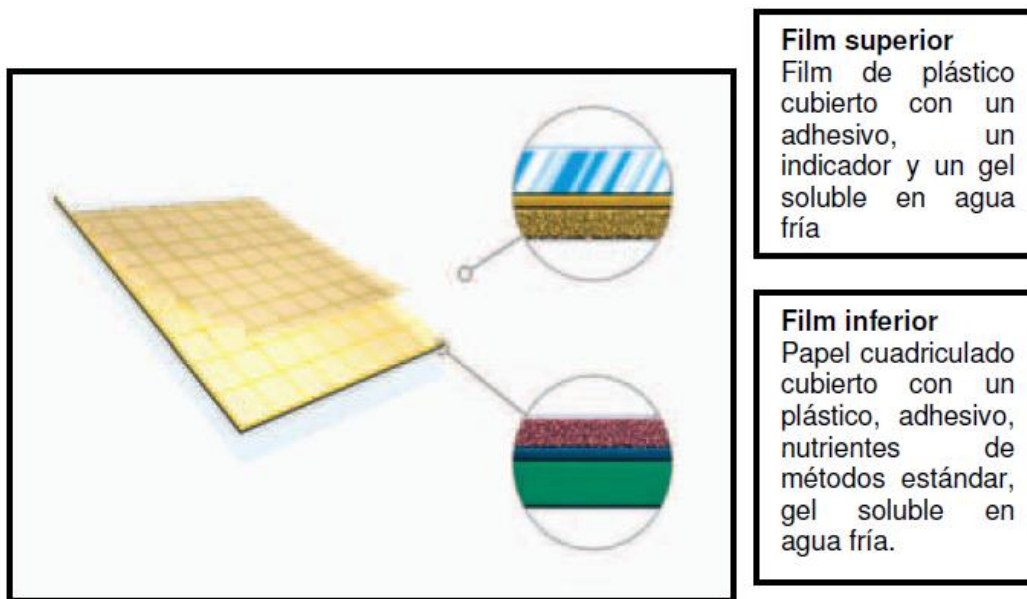
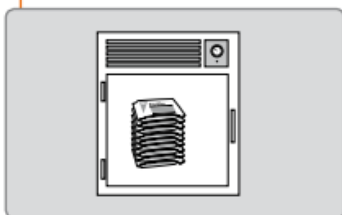


Figura 3. Diseño de una placa de petrifilm (Fuente 3M)

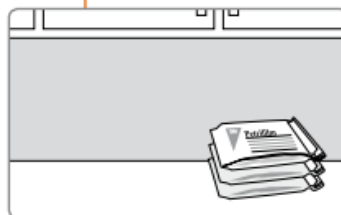
Almacenamiento



1 Refrigerar las bolsas originales sin abrir de las placas Petrifilm. Usar antes de la fecha de caducidad impresa en la bolsa o embalaje.

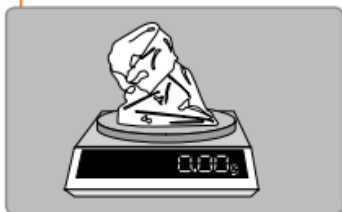


2 Abrir las bolsas con unas tijeras o cúter por el lado que aparece indicado. Retirar de la bolsa únicamente las placas que vayan a usarse. Volver a cerrar la bolsa doblando el lado abierto y asegurando el cierre con una pinza o cinta adhesiva.



3 Mantener las bolsas que se han abierto y vuelto a cerrar a $\leq 21^{\circ}\text{C}$ ($\leq 70^{\circ}\text{F}$). **No refrigerar las bolsas que han sido abiertas.** En este caso, usar las placas Petrifilm no más tarde de 1 mes desde su apertura.

Preparación de Muestra



4 Preparar una dilución de la muestra de alimento 1:10 o superior. Pesar o pipetear la muestra en una bolsa Whirlpac, bolsa Stomacher, botella de dilución o cualquier otro recipiente estéril apropiado.

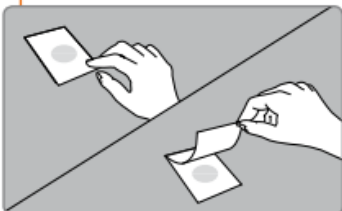


5 Añadir el diluyente apropiado. Usar diluyentes estándar tales como tampón fosfato, agua de peptona, tampón de Butterfield, solución Ringer, peptona-sal, agua destilada y otros. No usar tampones que contengan citrato de sodio o tiosulfato.

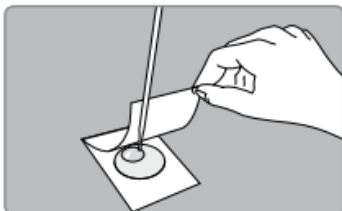


6 Mezclar u homogeneizar la muestra mediante los métodos usuales

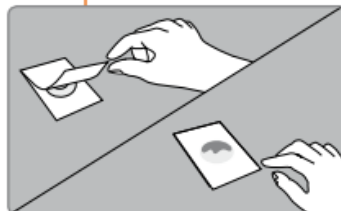
Siembra



7 Disponer la placa Petrifilm en una superficie plana. Levantar el film superior.



8 Pipetear 1 ml de muestra al centro aproximadamente del film inferior. Mantener la pipeta en posición vertical. No tocar el film inferior mientras se pipetea.



9 Soltar el film superior y dejarlo caer. No deslizar el film hacia abajo.

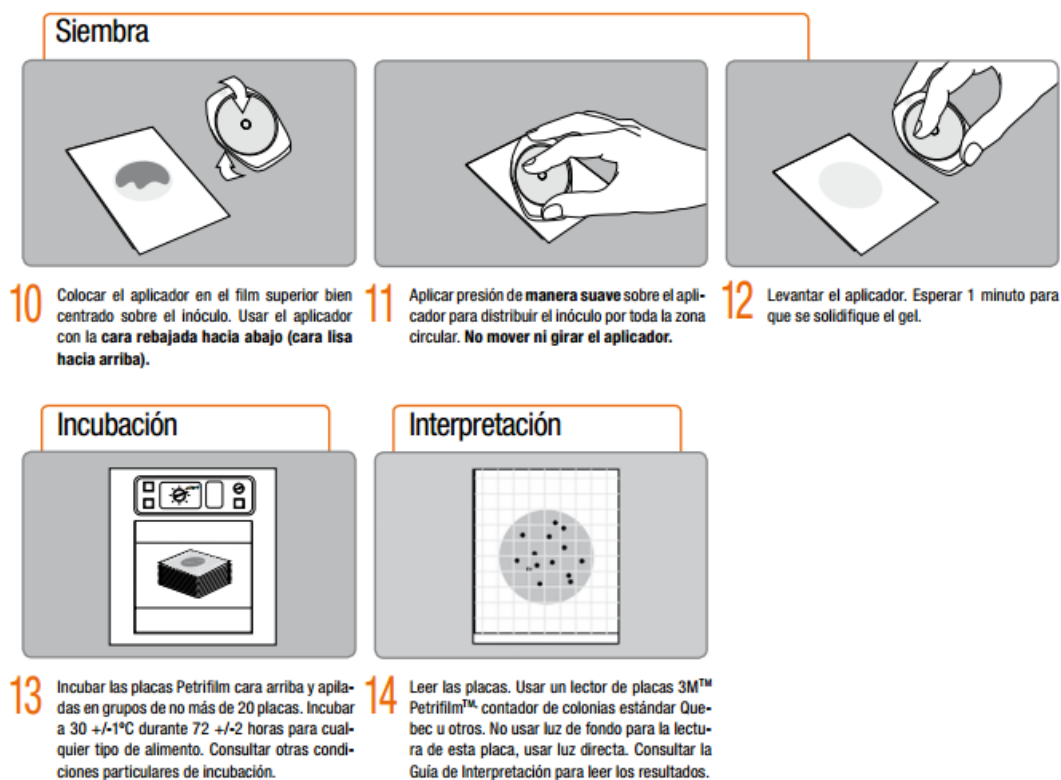


Figura 4. Instrucciones de uso placas Petrifilm (Fuente 3M)



Figura 5. El uso de la galería API® 20E, para la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de las enterobacterias. Las cartas de colores correspondientes representan las posibilidades positiva o negativa.



Figura 6. El uso de la galería API® 20 NE, para la identificación de microorganismos pertenecientes al grupo de bacilos gram negativos no pertenecientes al grupo de las enterobacterias. Las cartas de colores correspondientes representan las posibilidades positiva o negativa.



Figura 7. El uso de la galería API® 20 A, para la identificación de bacterias anaerobias. Las cartas de colores correspondientes representan las posibilidades positiva o negativa.



Figura 8. Posibles resultados en el uso de otras pruebas Api: API® STAPH:

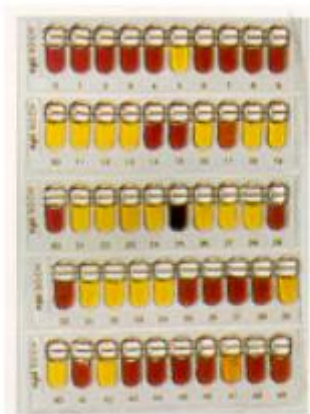


Figura 9. En la figura podemos observar el API® 50 – CHL utilizado para la identificación de *Lactobacilos*. Es una galería conformada por 50 microtubos.



Figura 10. Inoculación de una prueba bioquímica para la identificación de microorganismos.

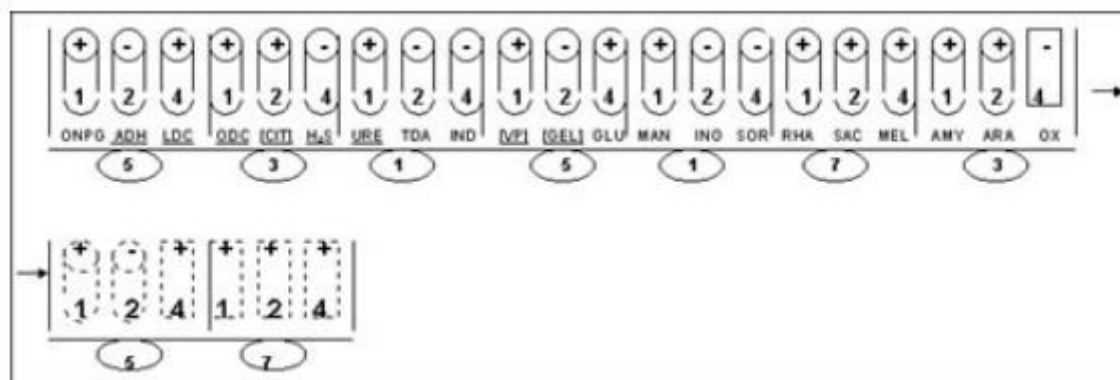


Figura 11. Ejemplo de posibles resultados obtenidos con un sistema miniaturizado API® 20E.

EXCELENTE IDENTIFICACION									
Galería	API 20 E V4.0								
Perfil	5 3 1 5 1 7 3								
Nota									
Taxón significativo		% ID	T	Pruebas en contra					
Enterobacter gergoviae		99.9	0.95						
Taxón siguiente		% ID	T	Pruebas en contra					
Enterobacter aerogenes		0.1	0.11	URE	1%	INO	99%	SOR	99%

Figura 12. Ejemplificación del código 5315173 corresponde a la especie: *Enterobacter gergoviae*.

8. TABLAS

**Tabla No. 1. Índice de NMP de bacterias cuando se utiliza tres
alícuotas de 1 cm³ por dilución. (NTE INEN 1529-6 (1990))**

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION			NMP/ gramo o cm ³	LÍMITES DE CONFIANZA DEL 95%		CATEGORÍA
Dilución 10 ⁻¹	Dilución 10 ⁻²	Dilución 10 ⁻³		Inferior	Superior	
0	0	0	0	-	-	-
0	0	1	3	0,5	9	3
0	1	0	3	0,5	13	2
1	0	0	4	0,5	20	1
1	0	1	7	1	21	3
1	1	0	7	1	23	2
1	1	1	11	3	36	4
1	2	0	11	3	36	3
2	0	0	9	1	36	1
2	0	1	14	3	37	3
2	1	0	15	3	44	2
2	1	1	20	7	89	4
2	2	0	21	4	47	3
2	2	1	28	10	150	4
3	0	0	23	4	120	1
3	0	1	39	7	130	2
3	0	2	64	15	380	4
3	1	0	43	7	210	1
3	1	1	75	14	230	2
3	1	2	120	30	380	3
3	2	0	93	15	380	1
3	2	1	150	30	440	2
3	2	2	210	35	470	3
3	3	0	240	36	1300	1
3	3	1	460	71	2400	1
3	3	2	1100	150	4800	1

**Tabla No. 2 Clasificación de los Coliformes por las pruebas "IMViC"
(NTE INEN 1 529-8 1990-02)**

	Gas en Caldo B.G.V.L 44 -45,5 °C	Prueba de Indol 44 -45,5 °C	MR	VP	Crecimiento en Citrato
E.coli					
Típico (Tipo I)	+	+	+	-	-
Atípico (Tipo II)	-	-	+	-	-
Intermedios					
Típico (Tipo II)	-	+	+	-	+
Atípico (Tipo I)	-	-	+	-	+
Enterobacter aerógenos					
Típico (Tipo I)	-	-	-	+	+
Atípico (Tipo II)	-	+	-	+	+
Esterobacter cloacae					
Irregulares:	-	-	-	+	+
Tipo I	-	-	-	-	-
Tipo II	+	-	-	-	-
Tipo VI	+	-	+	+	+
Irregulares, otros tipos	V*	V*	V*	V*	V*

9. ANEXOS

Anexo 1 Preparación de medios de cultivo para el control de microorganismos marcadores en alimentos (INEN 1529.1.1999)

- Caldo de Triptona. (Agua de dilución)

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 o frascos. Esterilizar 15 minutos a 121 °C.

- Agar para recuento en placa (PCA- Plate Count Agar) (Recuento total)

Composición:

Triptona (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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Agar patata dextrosa. (PDA- Potato Dextrosa Agar) (Recuento de Mohos y Levaduras)

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.

- Agar eosina azul de metileno (EMB) (Coliformes Totales)

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 cm³

Azul de metileno (solución acuosa al 0,25%) 26,0 cm³

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 ± 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.

- Caldo verde brillante bilis lactosa (BGBL Confirmación de Coliformes Totales y *E. coli*)

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 cm³

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.

- Agar Baird Parker (Agar base Estafilococos)

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.6H₂O 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 ± 1 °C.

Preparación de las soluciones

a) Solución de telurito potásico al 1%

Composición:

Telurito potásico 1,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

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.

b) Solución de piruvato sódico al 20%

Composición:

Piruvato sódico 20,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

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 cm³

Agua destilada para completar 100,0 cm³

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 las cáscaras intactas 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.

Preparación del medio completo

Composición:

Medio base 90,0 cm³

Solución de telurito potásico al 1% 1,0 cm³

Solución de piruvato sódico al 20% 5,0 cm³

Emulsión de yema de huevo 5,0 cm³

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.

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

- Caldo RV verde malaquita cloruro magnésico (Rappaport-Vassiliadis)
(Caldo de enriquecimiento para *Salmonella*)

Composición:

Peptona de soya 4,5 g

Cloruro magnésico hexahidratado (MgCl₂.6H₂O) 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 cm³

Agua destilada 1,0 litro

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.

- 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Agar citrato de Simmons

Composición:

Fosfato de magnesio (7H₂O) 0,2 g

Fosfato mono-amónico 1,0 g

Fosfato dipotásico 1,0 g

Citrato sódico (2H₂O) 2,0 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Azul de bromotimol (solución acuosa al 0,2%) 40,0 cm³

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 durante 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dejar enfriar los tubos en posición inclinada.

- 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 cm³

Cristal violeta (solución acuosa al 0,05%) 4,0 cm³

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.

- 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 sustituir la acidificación utilizando soluciones estériles de antibióticos.

- Agar bismuto sulfito (según Wilson y Blair)

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 cm³

Agar 20,0 g

Agua destilada 1,0 litro

Preparación:

Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar, dejar en reposo durante 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

- 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 cm³

Verde brillante (solución acuosa al 0,25%) 5,0 cm³

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 durante 15 minutos, ajustar el pH de manera que después de esterilizado sea 6,9 ± 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

- 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 durante 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.

- 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 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,04g

Púrpura de bromocresol (solución acuosa al 1%) 2,0 cm³

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 durante 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.

- 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 cm³

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 durante 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.

- 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 durante 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.

- 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%) $0,33 \text{ cm}^3$

Rojo neutro (solución alcohólica al 1%) 2,5 cm³

Agar 13,5 g

Agua destilada 1,0 litro

Preparación:

Disolver los componentes en el agua destilada, añadir el agar y dejar en reposo durante 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

- 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 durante 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.

- 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.

- 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 cm³

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 durante 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

- Agar SPS

Medio base

Composición:

Peptona 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.

Preparación de las soluciones

a) Solución de sulfito de sodio al 10%

Composición:

Sulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 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.

Preparación del medio completo:

Composición:

Medio base 1,0 litro

Solución de sulfito de sodio al 10% 5,0 cm³

Solución de sulfato de polimixina B al 0,2% 5,0 cm³

Solución de sulfadiazina sódica al 1,2% 10,0 cm³

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.

- Agar TSN

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 $7,2 \pm 0,2$ y agitando frecuentemente llevar a ebullición hasta su completa disolución.

Esterilizar 15 minutos a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

El medio base, preparado, puede almacenarse por meses.

Preparación de las soluciones:

a) Solución de sulfito de sodio al 10%

Composición:

Sulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 10,0 g

Agua destilada $100,0\text{ cm}^3$

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

Composición:

Sulfato de polimixina B 0,2 g

Agua destilada $100,0\text{ cm}^3$

c) Solución de sulfato de neomicina al 1%

Composición:

Sulfato de neomicina 1,0 g

Agua destilada $100,0\text{ cm}^3$

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

Preparación del medio completo:

Composición:

Medio base 1,0 litro

Solución de sulfito de sodio al 10% 10,0 cm³

Solución de sulfato de polimixina B al 0,2% 10,0 cm³

Solución de sulfato de neomicina al 1% 5,0 cm³

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.

- Agar triptosa sulfito cicloserina (TSC)

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.

- Solución de D-cicloserina

a) Tampón fosfato 0,05 M (pH 8,0)

Composición:

Fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 8,7 g

Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) 0,48 g

Agua destilada 1,0 litro

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 8,0 100,0 cm³

Preparación:

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

Preparación del medio completo:

Composición:

Medio base 1,0 litro

Solución de D-cicloserina al 5% 10,0 cm³

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.

- 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 durante 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.

- 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.

- 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 cm³

Agar 0,8 g

Agua destilada 1,0 litro

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.

- Medio de transporte de Stuart

Composición:

Tioglicolato de sodio 1,0 g

Glicerofosfato de sodio (solución acuosa al 20%) 50,0 cm³

Cloruro de calcio (solución acuosa al 1%) 10,0 cm³

Azul de metileno (solución acuosa al 0,1%) 2,0 cm³

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.

Caldos

- 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

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.

- 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.

- 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 cm³

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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Caldo MR-VP

Composición:

Peptona 7,0 g

D (+) glucosa 5,0 g

Fosfato dipotásico (K_2HPO_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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Caldo selenito cistina

Medio completo**Composición:**

Triptona 5,0 g

Lactosa 4,0 g

Fosfato disódico (Na_2HPO_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

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 cm^3 con agua destilada estéril.

ESTERILIZAR POR FILTRACION.

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 asépticamente 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.

- 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.

- Caldo tetracionato (Muller Kauffmann)

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 cm³

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.

Preparación de soluciones:

a) Solución de tiosulfato de sodio

Composición:

Tiosulfato de sodio 40,7 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Disolver el tiosulfato de sodio en un poco de agua, completar el volumen final.

Esterilizar 20 minutos a 121 °C.

b) Solución de yodo

Composición:

Yodo resublimado 20,0 g

Yoduro de potasio 25,0 g

Agua destilada estéril 100,0 cm³

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 cm³

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 cm³

Preparación:

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

Preparación del medio completo:

Composición:

Medio base 900,0 cm³

Solución de tiosulfato de sodio 100,0 cm³

Solución de yodo 20,0 cm³

Solución de verde brillante 2,0 cm³

Solución de bilis 50,0 cm³

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.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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 cm³

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.

- 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 cm³ 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.

Diluyentes y reactivos (INEN 1529.1.1999)

- 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 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos, asépticamente, reajustarlo con una pipeta.

- 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.

- 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.

- 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.

- Agua peptona sal al 5%

Composición:

Peptona 0,1 g

Cloruro de sodio 5,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

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

- Agua peptona sal al 15%

Composición:

Peptona 0,1 g

Cloruro de sodio 15,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

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

- Solución de sacarosa al 20%

Composición:

Sacarosa 20,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

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

- Solución de citrato sódico al 2%

Composición:

Citrato sódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 2,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

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

- Solución de fosfato dipotásico al 2%

Composición:

Fosfato dipotásico 2,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

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 $8,4 \pm 0,1$; para los caseinatos, quesos, quesos procesados y crema ácida, debe ser de $7,5 \pm 0,1$.

- Solución Ringer diluida al $\frac{1}{4}$

Composición:

Cloruro de sodio 2,25 g

Cloruro de potasio 105,0 mg

Cloruro de calcio anhidro 0,06 g

Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 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 $6,9 \pm 0,1$. Distribuir según convenga y esterilizar 15 minutos a 121 °C.

- Diluyente para hisopos de alginato

Composición:

Hexametáfosfato sódico o calgón $[(\text{NaPO}_3)_6]$ 1,0 g

Solución Ringer diluida al $\frac{1}{4}$ 100,0 cm^3

Preparación:

Disolver el hexametáfosfato sódico o calgón en la solución Ringer al $\frac{1}{4}$. 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.

En el comercio existe este reactivo en tabletas, reconstituir según las instrucciones del fabricante.

- 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.

- Solución de ácido clorhídrico 1N

Composición:

Acido clorhídrico ($d = 1,19 \text{ g/cm}^3$) $89,0 \text{ cm}^3$

Agua destilada, cantidad necesaria para 1,0 litro

Preparación:

Llevar a 1 litro con agua destilada.

- Solución de hidróxido de sodio 1N

Composición

Hidróxido de sodio 40,0 g

Agua destilada 1,0 litro

Preparación:

Disolver en el agua destilada.

Reactivos para la prueba de Voges Proskauer (VP)

- Solución alcohólica de α -naftol al 6%

Composición:

α -naftol 6,0 g

Etanol al 96% v/v $100,0 \text{ cm}^3$

Preparación:

Disolver el a-naftol en el etanol

- Solución de hidróxido de potasio al 40%

Composición

Hidróxido de potasio 40,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Disolver el hidróxido de potasio en el agua destilada.

- Solución de creatina al 0,5%

Composición:

Creatina monohidratada 0,5 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Disolver la creatina en el agua.

Reactivo de Kovacs

Composición.

p-Dimetilaminobenzaldehído 5,0 g

Acido clorhídrico ($d = 1,19 \text{ g/cm}^3$) $25,0 \text{ cm}^3$

Alcohol isoamílico $75,0 \text{ cm}^3$

Preparación:

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

Reactivo para β -galactosidasa

- Solución tampón

Composición:

Fosfato monosódico (NaH_2PO_4) 6,9 g

Hidróxido de sodio solución 0,1N $3,0 \text{ cm}^3$

Agua destilada, cantidad necesaria para completar $50,0 \text{ cm}^3$

Preparación:

Disolver el fosfato monosódico en aproximadamente 30 cm^3 de agua. Ajustar el pH a $7,0 \pm 0,1$ con aproximadamente 3 cm^3 de solución de hidróxido de sodio.

Añadir agua hasta completar 50 cm^3 . Almacenar en refrigeración.

- Solución de ONPG

Composición:

o-Nitrofenil β -D-galactopiranosida (ONPG) 80,0 mg

Agua destilada 15,0 cm³

Preparación:

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

- Reactivo completo

Composición:

Solución tampón 5,0 cm³

Solución ONPG 15,0 cm³

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.

- Solución de rojo de metilo

Composición:

Rojo de metilo 0,04 g

Etanol al 95% v/v 60,0 cm³

Agua destilada, cantidad necesaria para completar 100,0 cm³

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.

- Solución de cloruro férrico al 10%

Composición:

Cloruro férrico 10,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Disolver el cloruro férrico en el agua.

- Solución de ácido tartárico al 10%

Composición:

Acido tartárico 10,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Diluir el ácido tartárico y esterilizar por filtración.

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.

Colorantes

- Solución de verde brillante al 1%

Composición:

Verde brillante 1,0 g

Agua destilada estéril 100,0 cm³

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.

- Solución de púrpura de bromocresol al 0,2%

Composición:

Púrpura de bromocresol 0,2 g

Agua destilada estéril 100,0 cm³

Preparación:

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

- Solución de cristal violeta al 1%

Composición:

Cristal violeta o violeta de genciana 1,0 g

Agua destilada estéril 100,0 cm³

Preparación:

Disolver la violeta de genciana en el agua destilada estéril y completar el volumen a 100 cm³. (INEN 1529.1.1999)

- Coloración de Gram Reactivos

Reactivos

Cristal violeta fenicada (según Nicolle)

Composición:

Cristal violeta o violeta de genciana 1,0 g

Etanol al 95% v/v 10,0 cm³

Fenol fundido 2,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

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.

Fucsina fenicada (según Ziehl)**Composición:**

Fucsina básica 1,0 g

Etanol al 95% v/v 10,0 cm³

Fenol fundido 5,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

Seguir las instrucciones indicadas para la preparación de la violeta fenicada.

Diluir 10 veces para la coloración de Gram.

Lugol**Composición:**

Yodo 5,0 g

Yoduro de potasio 10,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

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 cm^3 y guardar en la oscuridad en un frasco ámbar bien cerrado.

Diluir 15 veces para la coloración de Gram.

Alcohol acetona

Composición:

Etanol al 95% v/v $250,0 \text{ cm}^3$

Acetona p.a $250,0 \text{ cm}^3$

Preparación:

Mezclar y guardar en un frasco.

Procedimiento.

Utilizar cultivos con no más de 24 horas de incubación.

Preparar un frotis fino en una lámina limpia y desengrasada.

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.

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

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

Ecurrir el colorante y cubrir durante un minuto con lugol diluido 15 veces Lavar con agua corriente.

Diferenciar con alcohol acetona hasta que los enjuagues sean claros.

Lavar con agua corriente.

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

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.

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.

- Coloración de esporos (Wirtz-Conklin)

Reactivos

Verde malaquita al 5%

Composición:

Verde malaquita 5,0 g

Agua destilada 100,0 cm³

Preparación:

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

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

Procedimiento

Preparar el frotis

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.

Lavar con agua corriente


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

Lavar con agua corriente y secar.

Observar al microscopio con lente de inmersión.

Las esporas se tiñen de verde y los cuerpos bacterianos y detritos, de rojo. (INEN 1529.1.1999)

**Anexo 2 Spore Inactivation by Acid Heat Treatment of Food Materials.
R&D Report, LA-RD980017**

Research & Development	
<small>CONFIDENTIAL This document is the property of the Industrial Property Owner and may not be copied or disclosed to others without proper authorization</small>	
R&D REPORT LA-RD980017 SPORE INACTIVATION BY ACID HEAT TREATMENT OF FOOD MATERIALS	
by: Peñaloza W. (R&D/Quito) Gamboa M. (R&D/Quito)	
Project Ref: LA-003026	
Keywords: MICROBIOLOGY PEPPER BACILLUS MALEIC ACID RAW MATERIALS	SPORE ACETIC ACID LACTIC ACID PROPIONIC ACID
	HURDLE CITRIC ACID FUMARIC ACID HEAT TREATMENT
Distribution: CT-AID, D. Fuerer C-R&D, C. Brimelow R&D/Lausanne R&D/Connecticut B-FS, K. Schreckling B-F, H. Bauer R&D/Bjuv, M. Dagerskog	R&D/QS, J. L. Cordier R&D Bjuv, M. Peters R&D/CT, A. Wang R&D Kempththal, T. Landis R&D Singapore, C. Branscom R&D Quito, Ch. Wahli
<u>BUSINESS IMPACT</u>	
<p>Organic acids are known to possess antimicrobial activity by reducing food pH and interfering with the pH homeostasis of microbial cells. It was found that organic acids when combined with heat could inactivate spores. Fumaric and maleic acids at 0.5% exhibit a significantly higher sporocidal activity against <i>Bacillus</i> spp. spores than lactic, acetic and propionic acids. An effective combination of fumaric acid at 0.5% and 92 °C for 6 minutes inactivated at least 4 log spores/g of beans and 2 log spores/g of black pepper. This kind of treatment could be selectively applied to contaminated raw materials and minimally processed foods or food processing in general to obtain cleaner and more appealing food products.</p>	
R&D/Quito-WP/MG/xc-05.06.98	

OBJECTIVE**Objective of the project:**

Development of the concepts in minimally processed foods (MPF) to obtain shelf stable products.

Objective of the work:

Develop innovative procedures to inactivate bacterial spores in food materials and spices.

METHODOLOGY, TRIALS, RESULTS

Organic acids at concentrations of 1% and below were tested for their sporocidal activity against *Bacillus* spp. spores. The most appropriate combination of organic acid with heat treatment was evaluated in food materials such as beans and black pepper kernels. Colony counts on PCA plates of spores (LI-00 718-1) before and after the acid heat treatment were used to determine survival and inactivation of spores.

CONCLUSIONS

- Organic acids exhibit sporocidal activity in the following order: maleic or fumaric > lactic > citric or acetic > propionic.
- The most resistant strains of several *Bacillus* spp. to acid heat treatments were identified: *B. cereus* 147, *B. subtilis* 232, *B. licheniformis* 9375. They should be the test organisms for challenge testing in MPF development.
- To reduce spore loads in food materials, an adequate combination of treatment could be fumaric acid at 0.5%, with 92 °C for 6 minutes. This would inactivate at least 4-log spores/g and 2-log spores/g depending on the type of material.
This treatment could be best applied in washing procedures of smooth surface materials such as beans.

ACTIONS

Distribution of this information to R&D Centers that have been involved in MPF projects.

1. INTRODUCTION

For most processed food, heat treatment is aimed at inactivating microorganisms of raw materials. The final product is not necessarily sterile. In shelf stable foods processed by the formerly known multi-hurdle technology and presently minimally processed food, the growth of surviving microorganisms is inhibited by the combination of factors such as water activity, pH, and antimicrobial compounds [12, 13, 15].

Inactivation of at least part of the microbial population and growth inhibition has led to an increased delay of spoilage of meat carcass. To this purpose the meat industry applies acid sprays to carcass [3]. Organic acids have also been used in combination with heat to prevent growth of food poisoning and spoilage microorganisms [2], to evaluate the effect on germination and outgrowth of spores of *B. coagulans* [10], and to assess the antibotulinal potential in a cured turkey product and model systems [8].

Bacillus cereus and *B. subtilis* and *Bacillus* in general are important amongst the spore-forming bacteria in minimally processed food [14] due to their tolerance to low A_w (0.91) and pH (4.3). Lower target values cannot always be achieved in some MPF recipes since product acceptability may be compromised due to acid taste [1].

Surviving microorganisms in MPF models are mostly spores and remain stable for over a year [12, 13, 15]. When heavily contaminated ingredients such as black pepper are used, spore levels in the final product can be as high as 10^4 spores/g. To further reduce such spore counts intensive heat treatments may be necessary, and this will impair the sensory attributes of the product. Thus, if spore counts could be selectively reduced in naturally contaminated raw materials, cleaner and more appealing MPF products could be developed. Thus the objective of this study was to explore the sporicidal activity of organic acids combined with heat treatments to destroy spore populations in food materials. This kind of treatments could be of value to improve e.g., washing procedures, in processing plant materials.

2. METHODOLOGY

The work for this report was conducted following the ISO 9001 quality manual and procedures. The experimental conditions and data were filed in the RC-17 Registro de Calidad of Project LA-003026, trials sopa 45 to sopa 55.

2.1. Strains

The selection of strains included *Bacillus* species involved with food poisoning and or spoilage: *B. cereus* (6 strains), *B. coagulans*, *B. subtilis* (4 strains) and *B. licheniformis* (4 strains) were used. The identity of such strains is shown in Table 1.

2.2. Preparation of spore suspensions

To avoid variations of spore heat resistance due to strain cultivation, sporulation conditions and stock suspension preparation, these were strictly standardised as described by Kurt [6] for spore suspensions of *B. cereus* and *B. subtilis*. However, smaller petri plates (16.5 cm diameter and 2.5 cm height, ca. 420 ml agar per plate) for spore production was used.

Spore suspensions were diluted, when necessary, as to obtain a spore density of 10^8 spores/ml of stock spore suspension (16 stock spore suspensions of individual strains). In addition, 3 stock spore suspensions of cocktails of *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* were obtained by mixing respectively all individual strains of each specie. Furthermore a spore stock suspension of a mix of all strains was included in the group of the stock spore suspensions (19).

2.3. Screening of organic acids and resistant strains

The following organic acids: acetic, citric, fumaric, lactic, maleic and propionic were used to prepare solutions at 1% w/v in distilled water. Four test tubes containing 10 ml of each organic acid were assigned to each spore suspension.

The test tubes with the acid solutions and phosphate buffer were heated to 82-85 °C and maintained for 10 minutes. Inoculation was carried out by dispensing 0.1 ml of the stock spore suspension to each tube. Four tubes were simultaneously inoculated by using a multi-channel pipetter. Inoculated tubes were maintained at 82-85 °C for 10 minutes. At the end of this period, they were transferred to a water bath and then to an ice bath for final cooling till spore count plating (LI method) was performed.

For this part of the study a complete random design was used with 4 replicates and two factorial arrangement, menstruum 6 levels: acetic, citric, fumaric, lactic, maleic and propionic acids, and spore suspension 19 levels (corresponding to individual spore suspension and cocktails). Spore counts were converted to log cfu/ml and the spore population inactivated by the acid heat treatment was calculated by:

Inactivated spores = Log₁₀ residual spores in the DDMEP - Log₁₀ residual spores in each acid.

The statistical package of NCSS60 [5] was utilized to run a GLM for ANOVA and Tukey Kramer multiple comparison test.

2.4. Optimization of fumaric acid heat treatments to inactivate spores

Menstruum composition

Fumaric acid at 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1% w/v was used to prepare acid solutions with distilled water. The solutions were distributed in test tubes (10 ml/tube). They were heated in a water bath to the target temperature and maintained for at least 10 minutes for temperature equilibration before inoculation.

General spore cocktail

The general spore cocktail composed of the 16 individual strains, was used to inoculate the menstruum to a target of 10⁹ spores/ml of menstruum. As previously described, 0.1 ml of the general spore cocktail (10⁸ spores/ml) was added to each test tube.

Heat treatment

Feasible raw material treatment should be in the range of pasteurization to boiling temperatures. Thus, the selected levels for temperature treatments were 72, 82 and 92 °C (boiling temperature in Cumbayá, 2460 m altitude). Time of heat treatment was as short as possible to minimise water absorption. Thus treatment time varied from 0 to 12 minutes.

Once the temperature of the menstruum in the test tubes was equilibrated to the target temperature for 10 minutes, multiple inoculations (four at a time) were performed. Four units or test tubes were withdrawn at each sampling time. Tubes, after the heat treatment, were immediately cooled, as described above, before spore count plating.

A complete random design of three factors with four replicates was used:

Fumaric acid concentration at 5 levels: 0, 0.25, 0.5, 0.75 and 1% w/v,

Temperature at 3 levels: 72, 82 and 92 °C,

Time at 4 levels: 0, 4, 8 and 12 minutes.

The counts of the spore population surviving the acid heat treatment were converted to log₁₀ cfu/ml before submitting to analysis of variance (ANOVA) and multiple regression using the GLM procedure of SAS [17] with $\alpha=0.05$.

2.4. Verification of spore inactivation in food materials

Three raw food materials where spore inactivation may have a good potential were selected: black and red beans, and black pepper kernels. Since counts of indigenous spore level was assumed to vary with the material, inoculations with a highly resistant spore cocktail were performed on a portion of each material.

The selected spore stock suspension of highly resistant strain cocktail was composed of *B. cereus* 147, *B. subtilis* 232, *B. licheniformis* 9375, and *B. coagulans* 7050.

The food material was placed in individual plastic bags and sprayed with 10 ml of highly resistant spore cocktail per kg of food material. Finally the food material was thoroughly mixed to achieve a uniform spore distribution. Food material was then exposed to ambient drying.

An effective acid heat treatment, identified in the section 3.2, was the combination of fumaric acid at 0.5%, with 92 °C for 6 minutes. Its efficacy was compared to an identical treatment using tap water as menstruum.

The procedure was as follows: a pre-weighed 100 g of material was added when 500 ml of menstruum was brought and maintained to the boil (92 °C). The 6 minute simmering was counted from the time the material was added to the menstruum. At the end of this period, a sample of the menstruum was taken for spore count and immediately cooled in a water bath. As soon as the menstruum sample was taken, pulses were quantitatively separated from the menstruum. A known sample of food material was taken for spore counts. Respective weights (*i.e.*, menstruum and food material) were recorded for spore calculations.

The complete random experimental design included the following factors with five replicates for each combination:

Menstruum 2 levels: acid and tap water.

Contamination 2 levels: natural and inoculated,

Food material 3 levels: black beans, red beans and black pepper.

Spore counts were converted as previously describe to log cfu/g or ml, and to calculate the spore population inactivated in each treatment the spore counts in the mix material-menstruum before the heat treatment and the spore counts in the treated material and residual menstruum were taken into consideration.

The analysis of variance followed by Tukey-Kramer multiple-comparison test was performed as described above using the GLM procedure of NCSS60 [5].

3. RESULTS

3.1. Screening of organic acids and resistant strains

Stock spore suspensions (100 µl) were dosified to each 10 ml of pre-heated menstrua to obtain spore levels of 10^6 cfu/ml (Buffer column on Table 1). For few strains the spore counts after the heat treatment in the buffer was in the range of 3-4 log cfu/ml, which is unexpectedly below the 10^6 cfu/ml target. This could be due mostly to spore density in the stock spore suspension rather than to extremely low heat resistance of those strains.

Table 1. Means of log cfu/ml of spore populations surviving thermal treatment between 82-85 °C x 10 minutes in several organic acid solutions at 1% w/v. Plate counts were converted to log cfu/ml.

Spore suspension	BUFFER	ACETIC	LACTIC	FUMARIC	LACTIC	MALIC	PROPIONIC	MEAN
<i>B. cereus</i> cocktail	5.444	3.050	4.252	2.157	2.814	2.140	3.373	3.323
<i>B. cereus</i> 147	3.532	2.455	2.093	1.075	2.868	1.000	3.028	2.294
<i>B. cereus</i> 202	5.892	2.954	4.244	1.287	2.509	1.195	4.098	3.170
<i>B. cereus</i> 2176A	8.211	3.110	2.870	1.119	3.040	1.000	3.216	2.938
<i>B. cereus</i> A28	5.138	4.380	4.650	2.017	2.647	1.701	4.418	3.564
<i>B. cereus</i> A36	4.033	1.908	2.905	1.195	1.571	1.000	2.331	2.134
<i>B. cereus</i> LR04	4.341	2.130	2.308	1.075	2.378	1.000	2.826	2.294
<i>B. coagulans</i> 7050	6.089	2.939	4.362	1.858	2.950	1.581	3.078	3.262
<i>B. subtilis</i> cocktail	6.357	5.114	3.248	2.008	2.757	1.533	3.757	3.539
<i>B. subtilis</i> 15	6.483	3.727	3.206	2.012	3.196	1.119	5.074	3.542
<i>B. subtilis</i> 41	6.532	2.796	2.615	1.433	3.008	1.726	3.020	3.019
<i>B. subtilis</i> LR03	6.598	5.464	3.594	3.047	2.980	2.174	5.718	4.222
<i>B. subtilis</i> 212	4.588	3.054	4.870	1.957	2.878	1.119	4.247	3.073
<i>B. licheniformis</i> cocktail	4.577	3.625	3.490	2.460	4.197	2.738	4.430	3.645
<i>B. licheniformis</i> 3	6.410	3.392	3.621	2.781	3.089	2.662	3.813	3.681
<i>B. licheniformis</i> 7224	5.840	2.547	1.922	2.055	2.800	1.424	2.810	2.772
<i>B. licheniformis</i> 9375	5.451	3.466	3.057	2.252	3.262	2.760	4.218	3.486
<i>B. licheniformis</i> LR01	5.200	1.242	1.226	1.075	1.653	1.231	1.520	1.878
General cocktail	6.272	3.815	3.642	1.923	2.699	2.250	4.060	3.523
Mean	5.523	3.221	3.242	1.800	2.804	1.650	3.633	3.125

Any 0-count plates was assigned a value of 10 cfu/ml based on the lowest limit of detection for the plate count method. Means for each combination of spore suspension and menstruum were calculated from 4 replicates. A high number such as 5.523 indicates that spore inactivation was negligible, on the contrary 1.650 correspond to a drastic and effective spore destruction.

The sporocidal activity of the organic acids tested at this stage varied greatly. According to their inactivating effect they could be organised in decreasing order as follows:

Maleic > Fumaric > Lactic > Acetic > Citric > Propionic

Within specie, the strains varied greatly in their resistance to acid thermal treatments (Table 1). Those strains having a residual spore population higher than the general mean (3.125) could be considered as truly resistant strains to acid heat treatments.

Since the surviving spore density in the buffer of some strains after the heat treatment was lower than the target level, a more precise estimation of the spore population destroyed during the acid heat treatments was calculated by:

Inactivated spores = Log_{10} residual spores in the buffer - Log_{10} residual spores in each acid.

It was found that significant differences ($P < 0.0000$) on inactivated spore populations varied with the strain and the organic acid used. The interaction strain-acid was also significant.

Several groups of organic acids could be identified based on their spore-inactivating effect (Figure 1). Fumaric and maleic acids had the highest and similar inactivating effect, followed by lactic acid. Another group was formed by citric and acetic acid, and finally propionic acid had the weakest spore-inactivating effect.



Figure 1. Means of log_{10} cfu/ml of spores inactivated during the acid thermal treatment and grouped by the Tukey-Kramer multiple comparison test. Diamonds

The acid heat resistance of the strains tested varied greatly as shown in the Table 2, where the most resistant strains within each specie can be identified: *B. cereus* 147, *B. subtilis* 232, *B. licheniformis* 9375. The cocktail of *B. licheniformis* had the highest heat resistance. In fact *B. licheniformis* is frequently involved in spoilage of canned vegetables [11]. In this study, heat resistance was strain dependent and not specie dependent (Table 2).

Table 2. Grouping of spore suspensions according to their resistance to acid thermal treatments. The lower the mean value the more resistant the spore suspension.

Strain	Mean	Grouping by the Tukey-Kramer test
<i>B. licheniformis</i> cocktail	1.087	A B
<i>B. cereus</i> 147	1.444	A B C D
<i>B. subtilis</i> 232	1.765	B C D E
<i>B. cereus</i> A28	1.834	C D E F
<i>B. cereus</i> A36	2.215	C D E F G
<i>B. licheniformis</i> 9375	2.282	D E F G
<i>B. cereus</i> LR04	2.388	E F G H
<i>B. cereus</i> mix	2.473	E F G H
<i>B. subtilis</i> LR03	2.772	G H I
<i>B. cereus</i> 202	3.176	H I J K
<i>B. licheniformis</i> 3	3.183	H I J K
General cocktail	3.208	H I J K
<i>B. coagulans</i> 7050	3.275	I J K
<i>B. subtilis</i> cocktail	3.289	I J K
<i>B. subtilis</i> 15	3.408	I J K L
<i>B. licheniformis</i> 7224	3.579	I J K L M
<i>B. cereus</i> 21768	3.818	L M N
<i>B. licheniformis</i> LR01	3.876	L M N
<i>B. subtilis</i> 41	4.099	L M N

Acid sporocidal effect varied within strain (significant acid-strain interaction). Figure 2 shows the profile of the more resistant strains to organic acids (excluding propionic acid). The same colour denotes no difference. Furthermore, it can be seen that most strain-acid interactions occur with acetic, citric and lactic acid. It is interesting to note that maleic and fumaric acids have an identical pattern (highest) of spore inactivation. This fact may be possibly related to their similar molecular structure. The organic acid with the highest spore-inactivating effect for each strain can be

identified directly from Figure 2. For example to control spoilage of canned vegetables by *B. licheniformis* lactic acid would be of little value compared to the rest of the acids.

The general cocktail, representing a naturally contaminated raw material, showed an average resistance to the various organic acids. Fumaric acid being equally effective to maleic acid, and moreover cheaper and industrially available could be the organic acid of choice to treat contaminated raw materials. Its use has already being approved by the FDA for ground beef patties and carcass [16].

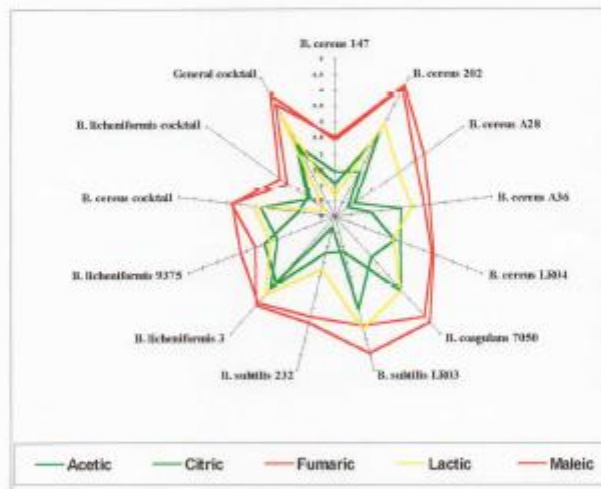


Figure 2. Profile of spore inactivation by several organic acids. The further the distance to the center the higher the inactivated spore population (\log_{10} cfu/ml).

3.2. Optimisation of thermal treatments in fumaric acid to inactivate spores

The spore counts of the general cocktail after the thermal treatments at several concentrations of fumaric acid (0-1%) were converted to \log_{10} cfu/ml and plotted as shown in the Figure 3

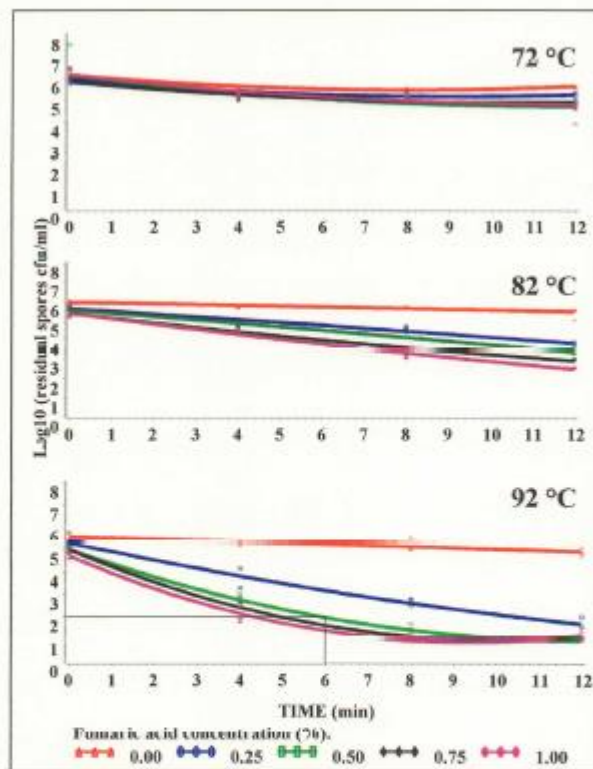


Figure 3. Time-course of spore population of the general cocktail during heat treatments at temperatures shown and at several fumaric acid concentrations.

Multiple-regression analysis showed that the log₁₀ cfu/ml of residual spores was significantly ($P < 0.0001$, $r^2 = 0.744$) related to acid concentration (0-1%), temperature (72-92 °C) and time (0-12 minutes) of the thermal treatments. Each factor had a significant effect ($P < 0.0001$) on the residual spore population as summarised in the

$$\text{Log}_{10}(\text{Spores}) = 15.423 - 1.657 \times (\text{Fumaric}) - 0.112 \times (\text{Temperature}) - 0.169 \times (\text{Time})$$

Where,

Spores: Spore population after the heat treatment [cfu/ml],

Fumaric: Fumaric acid [% w/v],

Temperature: Heating temperature [°C],

Time: Heating time [minutes].

Spore inactivation at 72 °C was minimal, moreover, acid concentration did not have a significant inactivating effect (lower than 1 log cycle even at 1% fumaric acid after 12 minutes, Figure 3). At a higher temperature e.g., 82 °C the spore inactivation was strongly dependent to acid concentration. Even at a low acid level, such as 0.25%, spore inactivation was clearly noticed. This spore inactivating effect was more drastic at 92 °C. It is interesting to note that at the highest temperature (92 °C), acid concentrations above 0.5% showed similar spore inactivating effect (Figure 3 at approximately 4 log cycles).

The results obtained suggest that effective raw material treatments should preferably use high temperatures e.g. 92 °C. Once the heating temperature has been selected, acid concentration and heating time could be adjusted accordingly. As an example, for altitudes similar to Cumbayá (2460 m, boiling temperature 92 °C), using the data on Figure 3, the most appropriate treatment to reduce the spore load of raw materials would be a 6 minute treatment at 92 °C in a solution of 0.5% fumaric acid.

3.3. Application of spore inactivation to food raw materials

Acid thermal treatments of black pepper kernels and two types of beans were compared to identical thermal treatments in tap water. A summary of the spore counts after the heat treatments is shown in the Table 2.

Beans are less naturally contaminated materials than black pepper. Thus inoculation with a spore cocktail containing the most resistant strains of each species (*B. subtilis* 232, *B. cereus* A28, *B. licheniformis* 9375 and *B. coagulans* 7050) was used to equalise the spore load before the thermal treatment of the inoculated block.

Table 3. Spore counts log₁₀ cfu/ml before and after the thermal treatments of selected raw material.

	Naturally contaminated material			Inoculated material		
	Black pepper	Black beans	Red beans	Black pepper	Black beans	Red beans
Before treatment	7.14 ± 0.20	3.46 ± 0.86	3.60 ± 0.82	7.60 ± 0.40	6.38 ± 0.28	6.60 ± 0.27
After treatment in water	6.33 ± 0.41	1.83 ± 0.16	2.37 ± 1.06	6.59 ± 0.56	6.12 ± 0.32	5.50 ± 1.00
After treatment in acid	4.97 ± 0.33	0.78 ± 0.07	1.33 ± 0.53	5.24 ± 0.33	1.02 ± 0.30	1.60 ± 0.35

Means of log₁₀ cfu/g ± standard deviation of 5 replicates for each combination of thermal treatment at 92 °C for 6 minutes. A solution of fumaric acid at 0.5% w/v of tap water was used for the acid thermal treatments.

The thermal treatments in fumaric acid decreased drastically the spore counts of the beans to approximately the detection limit of 10 cfu/g. On the contrary, the surviving spore population of the black pepper was as high as 10⁵ cfu/g. These results are discussed in detail below.

Since menstruum and pulses are not homogeneous, spore counts were performed on the menstruum and material after the heat treatment. This data and the initial spore counts of the pulses were taken into account to calculate the population of spores truly destroyed by the heat treatment. A portion of the residual spores was detected in the menstruum. The data of the spore population destroyed during the heat treatment was converted to log₁₀ cfu/g and submitted to statistical analysis.

It was found that the type of contamination (natural vs inoculation) did not significantly affect ($P < 0.167$) the spore population destroyed by the heat treatment. The contamination*raw material interaction was not significant ($P < 0.211$). Their association can be seen in Figure 4. All other factors (raw material, menstruum and their combinations) had a significant effect ($P < 0.0000$).

The type of menstruum had the strongest effect on inactivation of spores (Figure 5). Tap water containing 0.5% of fumaric acid killed about 4 log cycles of the spore population of beans and about 2 log of spores in the black pepper. Tap water was much less effective in destroying spores (less than 1 log in all materials).

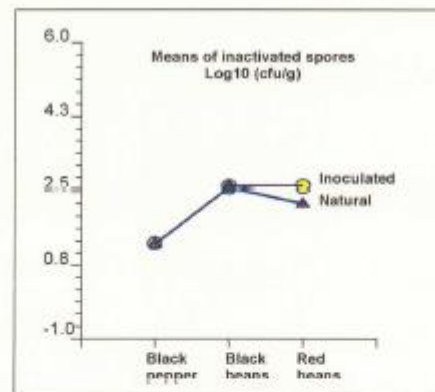


Figure 4. Spore population inactivated during the thermal treatment at 92 °C for 6 minutes of contaminated raw materials (indigenous vs spore inoculation).

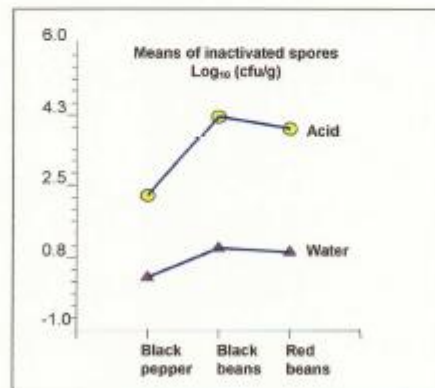


Figure 5. Spore population inactivated during the thermal treatment at 92 °C for 6 minutes in tap water and 0.5% fumaric acid solution.

One important interaction was the combination menstruum-contamination. As shown in the Figure 6, it appears that inoculated spores (cocktail of resistant strains) are destroyed more than indigenous spores by the acid thermal treatment. In water the indigenous spores are more heat sensitive thus the observed interaction.

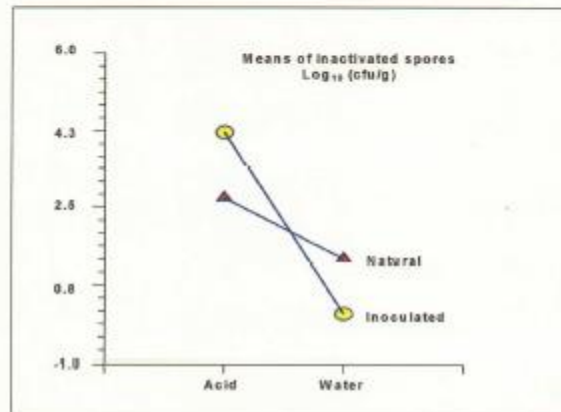


Figure 6. Indigenous and inoculated spores inactivated in raw materials subjected to thermal treatment (92 °C x 6 minutes) in water and 0.5% fumaric acid solution.

To clearly identify the interaction previously described, the data of the inactivated spore population of each type of raw material was plotted (Figure 7 for black pepper, and Figure 8 for beans)

In black pepper kernels with acidic menstruum, the spores inoculated are more resistant to the thermal treatment than the pepper indigenous spores (Figure 7). Whereas in water the indigenous spores are more resistant to thermal treatments than inoculated spores (Figure 7). In both beans: black and red, the indigenous spores proved to be more resistant to the thermal treatments in the fumaric acid solution than the inoculated spore cocktail (Figure 8).

Such behaviour can be due to the different strains prevailing in beans and black pepper. Although, no attempt was made to isolate and compare the thermal resistance of the raw material indigenous spore-forming bacteria strains.

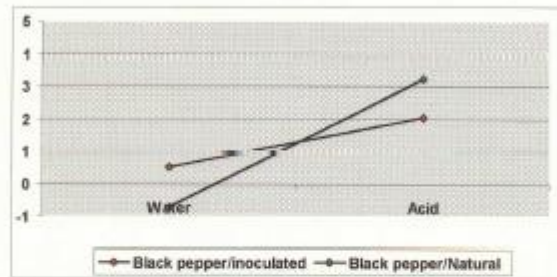


Figure 7. Log10 cfu/g of spore inactivation after thermal treatments (92 °C x 6 minutes) of black pepper in tap water and 0.5% fumaric acid solution.

Note that the thermal treatment using water as the menstruum has a negligible spore inactivating effect, whereas the same treatment in fumaric acid at 0.5% inactivates 2-3 log of spores on the black pepper kernels (Figure 7).

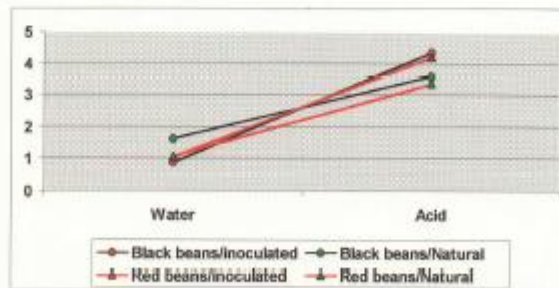


Figure 8. Log10 cfu/g of spore inactivation after thermal treatments (92 °C x 6 minutes) of beans in tap water and 0.5% fumaric acid solution.

In Figure 8 spore destruction is about 1 log in water. Whereas in the fumaric acid solution spore inactivation is roughly about 4 logs, which is very surprising for mild heat treatments such as 92 °C for 6 minutes.

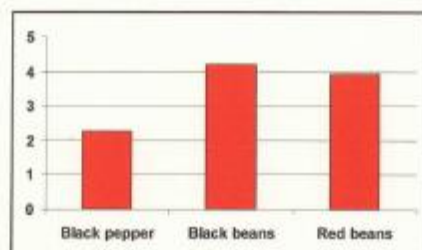


Figure 9. Log₁₀ cfu/ml of spore population inactivated during the thermal treatment at 92 °C for 6 minutes of raw materials in 0.5% fumaric acid solution.

In Figure 9, the spore inactivation was significantly higher in both black and red beans compared to black pepper for both naturally contaminated and spore inoculated materials.

Since beans and pepper differ in their composition, it seems reasonable to assume that extracts (material released to the menstruum) of beans and pepper may interfere differently with the antimicrobial activity of fumaric acid. To evaluate the effect of the extract, the extracts from the 92 °C 6 minutes in 0.5% fumaric acid were collected and further boiled for 15 minutes to kill all residual spores. These extracts from each material were cooled to room temperature and inoculated with the spore cocktail of resistant strains. Spore counts were determined during the 12 minute thermal treatment of the inoculated extracts. The profile of the spore counts is shown in Figure 10.

Spore level after inoculation was over 10^8 cfu/ml. It decreased gradually in both beans and pepper extracts to about the detection limit as a function of simmering time from 0 to 12 minutes. Thus, no significant difference was due to the type of extract.

The large difference of the sporicidal effect of fumaric acid on beans and pepper (Figure 9) could possibly be explained by the physical structure and surface of the materials. Beans have a smooth surface, therefore microorganism may be in direct contact to the antimicrobial activity of the heating menstruum, as spores in the extracts (Figure 10). Whereas pepper has a rough ridged surface. Moreover, in a

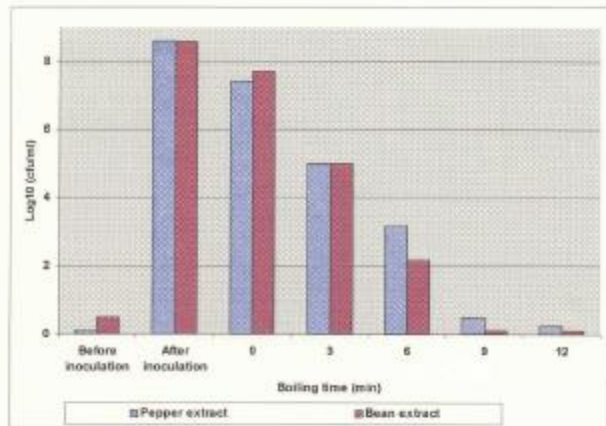


Figure 10. Spore count profile of inoculated acid extracts of beans and pepper during heat treatment at 92 °C.

small portion of pepper grains (probably unripened), there was free spaces between the seed coat and the kernel. Spores harboured in those spaces and seed coat fissures might have been protected from the direct contact with the acid menstruum. Under such condition survival of spores is increased, ruling out an increase of thermal resistance of spores in pepper. Therefore, surface or structure of the raw material seem to be a key aspect for ensuring direct contact of microorganisms with antimicrobials during thermal treatments.

The data shown in Figure 10 also suggests that increasing the heat treatment to about 9 minutes, spore counts can be further decreased to the detection limit (approximately an 8 log spore inactivation).

Acid thermal treatments of raw materials would lead to a slight pH reduction, as shown in Table 4, for the combination tested in this study: fumaric acid solution and 92 °C for 6 minutes.

Table 4. Variation of pH after the thermal treatment of raw materials to inactivate spores.

	Tap water	0.5% fumaric acid
Black pepper	7.6	5.2
Beans	6.6	5.4
Residual menstruum	8.0	2.8

In MPF products, black pepper can be a minor ingredient, thus its pH reduction may not affect the taste of the final product. However, contaminated pepper contributes largely to the final microbial counts of MPF products.

It is not known if the slight acidification of beans may impair their taste for some applications e.g. chili with beans. In the manufacture of canned beans for example, washing is an initial processing step. To reduce effectively the microbial load of beans and minimise their acidification, the thermal treatment with fumaric acid would be best followed by a rinse with tap water. Rinse with tap water may be omitted for slightly acid MPF products.

4. DISCUSSION

The combination of organic acids such as acetic, lactic and citric with heat treatments (65 °C 60 minutes) has not been particularly effective in inactivating *Bacillus* spp. spores, although the acids tested at the level of 0.5% were effective in retarding growth [2], which was assumed to be of value for "cook-chill" foods that would suffer from quality deterioration at higher temperatures.

Recently, organic acids including citric, lactic, propionic, acetic, and fumaric acids have been found useful for treatments of beef carcass and patties to reduce growth of several groups of microorganisms such as aerobic psychrotrophes and coliforms [16], *E. coli*, *L. innocua* and *C. sporogenes* [3], and meat spoilage [9].

The effectiveness of citric and lactic acid varied with the intensity of heat treatments to prevent growth of *B. coagulans* spores. Citric was more effective at low heat treatment, whereas lactic was more effective at high heat treatments [10].

On a weight basis, the growth inhibitory activity of acetic acid ranked first followed by propionic, lactic and citric acid on meat spoilage bacteria [9]. In the first part of this study, fumaric and maleic acids were the most effective sporocides against several species of *Bacillus*, followed by lactic, citric, acetic and propionic acids. In fact fumaric acid has been found to be an effective microbial growth inhibitor in meat [16]. Maleic acid has been tested as a sporocide against proteolytic *C. botulinum* spores [8].

The profile of the strain resistance to acidic (1% w/v) thermal treatments (82-85 °C 10 minutes) varied for each organic acid (Figure 2). The profile corresponding to fumaric and maleic acid was alike, which may indicate that sporocidal effect may be linked to the molecular structure. Maleic acid is the *cis* isomer of fumaric acid. They are unique four-carbon unsaturated dicarboxylic acids, and as such are naturally occurring compounds in plants, fruits and fermented foods [8, 16].

The order of efficiency of organic acids as antimicrobials is contradictory. Acetic, propionic, lactic and citric, in the stated order, inhibited growth of meat spoilage

bacteria [9]. Lactic was more effective than citric acid to prevent growth of *B. coagulans* treated at high temperatures 100 °C over 3 minutes [10]. Acetic acid was found to be the most and citric the least effective acid in growth inhibition of a heated spore cocktail of *Bacillus* spp. Fumaric acid treatments resulted in greater reductions in microbial growth than lactic acid treatments [16]. In this report, maleic and fumaric acids were the most effective sporocides, lactic acid ranked second, on a third place citric and acetic acid. Propionic had significantly the lowest sporocidal activity (Figure 1).

It is generally accepted that the so called weak organic acids increase in antimicrobial effectiveness in the order acetic, propionic, sorbic, and benzoic, reflecting their lipophilicity [4]. The undissociated form of these acids is the most lipophilic and therefore most readily permeates the membrane gaining access to the microbial cytoplasm. The undissociated acids tend to dissociate, delivering hydrogen ions that decrease the pH of the cytoplasm to a level that is too low for growth to continue. This mode of action may have a role in vegetative cells, whereas in spores, other mechanisms such as spore demineralisation [7] or interference with dipicolinic acid (DPA) [8] may be active and may explain the difference on the sporocide activity of the organic acids tested.

Acid heating can replace spore-bound calcium and other cations to form the demineralised H-form spores that are heat-sensitive [4]. At the same time, the interference with DPA release due to acid heating is also claimed to reduce spore thermal resistance [7, 8].

The tendency of fumaric acid to increase its efficacy as sporocide with the increasing temperature from 72 to 92°C supports this theory. In Figure 3, note that fumaric acid inactivating effect at 82 °C is proportional with its concentration. At 92 °C fumaric acid concentrations are less important over a minimum level *i.e.*, 0.5%. This does not support the temperature-sensitizing effect on the spore in its dormant state ascribed to maleic acid [8]. It was not possible to confirm the general assumption that low pH sensitizes bacterial spores to heat by overcoming part of the spore passive

homeostatic mechanism [4]. This can be a misleading assumption since resistance of *B. licheniformis* is not affected by acidification (pH 7 to 4) in tomato and asparagus homogenates at 99-121 °C [11].

In food raw materials, such as black pepper and beans, the synergy between mild heating and fumaric acid was confirmed. Spore forms of *Bacillus* were inactivated more effectively in beans, where at least a 4-log reduction was achieved. In black pepper inactivation was about 2-log. The data suggest that spore inactivation is also dependent on the physical structure of the food material where readiness of contact between spores and the antimicrobial factors may be hindered.

In MPF products the residual microbial (spore) load is generally stable in soup bases [12, 13] and pino de carne (meat-containing MPF) [15] at $A_w < 0.95$ and $pH < 5.0$. However, reducing the spore level of some materials and ingredients would enable to increase A_w and pH limits of MPF products. Furthermore less contaminated material would require reduced heat treatment for slightly acidified canned foods.

5. CONCLUSIONS

- The sporocidal activity of organic acids to inactivate spores of several *Bacillus* species that are commonly associated with food poisoning and spoilage was established: maleic or fumaric > lactic > citric or acetic > propionic.
- The most resistant strain to acid heat treatments of each specie was: *B. cereus* 147, *B. subtilis* 232, *B. licheniformis* 9375.
- Fumaric acid having one of the highest sporocidal effect is recommended for its competitive cost and availability.

- An appropriate heat treatment, with use of fumaric acid at 0.5% to inactivate a cocktail of the most resistant strains of *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. coagulans* was the combination of temperature 92 °C and holding time of 6 minutes.
- Acid heat treatments of food materials at the chosen combination (0.5% fumaric acid, 92 °C for 6 minutes) reduced the spore load by 4 log in beans, and by 2 log in black pepper kernels. The lower spore inactivation was deduced to be due to the surface and structure of black pepper kernels by reducing spore contact with the inactivating factors.
- The treatment of raw materials to reduce their spore load could be best implemented in food processing where washing is one of the initial operations.

6. REFERENCES

1. Aguilar, C., Newman, S. and Sánchez, J. 1998. Acceptability screening of minimally processed food (MPF) models with different acidity levels. *R&D Report LA-TR980005*.
2. Banks, J. G., Morgan, S. and Stringer, M. F. 1988. The influence of combination of chemical preservatives on the growth of food poisoning and spoilage microorganisms. *Campden Food & Drink Research Association Technical Memorandum No. 471*.
3. Dorsa, W. J., Cutter, C. N., and Siragusa, G. R. 1997. Effects of acetic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria innocua*, and *Clostridium sporogenes*. *Journal of Food Protection*, **60** (6): 619-624.
4. Gould, G. 1996. Methods of preservation and extension of shelf life. *International Journal of Food Microbiology*, **33**: 51-64.
5. Hintze, J. L. 1996. NCSS 6.0.21. NCSS, Kaysville, Utah, USA.
6. Kurt, E. 1996. Microbiologically challenge testing of aseptic fillers. *R&D Report KR-TR960025*.

7. Marquis, R. E. 1998. Bacterial spores – resistance, dormancy and water status. In *The properties of water in Foods ISOPWF 6*, D. S. Reid (ed). Blackie Academic & Professional, London, pp. 486-504.
8. Miller, A. J., Call, J. E., and Bowles, B. L. 1996. Sporostatic, sporocidal and heat-sensitising action of maleic acid against spores of proteolytic *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Protection*, **59** (2): 115-120.
9. Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, J. P. and Bégin, A. 1997. Inhibitory effect of organic acids upon meat spoilage bacteria. *Journal of Food Protection*, **60** (3): 246-253.
10. Palop, A., Marco, A., Raso, J., Sala, F. J. and Condón, S. 1997. Survival of heated *B. coagulans* spores in a medium acidified with lactic and citric acid. *International Journal of Food Microbiology*, **38**: 25-30.
11. Palop, A., Raso, J., Pagán, R., Condón, S. and Sala, F. J. 1996. Influence of pH on heat resistance of *Bacillus licheniformis* in buffer and homogenised foods. *International Journal of Food Microbiology*, **29**: 1-10.
12. Peñaloza, W. 1995. Microbiological stability of multi-hurdle technology soup base models. *R&D Report LA-TR950005*.
13. Peñaloza, W. 1998. Stability and safety of foodservice soup bases. *R&D Report LA-TR980003*.
14. Peñaloza, W., Reyes, F. & Sáenz, F. 1996. Challenge studies of shelf stable MHT real food models to evaluate their microbiological safety. *R&D Report LA-TR960005*.
15. Peñaloza, W. and Reyes, F. 1997. Stability and safety assessment of Pino de Carne: a meat-containing minimally processed food. *R&D Report LA-TR970004*.
16. Podolack, R. K., Zayas, J. F., Kastner, C. L. y Fung, D. Y. C. 1996. Reduction of bacterial populations on vacuum-packaged ground beef patties with fumaric and lactic acids. *Journal of Food Protection*, **59** (10): 1037-1040.
17. SAS Institute, Inc. 1989. *SAS/STAT Users guide version 6, fourth edition, volume 2*. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina, USA. p. 846.

LABORATORY INSTRUCTIONS USED IN THIS STUDY

LI-00.718-1 Recuento de esporas bacterianas.