

# ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS

METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL

## MICROORGANISMOS INDICADORES

VOLUMEN 3



## **Este manual ha sido preparado por integrantes del Grupo Técnico de Microbiología de la RENALOA**

### **COORDINACIÓN TÉCNICA:**

- Nancy Passalacqua, CEPROCOR. Córdoba
- Josefina Cabrera, INAL - ANMAT

### **REDACCIÓN:**

- María Angélica Díaz. Departamento Laboratorio, Dirección Provincial de Salud Ambiental (DSA), Trelew - Chubut
- María del Pilar Barrio. Departamento Laboratorio, Dirección Provincial de Salud Ambiental (DSA), Trelew - Chubut
- Mariela E. Darré, Dirección de Bromatología - Chaco
- Marcela López. Laboratorio Regional Salud Ambiental, Cinco Saltos - Río Negro
- Mariela Cofre. Laboratorio Regional Salud Ambiental, Villa Regina - Río Negro
- Marina Susana Condorí. Laboratorio de la Dirección de Bromatología, SIPROSA, Tucumán
- Daniela Lazarte. Laboratorio de la Dirección de Bromatología, SIPROSA, Tucumán
- Verónica Trevisán. Instituto Biológico Tomás Perón, La Plata
- Cecilia Peirano. Instituto Biológico Tomás Perón, La Plata
- Carolina Del Bó. CEPROCOR. Córdoba
- Armando Luis Cañete. INAL - Posadas
- María del Carmen Alcaide. INAL - ANMAT

### **REVISIÓN TÉCNICA:**

- María Angélica Díaz. Departamento Laboratorio, Dirección Provincial de Salud Ambiental (DSA), Trelew - Chubut
- María del Pilar Barrio. Departamento Laboratorio, Dirección Provincial de Salud Ambiental (DSA), Trelew - Chubut
- Mariela E. Darré, Dirección de Bromatología - Chaco
- Marcela López. Laboratorio Regional Salud Ambiental Cinco Saltos - Río Negro
- Mariela Cofre. Laboratorio Regional Salud Ambiental, Villa Regina - Río Negro
- Armando Luis Cañete. INAL - Posadas
- Alina Rondini. Laboratorio de Alimentos Municipalidad de Córdoba. Córdoba
- Marina Susana Condorí. Laboratorio de la Dirección de Bromatología, SIPROSA, Tucumán
- Cecilia Peirano. Instituto Biológico Tomás Perón, La Plata
- Florencia Soledad Mazzeo. Laboratorio de Aguas y Alimentos , Dirección Provincial de Bromatología, Neuquén
- Carolina Del Bó. CEPROCOR. Córdoba
- Nancy Passalacqua. CEPROCOR. Córdoba
- Josefina Cabrera Durango. INAL - ANMAT
- María del Carmen Alcaide. INAL - ANMAT

### **REVISIÓN, EDITORIAL Y EDICIÓN:**

- Fernando Trinks. INAL - ANMAT



## INDICE

<b>Microorganismos aerobios mesófilos. Generalidades.</b>	<b>pág. 5</b>
Método horizontal para el recuento de Microorganismos. Parte I: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad. Procedimiento según International Standard Organization ISO 4833-1:2013.	pág. 8
Método horizontal para el recuento de Microorganismos. Parte II: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie. Procedimiento según International Standard Organization ISO 4833-2:2013.	pág. 22
Recuento de aerobios mesófilos en muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según BAM, Capítulo 3, enero de 2001.	pág. 43
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos. Técnica de Recuento en placa. Procedimiento según ICMSF – 2000.	pág. 60
<b>Mohos y levaduras. Generalidades.</b>	<b>pág. 75</b>
Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 2: Técnica de recuento en placa para productos con actividad de agua menor o igual a 0.95 . Procedimiento según International Standard Organization ISO 21527-2:2008.	pág. 78
Recuento de unidades formadoras de colonias de Mohos y Levaduras en leche y productos de la leche. Técnica de recuento en placa a 25°C Procedimiento según International Standard Organization ISO 6611:2004.	pág. 93
Recuento de mohos y levaduras muestras de alimentos. Técnica de recuento en placa. Procedimiento según APHA 2001. Capítulo 20.	pág. 116
<b>Anaerobios Sulfito Reductores. Generalidades.</b>	<b>pág. 131</b>
Método Horizontal para el Recuento de bacterias sulfito reductoras que crecen en anaerobiosis. Procedimiento según International Standard Organization ISO 15213:2003.	pág. 136





***Microorganismos Aerobios Mesófilos***



# Microorganismos aerobios mesófilos

## 1. Generalidades

En este grupo se incluyen todos los microorganismos, capaces de desarrollar en presencia de oxígeno a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C con una óptima entre 30°C y 40°C.

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos, en condiciones establecidas, estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos.

Refleja la calidad sanitaria de los productos analizados, indicando además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

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.

Un recuento elevado 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.
- La inmediata alteración del producto.

En el uso o la interpretación del recuento de microorganismo aerobios mesofilos hay ciertos factores que deben ser tenidos en cuenta:

Este recuento es sólo de microorganismos vivos.

- La utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra. En alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar recuentos elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado. En este caso, el recuento no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo.
- Los procedimientos que sufre el alimento en su elaboración, por ejemplo un proceso térmico, pueden enmascarar productos con altos recuentos o condiciones deficientes de higiene. Además, el almacenamiento prolongado en congelación o con pH bajo puede producir una disminución del recuento.
- El recuento de mesófilos nos indica las condiciones higiénico sanitarias de algunos alimentos pero no tiene significado sanitario

- en otros productos que han sido madurados con bacterias (por ejemplo quesos) o alimentos que dentro de su formulación tienen conservadores.

## **2. Referencias**

(1) María del Rosario Pascual Anderson, 1992. Editorial Díaz de Santos, S.A., MADRID, España. Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas.

(2) ICMSF. Microorganismos de los alimentos. Técnicas de análisis microbiológico. Volumen I - SEGUNDA EDICION. EDITORIAL ACRIBIA ZARAGOZA (España).

(3) Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos. Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT). Instituto Nacional de Alimentos (INAL).

NOTAS PERSONALES



Handwriting practice area consisting of multiple horizontal dashed lines for notes.

# Método horizontal para el recuento de Microorganismos

## Parte I: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en profundidad

Procedimiento según  
International Standard Organization ISO 4833-1:2013

### 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C.

### 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar un método horizontal para el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C.

El método resulta aplicable para:

- a) Productos destinados al consumo humano y la alimentación animal;
- b) Muestras ambientales de área de producción y manipulación de alimentos para consumo humano y alimentación animal.

Esta parte de la Norma ISO 4833 resulta aplicable para:

- 1) productos que requieran un recuento fiable cuando se especifica un límite de detección bajo (inferior a  $10^2$ /g o  $10^2$ /ml en el caso de muestras líquidas o inferior a  $10^3$ /g para muestras sólidas);
- 2) productos en los que se espera la presencia de colonias invasivas, que ocultan a las colonias de otros organismos. Por ejemplo es probable que la leche o los productos lácteos contengan *Bacillus* spp. invasivas.

La aplicabilidad de esta parte de la norma ISO 4833 para el análisis de ciertos alimentos fermentados para consumo humano y alimentación animal es limitada y pueden resultar más adecuados otros medios o condiciones de incubación diferentes. Sin embargo, este método se puede aplicar a tales productos, aunque es posible que los microorganismos predominantes en ellos no se detecten efectivamente.

En algunas matrices el método descrito en esta parte de la Norma ISO 4833 puede proporcionar resultados diferentes de los obtenidos con el método descrito en la Norma ISO 4833-2.

**Normas de referencia:** Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. Referencias.

### 3. DESARROLLO

#### 3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento:

**Microorganismos:** entidad de tamaño microscópico, que incluye bacterias, hongos, protozoos y virus.

Nota: para el propósito de esta parte de la norma, microorganismos son bacterias, levaduras y mohos capaces de formar colonias en el medio específico y en las condiciones de ensayo descritas en el siguiente procedimiento.

#### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.2.2. Solución salina peptonada (SFP)
- 3.2.3. Agar Plate Count (PCA)
- 3.2.4. Agar para cubrir (AC), si es necesario ver 3.5.2.8.
- 3.2.5. Estufa de esterilización
- 3.2.6. Autoclave
- 3.2.7. Estufa de incubación:  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.8. Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre  $44^{\circ}\text{C}$  y  $47^{\circ}\text{C}$
- 3.2.9. Equipo contador de colonias (opcional) , por ejemplo, se puede utilizar un equipo compuesto por un sistema de iluminación sobre fondo negro, con lentes de aumento, capaces de aumentar cerca de 1,5x y un contador mecánico o digital
- 3.2.10. Peachímetro de exactitud  $0.1$  a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.11. Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- 3.2.12. Agitador mecánico (tipo vortex)
- 3.2.13. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro
- 3.2.14. Pipetas de 1 ml de capacidad, graduadas con divisiones de 0.1 ml, clase A, o pipetas automáticas con tips estériles
- 3.2.15. Tubos de ensayo, frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.

#### 3.3. Principio (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.

3.3.2. Siembra en placas utilizando el medio de cultivo específico y la cantidad de muestra apropiada, si el producto inicial es líquido o de una suspensión inicial para el caso de otros productos.

Se preparan otras placas bajo las mismas condiciones, utilizando diluciones decimales de la muestra o de la suspensión inicial.

3.3.3. Incubación aeróbica a 30°C por 72 h.

3.3.4. Cálculo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (ml) o por gramo (g) de la muestra, a partir del número de colonias obtenidas en las placas que contienen menos de 300 colonias.

### **3.4. Muestreo**

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)**

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión (ver punto 5. Referencias).

##### **3.5.1.1. Suspensión inicial**

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa  $x$  g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen  $x$  ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9x$  g ó  $9x$  ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

La temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

##### **3.5.1.2. Diluciones decimales**

Transferir con una pipeta 1 ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se hacen las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver punto 3.5.3.).

### **3.5.1.3. Duración del procedimiento**

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

### **3.5.2. Inoculación e incubación**

3.5.2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 1 ml de la muestra líquida, o 1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos (dilución  $10^{-1}$ ), en dos (2) placas de Petri estériles.

Si se preparan placas de más diluciones, se puede reducir a una placa por dilución.

3.5.2.2. Tomar otra placa de Petri estéril. Transferir utilizando otra pipeta estéril, 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  (productos líquidos) o 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  (otros productos).

3.5.2.3. Si es necesario, se repite el procedimiento con mayores diluciones, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal.

3.5.2.4. Si es apropiado y posible, se seleccionan solo las diluciones críticas para el paso de incubación (al menos dos diluciones decimales consecutivas), aquellas en las que se espera obtener recuentos entre 10 y 300 colonias por placa.

3.5.2.5. Se coloca entre 12 ml a 15 ml del agar PCA enfriado a  $44^{\circ}\text{C}$  -  $47^{\circ}\text{C}$  en cada placa de Petri, evitando verter directamente el medio sobre el inóculo. El tiempo trascurrido entre que se terminó de preparar la dilución inicial (o la dilución  $10^{-1}$  si el producto es sólido) y el momento en que se agrega el agar a las placas no debe exceder los 45 min.

3.5.2.6. Se mezcla cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo por rotación suave de la placa de Petri.

3.5.2.7. Se colocan las tapas y se deja solidificar sobre una superficie horizontal fría, a temperatura ambiente.

3.5.2.8. Después de la completa solidificación del medio y solo en los casos en que se sospeche que la muestra contiene microorganismos cuyas colonias invaden la superficie del medio, verter 4 ml del agar para cubrir (AC) o agar PCA a 44°C - 47°C sobre la superficie del medio inoculado. Dejar solidificar de acuerdo a 3.5.2.7.

3.5.2.9. Se invierten las placas y se incuban en la estufa a 30°C  $\pm 1^\circ\text{C}$  por 72 h  $\pm 3$  h.

NOTA: No apilar más de seis (6) placas. Las placas deben estar separadas unas de otras y de las paredes y techo de la estufa por lo menos por una distancia de 25 mm.

### **3.5.3. Recuento y selección de las colonias**

3.5.3.1. Después de la incubación por el período especificado, seleccionar las placas que, de ser posible, tengan menos de 300 colonias. Contar las colonias, si es necesario utilizando el equipo contador de colonias. Examinar las placas bajo una luz tenue.

3.5.3.2. Es importante que las colonias diminutas sean incluidas en el recuento sin confundirlas con partículas insolubles o precipitado del alimento. Se examinan los objetos dudosos detenidamente, utilizando lentes de aumento si es necesario, para poder distinguir las colonias de otros materiales.

3.5.3.3. **Las "colonias diseminadas" o dispuestas en rosario se consideran como una colonia.**

3.5.3.4. Si menos un cuarto (1/4) de la placa está cubierto por un crecimiento difuso o diseminado, se cuentan las colonias en la parte de la placa no afectada y se calcula el número correspondiente para la placa de Petri entera, deduciéndolo por extrapolación del número teórico que debería corresponder a la placa entera. Si hay sobrecrecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento.

### **3.5.5. Expresión de los resultados**

3.5.5.1. De acuerdo a norma ISO 7218:2007. Ver anexo 3.

#### 4. ANEXOS

##### **ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de Microorganismos aerobios mesófilos**

**Preparación de la muestra:** x g de muestras + 9 x ml del diluyente (dilución 1/10)



**Inoculación e incubación:** transferir por duplicado 1 ml de las diluciones preparadas en placas de Petri. Si se siembra más de una dilución sembrar solo 1 placa por dilución (sembrar al menos 2 diluciones decimales consecutivas).

Verter 12 ml -15 ml del agar PCA.  
Incubar a 30°C ± 1°C, 72 h ± 3 h.



**Recuento y selección de las colonias:**

Seleccionar preferiblemente las placas que tienen menos de 300 colonias.

Se cuentan las colonias que se observan en cada placa y se calcula el número de unidades formadoras de colonias presentes en 1 ml ó 1 g de muestra.



**Expresión de resultados**

## **ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos**

### **1. Agua peptona bufferada (BPW)**

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

### **2. Solución salina peptonada (SFP)**

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

### **3. Agar Plate Count (PCA)**

Peptona (enzimática) de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa anhidra ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	1.0 g
Agar, en polvo o granulado	9 - 18 g
Agua destilada	1000 ml

Cuando se examinan productos lácteos, agregar 1.0 g de leche en polvo descremada por litro de medio de cultivo. La leche en polvo descremada debe estar libre de sustancias inhibitoras.

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar hasta la disolución completa del agar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Se distribuye en tubos, botellas u otros recipientes, volúmenes de medio de 12 ml a 15 ml. Para la conservación de volúmenes mayores se utilizan recipientes de hasta 500 ml de capacidad. Se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

Si el medio se utiliza inmediatamente, enfriar en un baño de agua a 44°C - 47°C antes de su uso, si no, se deja solidificar y se mantiene a 5°C ± 3°C no más de 3 meses, protegido de la luz, bajo condiciones en las cuales no se produzcan modificaciones en la composición y propiedades del medio.

Para su empleo, se funde el medio, se deja enfriar y se mantiene a 44°C - 47°C en el baño de agua antes de su uso.

Usar el agar lo antes posible, este no debe ser retenido por más de 4 h en el baño de agua.

### **Control de calidad del medio de cultivo:**

El agar Plate Count (PCA) es un medio no selectivo, usado en esta parte de la ISO 4833 para colocar en las placas. La productividad del medio debe ser testada de acuerdo a ISO 11133.

#### *Productividad:*

<b>Incubación:</b>	<b>(30 ± 1) °C por (72 ± 3) h</b>
<b>Cepas control:</b>	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 o WDCM 00012 (World Data Centre for Microorganisms (WDCM))  <i>Bacillus subtilis</i> subsp. Spizizenii WDCM 0003  <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 o WDCM 00034
<b>Medio de referencia:</b>	Agar Tripteína Soya
<b>Método de control:</b>	Cuantitativo
<b>Criterio:</b>	Coeficiente de productividad: (PR) ≥ 0,7

### **4. Agar para cubrir (AC)**

Agar, en polvo o granulado	12 - 18 g
Agua destilada	1000 ml

Agregar el agar al agua y calentar hasta la disolución completa del agar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 7.0 ± 0.2 a 25°C.

Se distribuye en tubos, botellas u otros recipientes, volúmenes de 4 ml de medio. Para la conservación de volúmenes mayores se utilizan

recipientes de hasta 500 ml de capacidad. Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Si el medio se utiliza inmediatamente, enfriar en un baño de agua a 44°C - 47°C antes de su uso, si no se deja solidificar y se mantiene a 5°C ± 3°C no más de 3 meses, protegido de la luz, bajo condiciones en las cuales no se produzcan modificaciones en la composición y propiedades del medio.

Para su empleo, se funde el medio, se deja enfriar y se mantiene a 44°C - 47°C en el baño de agua antes de su uso.

Control de calidad del medio de cultivo: De acuerdo a ISO/TS 11133.

## ANEXO 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

### 1.1 Método de cálculo: caso general

Para que el recuento sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias.

El número de microorganismos  $N$  presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación (1)

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

**$\Sigma C$ :** es la suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias;

**$V$ :** es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros;

**$d$ :** es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ( $d = 1$  cuando se utiliza el producto líquido sin diluir).

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación:

- si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior;
- si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos  $N$  por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

Ejemplo 1: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- Para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): 168 colonias;
- Para la segunda dilución ( $10^{-3}$ ): 14 colonias.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545$$

Redondeando el resultado como se indicó, el número de microorganismos es de 17.000 o  $1.7 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto.

NOTA: en caso de sembrar 0.1 ml  $V = 0.1$  ml

### **1.2. Método de cálculo para recuento bajo: caso en el que una placa (muestra para análisis o suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias**

- Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general (1.1) y se expresa como: *"el número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)"*.
- Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: *"hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4xd) por gramo o ml"*.

Ejemplo: Si la dilución inoculada es  $10^{-1}$ :

*Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 40 UFC/g ó ml*

### **1.3. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias**

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Menos de 1/d microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de 1/d microorganismos por gramo" (resto de los productos).*

Donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial, o la primera dilución inoculada o escogida ( $d = 10^0 = 1$  cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

Ejemplo:

- Si la dilución más concentrada sembrada fue:  $10^{-1}$

$\Rightarrow < 10$  UFC /ml o g

- Si la dilución más concentrada sembrada fue:  $10^{-2}$

⇒  $< 100$  UFC /ml o g

#### **1.4. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) contiene más de 300 colonias**

Si el recuento de colonias en todas las placas de todas las diluciones es incontable, mayor a 300, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Más de 300/ $d$  microorganismos /g ó ml"*

Donde  $d$  es la dilución correspondiente a la última dilución escogida.

Ejemplo:

- Si la última dilución (más diluida) sembrada fue:  $10^{-3}$

$> 300.000$  microorganismos / ml o g

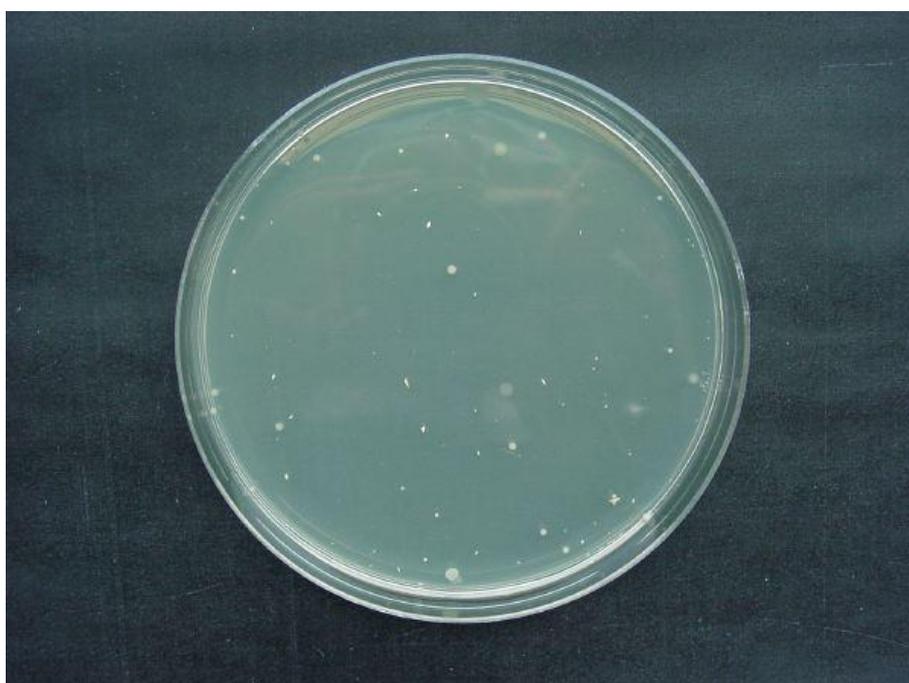
⇒  $> 3 \times 10^5$  UFC/ml o g

**ANEXO 4: FOTOS**

**1. Más de 300 UFC/ml**



**2. Entre 30-300 UFC/ml**



## **ANEXO 5: REFERENCIAS**

(1) International Standard Organization. ISO 4833-1: 2013. Microbiology of food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique.

**NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).**

**ISO 6887-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

**ISO 6887-2**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

**ISO 6887-3**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

**ISO 6887-4**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

**ISO 6887-5**, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

**ISO 7218**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

**ISO 11133**, Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media

# **Método horizontal para el recuento de Microorganismos**

## **Parte II: Recuento de colonias a 30°C mediante la técnica de siembra en superficie**

Procedimiento según  
International Standard Organization ISO 4833-2: 2013

### **1. OBJETIVO**

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C.

### **2. ALCANCE**

Este procedimiento se aplica para realizar un método horizontal para el recuento de microorganismos capaces de crecer y formar colonias en un medio sólido tras la incubación a 30°C.

El método resulta aplicable para:

- a) Productos destinados al consumo humano y la alimentación animal;
- b) Muestras ambientales de área de producción y manipulación de alimentos para consumo humano y alimentación animal.

Esta parte de la Norma ISO 4833 resulta aplicable para:

- 1) Productos que contengan organismos sensibles al calor que puedan representar una proporción significativa de la flora total (por ejemplo organismos psicrótrofos alimentos refrigerados y congelados, alimentos desecados u otros alimentos que puedan contener organismos sensibles al calor);
- 2) Productos que contengan bacterias aerobias estrictas que puedan representar una proporción significativa de la flora total (por ejemplo *Pseudomonas spp.*);
- 3) Productos que contengan partículas pequeñas que puedan resultar difíciles de distinguir de las colonias en una placa sembrada en profundidad;
- 4) Productos cuyo color intenso impida el reconocimiento de las colonias en una placa en profundidad;
- 5) Productos en los que se requiera una distinción entre distintos tipos de colonias como parte de la garantía de la calidad alimentaria.

Además de la técnica de siembra manual por extensión en placa, esta parte de la Norma ISO 4833 también describe el uso de un sembrador de placas en espiral, un método rápido para realizar el recuento de colonias en superficie (anexo 5).

La aplicabilidad de esta parte de la norma ISO 4833 al examen de ciertos alimentos fermentados para consumo humano y alimentación animal es limitada y pueden resultar más adecuados otros medios o condiciones de incubación diferentes. Sin embargo, este método se puede aplicar a tales productos, aunque es posible que los microorganismos predominantes en ellos no se detecten efectivamente.

En algunas matrices el método descrito en esta parte de la Norma ISO 4833 puede proporcionar resultados diferentes de los obtenidos con el método descrito en la Norma ISO 4833-1.

**Normas de referencia:** Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el punto 5. Referencias

### 3. DESARROLLO

#### 3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento:

***Microorganismos:*** entidad de tamaño microscópico, que incluye bacterias, hongos, protozoos y virus.

Nota: para el propósito de esta parte de la norma, microorganismos son bacterias, levaduras y mohos capaces de formar colonias en el medio específico y en las condiciones de ensayo descritas en el siguiente procedimiento.

#### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Agua peptona bufferada (BPW);
- 3.2.2. Solución salina peptonada (SFP);
- 3.2.3. Agar Plate Count (PCA);
- 3.2.4. Estufa de esterilización;
- 3.2.5. Autoclave;
- 3.2.6. Cabina de secado o incubación, con ventilación por convección, para el secado de las placas, capaz de mantener la temperatura entre 37°C y 55°C, o cabina de flujo laminar;
- 3.2.7. Estufa de incubación: 30°C ± 1°C;
- 3.2.8. Baño de agua o equipo similar capaz de mantener la temperatura entre 47°C y 50°C;

- 3.2.9. Equipo contador de colonias (opcional), por ejemplo, se puede utilizar un equipo compuesto por un sistema de iluminación sobre fondo negro, con lentes de aumento, capaces de aumentar cerca de 1,5x y un contador mecánico o digital;
- 3.2.10. Peachímetro de exactitud  $0.1$  a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
- 3.2.11. Equipo para mezclado (tipo stomacher);
- 3.2.12. Agitador mecánico (tipo vortex);
- 3.2.13. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro, o 140 mm;
- 3.2.14. Pipetas de 0.1 ml y 1 ml de capacidad nominal, graduadas, clase A, o pipetas automáticas con tips estériles (ISO 8655-2).
- 3.2.15. Tubos de ensayo, frascos o botellas, de capacidad no mayor a 500 ml.
- 3.2.16. Esparcidor/Espátula de vidrio, plástico o acero, estéril, para extender el inóculo sobre la superficie del medio de cultivo.

### **3.3. Principio** (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

- 3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.
- 3.3.2. Siembra de la cantidad de muestra apropiada si el producto inicial es líquido o de una suspensión inicial para el caso de otros productos en la superficie de placas, que contienen el medio de cultivo específico.  
Se preparan otras placas bajo las mismas condiciones, utilizando diluciones decimales de la muestra o de la suspensión inicial.
- 3.3.3. Incubación aeróbica a  $30^{\circ}\text{C}$  por 72 h.
- 3.3.4. Cálculo del número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro (ml) o por gramo (g) de la muestra, a partir del número de colonias obtenidas en las placas que contienen menos de 300 colonias.

### **3.4. Muestreo**

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)**

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887-1 y las normas específicas para el alimento en cuestión (ver punto 5. Referencias).

##### **3.5.1.1. Suspensión inicial**

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa  $x$  g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen  $x$  ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad). Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9x$  g ó  $9x$  ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

La temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente, para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

### 3.5.1.2. Diluciones decimales

Transferir con una pipeta 1 ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se hacen las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver punto 3.5.3.).

### 3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en el que se realiza la siembra no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

## 3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 0.1 ml de la muestra líquida, o 0.1 ml de la suspensión inicial en el caso de otros productos (dilución  $10^{-1}$ ), al centro de dos (2) placas de Petri estériles preparadas de acuerdo al punto 3 del anexo 2.

Si se preparan placas de más diluciones, se puede reducir a una placa por dilución.

Para los productos en los que se espera obtener recuentos bajos, el límite de detección puede aumentarse por un factor de 10, si se siembra 1.0 ml de la muestra, si la muestra es líquida, o 1.0 ml de la suspensión inicial para otros productos, en placas de mayor tamaño (140 mm) o en la superficie de 3 (tres) placas de Petri pequeñas (90 mm). En ambos casos se preparan por duplicado, utilizando 2 (dos) placas grandes o 6 (seis) pequeñas.

3.5.2.2. Tomar otra placa de Petri preparada con el medio de cultivo. Transferir utilizando otra pipeta estéril, 0.1 ml de la dilución  $10^{-1}$  (productos líquidos) o 0.1 ml de la dilución  $10^{-2}$  (otros productos).

3.5.2.3. Si es necesario, se repite el procedimiento con mayores diluciones, utilizando una pipeta estéril nueva para cada dilución decimal.

3.5.2.4. Cuidadosamente extender el inóculo en forma uniforme y lo más rápido posible, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el esparcidor o espátula. Se puede utilizar el mismo esparcidor/espátula para todas las diluciones de la misma muestra, comenzando con la mayor dilución y progresando en orden hacia la dilución con mayor cantidad de la muestra o menos diluida.

Se colocan las tapas y se dejan las placas a temperatura ambiente por 15 min para que el inóculo sea absorbido por el agar.

3.5.2.5. Se invierten las placas preparadas y se incuban en la estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

NOTA:

Para el uso del sembrador de placas en espiral ver anexo 5.

No apilar más de seis (6) placas. Las placas deben estar separadas unas de otras y de las paredes y techo de la estufa por lo menos por una distancia de 25 mm.

### **3.5.3. Recuento y selección de las colonias**

3.5.3.1. Después de la incubación por el período especificado, seleccionar las placas que, de ser posible, tengan menos de 300 colonias. Contar las colonias, si es necesario utilizando el equipo contador de colonias. Examinar las placas bajo una luz tenue.

3.5.3.2. Es importante que las colonias diminutas sean incluidas en el recuento sin confundirlas con partículas insolubles o precipitado del

alimento. Se examinan los objetos dudosos detenidamente, utilizando lentes de aumento si es necesario, para poder distinguir las colonias de otros materiales.

3.5.3.3. Las "colonias diseminadas" o dispuestas en rosario se consideran como una colonia.

3.5.3.4. Si se espera el crecimiento de colonias invasivas, se examinan las placas a las 24 h o 48 h y se marcan las colonias visibles.

3.5.3.5. Si menos un cuarto ( $1/4$ ) de la placa está cubierto por un crecimiento difuso o diseminado, se cuentan las colonias en la parte de la placa no afectada y se calcula el número correspondiente para la placa de Petri entera, deduciéndolo por extrapolación del número teórico que debería corresponder a la placa entera. Si hay sobrecrecimiento en un área superior a un cuarto de la placa, se rechaza este recuento.

### **3.5.5. Expresión de los resultados**

3.5.5.1. De acuerdo a norma ISO 7218:2007. Ver anexo 3.

#### **4. ANEXOS**

##### **ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de Microorganismos aerobios mesófilos**

**Preparación de la muestra:** x g de muestras + 9 x ml del diluyente (dilución 1/10)



##### **Inoculación e incubación:**

1. Transferir por duplicado 0.1 ml de las diluciones preparadas en placas de Petri con agar PCA, si se siembra más de una dilución sembrar solo 1 placa por dilución (sembrar al menos 2 diluciones decimales consecutivas).
2. Para muestras con recuentos bajos sembrar 1.0 ml de la muestra o dilución en placas de mayor tamaño (140 mm) o en la superficie de 3 (tres) placas de Petri pequeñas (90mm) por duplicado.
3. Incubar a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .



##### **Recuento y selección de las colonias:**

1. Seleccionar preferiblemente las placas que tienen menos de 300 colonias.
2. Se cuentan las colonias que se observan en cada placa y se calcula el número de unidades formadoras de colonias presentes en 1 ml ó 1 g de muestra



**Expresión de resultados**

## **ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos**

### **1. Agua peptona bufferada (BPW)**

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

### **2. Solución salina peptonada (SFP)**

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

### **3. Agar Plate Count (PCA)**

Peptona (enzimática) de caseína	5.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Glucosa anhidra ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	1.0 g
Agar, en polvo o granulado	9 - 18 g
Agua destilada	1000 ml

Cuando se examinan productos lácteos, agregar 1.0 g de leche en polvo descremada por litro de medio de cultivo. La leche en polvo descremada debe estar libre de sustancias inhibitoras.

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar hasta la disolución completa del agar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ .

Se distribuye en tubos, botellas u otros recipientes, volúmenes de medio de 12 ml a 15 ml. Para la conservación de volúmenes mayores se utilizan recipientes de hasta 500 ml de capacidad. Se esteriliza en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

Si el medio se utiliza inmediatamente, enfriar en un baño de agua a 47°C - 50°C antes de su uso, si no se deja solidificar y se mantiene a 5°C ± 3°C, no más de 3 meses, protegido de la luz, bajo condiciones en las cuales no se produzcan modificaciones en la composición y propiedades del medio.

Para su empleo, se funde el medio, se deja enfriar y se mantiene a 47°C - 50°C en el baño de agua antes de su uso.

**Preparación de las placas:**

Colocar 15 ml - 20 ml del medio en placas de Petri estériles y se deja solidificar.

Las placas preparadas se pueden conservar a 5°C ± 3°C hasta 4 semanas.

Inmediatamente antes de su uso, las placas se deben secar de acuerdo a ISO 11133.

**Control de calidad del medio de cultivo:**

El agar Plate Count (PCA) es un medio no selectivo, usado en esta parte de la ISO 4833 para colocar en las placas. La productividad del medio debe ser testeada de acuerdo a ISO 11133.

**Productividad:**

<b>Incubación:</b>	<b>(30±1) °C por (72±3) h</b>
<b>Cepas control:</b>	<i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 o WDCM 00012 (World Data Centre for Microorganisms (WDCM))  <i>Bacillus subtilis</i> subsp. Spizizenii WDCM 0003  <i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032 o WDCM 00034
<b>Medio de referencia:</b>	Agar Tripteína Soya
<b>Método de Control</b>	Cuantitativo
<b>Criterio:</b>	Coeficiente de productividad: (PR) ≥ 0,7

## **ANEXO 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)**

### **1.1. Método de cálculo: caso general**

Para que el recuento sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias.

El número de microorganismos  $N$  presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación (1)

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

**$\sum c$ :** es la suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias;

**$V$ :** es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros;

**$d$ :** es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ( $d = 1$  cuando se utiliza el producto líquido sin diluir).

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación:

- si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior;
- si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos  $N$  por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

Ejemplo1: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- Para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): 168 colonias;
- Para la segunda dilución ( $10^{-3}$ ): 14 colonias.

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{0,1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,0011} = 165454$$

Redondeando el resultado como se indicó, el número de microorganismos es de 170000 o  $1.7 \times 10^5$  por mililitro o por gramo de producto.

NOTA: en caso de sembrar 1 ml  $V = 1$  ml

### **1.2. Método de cálculo para recuento bajo: caso en el que una placa (muestra para análisis o suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias**

- Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general (1.1) y se expresa como: *"el número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)"*.
- Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: *"hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4xd) por gramo o ml"*.

Ejemplo:

- Si la dilución inoculada es  $10^{-1}$  y se sembró 1 ml: *"Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 40 UFC/g ó ml"*
- Si la dilución inoculada es  $10^{-1}$  y se sembró 0.1 ml: *"Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 400 UFC/g ó ml"*

### **1.3. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias**

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Menos de 1/d microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de 1/d microorganismos por gramo" (resto de los productos).*

Donde **d** es el factor de dilución de la suspensión inicial, o la primera dilución inoculada o escogida ( $d = 10^0 = 1$  cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

Ejemplo:

- Si la dilución más concentrada sembrada fue  $10^{-1}$  y se sembró 1 ml

⇒  $< 10$  UFC /ml o g

- Si la dilución más concentrada sembrada fue  $10^{-2}$  y se sembró 1 ml

⇒  $< 100$  UFC /ml o g

#### **1.4. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) contiene más de 300 colonias**

Si el recuento de colonias en todas las placas de todas las diluciones es incontable, mayor a 300, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Más de 300/ $d$  microorganismos /g ó ml"*

Donde  $d$  es la dilución correspondiente a la última dilución escogida.

Ejemplo:

- Si la última dilución (más diluida) sembrada fue  $10^{-3}$  y se sembró 1ml

$> 300.000$  microorganismos /ml o g

⇒  $> 3 \times 10^5$  UFC/ml o g

**ANEXO 4: FOTOS**

**1. Más de 300 UFC/ml**



**2. Entre 30-300 UFC/ml**



## **ANEXO 5: Recuento de colonias en superficie utilizando un sembrador de placas en espiral**

### **5.1. General**

Este anexo especifica un método para el recuento de microorganismos presentes en alimentos, alimentos para animales y muestras ambientales utilizando un sembrador en espiral y el recuento de colonias que crecen sobre el medio sólido después de la incubación aeróbica (para una definición de microorganismo ver punto 3.1.).

### **5.2. Principio**

5.2.1. La muestra, si es líquida, o la suspensión inicial en el caso de otros productos se deposita cuidadosamente sobre la superficie de una placa de agar rotativa en forma de un espiral de Arquímedes.

5.2.2. El volumen depositado disminuye mientras el sistema dispensador (aguja o microjeringas estériles descartables) se mueve del centro al borde de la placa, por lo que se establece una relación exponencial entre el volumen sembrado y el radio del espiral.

5.2.3. Durante la incubación, las colonias desarrollan a lo largo de las líneas donde fue depositada la muestra sobre el agar. La cuadrícula de recuento es calibrada para el volumen de muestra sembrado sobre las diferentes áreas del agar.

5.2.4. Se cuenta en un área determinada el número de colonias y se hacen los cálculos para obtener el recuento por gramo o mililitro de la muestra. Alternativamente, se puede utilizar para el recuento un sistema automático.

### **5.3. Medios de cultivo y diluyentes**

Ver punto 3.2. y anexo 2.

Las soluciones que se detallan a continuación se utilizan para la limpieza y descontaminación de las jeringas. Estas no son necesarias si se utiliza microjeringas estériles descartables.

5.3.1. Agua estéril: Se puede agregar 1% de polisorbato 80 si la muestra a sembrar contiene materia grasa.

5.3.2. Solución de hipoclorito de sodio: 5% de cloro libre

### **5.4. Equipos**

Ver punto 3.2.

5.4.1. Sembrador de placas en espiral: Se ajusta para distribuir el volumen total de la muestra a sembrar, por ejemplo: 0.05 ml, 0.1 ml, 0.2 ml o 0.4 ml por placa. Generalmente incluye una trampa de vacío para el control de la carga, distribución de la muestra, disposición de los residuos de la misma y la limpieza y desinfección del sistema. La presión residual requerida es de 24 KPa a 35 KPa (160 mmHg a 260 mmHg).

5.4.2. Equipo contador de colonias: con una cuadrícula calibrada, relaciona el volumen de la muestra sembrada con áreas específicas del agar. Alternativamente se pueden utilizar sistemas automáticos de recuentos.

5.4.3. Vaso de precipitado de 5 ml, estéril, descartable: algunos modelos nuevos utilizan diferentes tamaños de vasos, particularmente para el lavado y desinfección.

5.4.4. Microjeringas estériles descartables: opcional

5.4.5. Placas de agar: preparadas de acuerdo al anexo 2. Es importante que las placas contengan la cantidad suficiente, profundidad uniforme y que la superficie del agar esté nivelada.

## **5.5. Muestreo**

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

## **5.6. Procedimiento**

### **5.6.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)**

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión (ver punto 5. Referencias).

En general, cuando se utiliza el sembrador en espiral no se necesitan diluciones de la muestra, o se necesitan pocas.

Transferir, utilizando una pipeta estéril, 3 ml o 5 ml del homogenizado de la muestra a un vaso de precipitado de 5 ml descartable estéril.

Si es necesario, se deja la muestra en reposo por unos minutos antes de remover la porción de líquido del sobrenadante para el plaqueo en espiral, debido a que la presencia de partículas puede obstruir los tubos del sistema. Si es frecuente la obstrucción de los mismos, se recomienda el uso de bolsas de plástico estériles con filtro para la preparación de la suspensión inicial en muestras que no son líquidas.

### **5.6.2. Preparación del sembrador en espiral**

Ver ISO 7218.

- a) Programar el equipo de acuerdo a las instrucciones del fabricante, si es necesario ajustar.
- b) En particular se debe verificar:
  - La altura a la cual se eleva el brazo, de manera que se dispense el volumen correcto, para máquinas que operan mecánicamente;

- Que la placa etiquetada esté centrada en la plataforma giratoria;
- Que la punta de la aguja o microjeringa forme el ángulo correcto con la superficie del agar, de acuerdo a lo que especifica el fabricante.
- Que la aguja comience a sembrar y luego seleccione los puntos correctos. Para equipos electrónicos solo se debe verificar el punto de inicio.

Se deben repetir los pasos de verificación, durante la operación del equipo, si se produce el daño de la aguja o el desalineado de la misma, lo que es indicado por la deposición irregular de la muestra.

### **5.6.3. Inoculación**

#### 5.6.3.1. General

- a) Los pasos que se describen a continuación se aplican a modelos operados manualmente, los modelos semiautomáticos, deben ser operados según las instrucciones del fabricante.
- b) Llenar un vaso de precipitado estéril con la solución de hipoclorito de sodio, un segundo vaso con agua estéril y el tercer vaso con la muestra.
- c) Limpiar la punta de la aguja, y desinfectarla entre el plaqueo de cada muestra, lavándola por 1 segundo con la solución de hipoclorito de sodio y luego por 1 segundo con agua estéril.
- d) Después del lavado, bajar la aguja dentro de la muestra y abrir la válvula de relleno. Extraer la muestra a través de la aguja hasta que se forme una columna continua de líquido en el tubo que se encuentra sobre la válvula de relleno. Cuando la punta de la aguja se encuentre todavía debajo del nivel del líquido, cerrar la válvula de vacío. Levantar la aguja y rotar el recipiente de la muestra fuera del camino.
- e) Colocar en la base la placa de agar preparada, marcar sobre un lado, sobre la plataforma giratoria, y bajar la aguja hasta que el tip descansa libremente sobre la superficie del agar. Encender el motor y dejar que la plataforma rotatoria gire hasta que la aguja se levante y el equipo se detenga automáticamente. Colocar la tapa y remover la placa de la plataforma giratoria.
- f) Después de cada muestra analizada, el equipo se lava con hipoclorito de sodio y con agua estéril como se describió

anteriormente. Cuando el equipo no se va a utilizar nuevamente, se deja lleno con agua estéril.

- g) Si se siembra más de una dilución por muestra, se comienza a plaquear por la mayor dilución (más diluida).
- h) Se dejan las placas con las tapas por 15 minutos a temperatura ambiente hasta que el inóculo es absorbido por el agar.

#### 5.6.3.2. Control de esterilidad:

- a) Verificar la esterilidad del sembrador en espiral plaqueando agua estéril antes y después de cada serie de muestras examinadas.

### **5.6.4. Incubación**

Ver punto 3.5.2.

### **5.6.5. Recuento de colonias**

#### 5.6.5.1. Cuadrícula de Recuento:

- a) Se encuentran disponibles dos tipos de cuadrícula dependiendo del tamaño de la placa de Petri utilizada.
- b) Alternativamente, la cuadrícula de recuento transparente para placas de 150 mm de diámetro puede utilizarse para el recuento de placas de 90 mm de diámetro si se utiliza solo la parte interna del círculo que tiene un diámetro de 90 mm.
- c) Utilizar las cuadrículas provistas junto al equipo y de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- d) La cuadrícula se utiliza para relacionar el número de colonias contadas en un área de la placa con el volumen de muestra sembrado en dicha área.
- e) Ver ejemplos en la Figura A1.

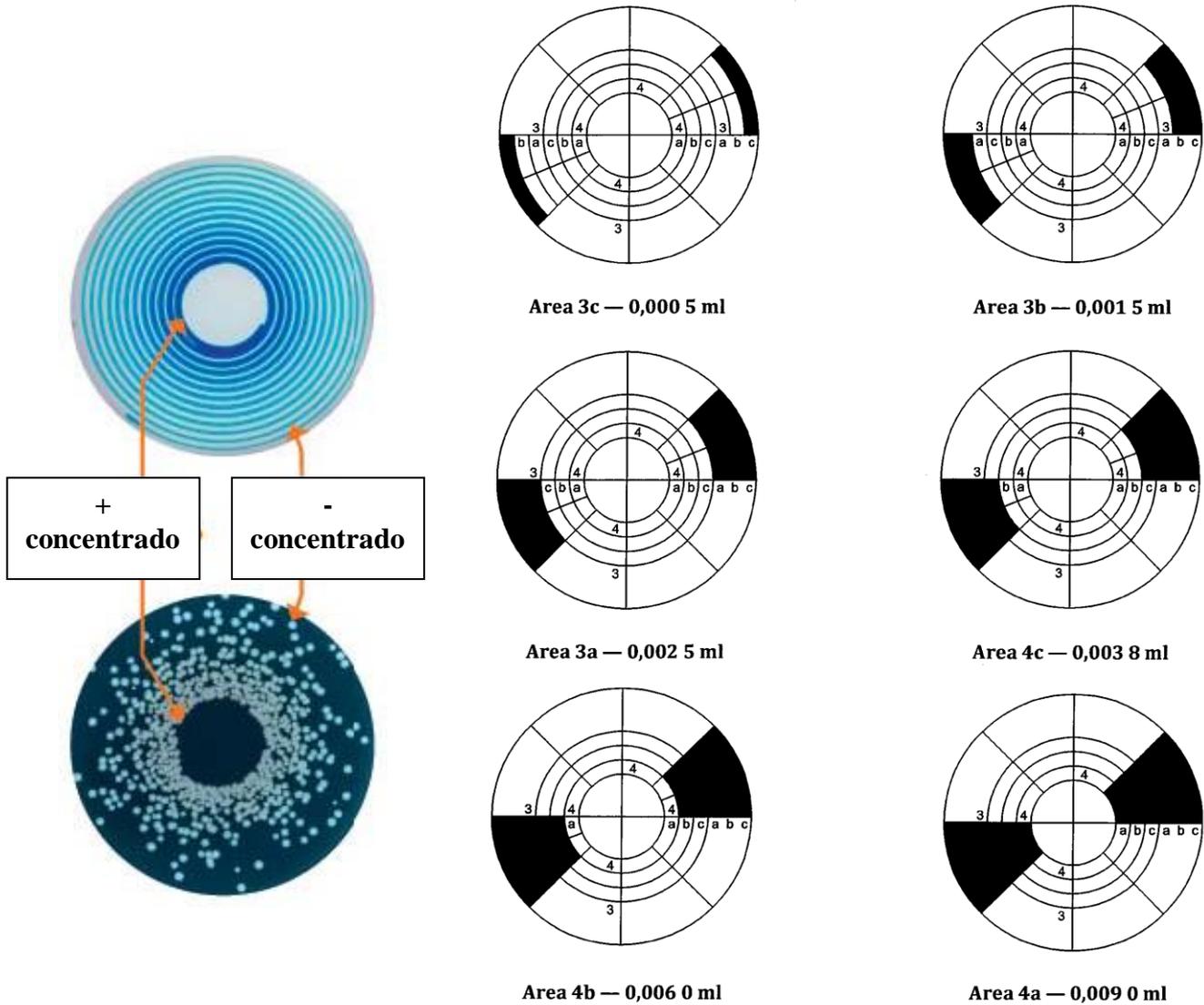


Figura A1

#### 5.6.5.2. Calibración y Verificación

- Los volúmenes sembrados sobre varios segmentos de la cuadrícula están dados en el manual de operaciones que acompaña el equipo sembrador en espiral.
- Para calibraciones con mayor precisión, los volúmenes por área de la cuadrícula deben ser verificados por un experto.
- Para verificar los volúmenes depositados en cada segmento, preparar 11 concentraciones bacterianas en el rango de  $10^6$  células/ml y  $10^3$  células/ml por diluciones seriadas (1+1) de suspensiones de bacterias que no tengan crecimiento invasivo sobre las placas de agar.
- Sembrar todas las diluciones por duplicado de acuerdo a lo especificado en 3.5.2. y con el sembrador en espiral, utilizando el mismo medio y las mismas condiciones de incubación (mismo incubador).

- e) Luego de la incubación contar las colonias. Calcular el volumen depositado en cada área de la cuadrícula de recuento de la siguiente manera:

$$V = \frac{C_A}{C_{ml}}$$

Donde

**V:** es el volumen del área de la cuadrícula (en ml);

**C<sub>A</sub>:** es el recuento por la técnica en espiral de esa área

**C<sub>ml</sub>:** es el recuento por la técnica estándar por ml.

- f) Verificar el volumen total sembrado por el sembrador en espiral pesando la cantidad sembrada en una balanza analítica con una precisión de  $\pm 2$  mg.

#### 5.6.5.3. Examen e informe de los recuentos de las placas en espiral (método manual)

- Centrar la placa incubada sobre la cuadrícula. Seleccionar un segmento y contar las colonias desde el borde exterior hasta el centro, hasta contar un total de 20 colonias.
- Continuar el recuento de las restantes colonias en el área (ej. segmento o subdivisiones del segmento) en el cuál la colonia número 20 fue observada. Registrar este número junto con el número del área que incluía la colonia número 20 (ej. 3c, 3b, 3a, 4c, 4a, en la figura A1).
- Contar el mismo área en el lado opuesto de la placa y dividir el recuento total de las dos áreas por el volumen, conocido, depositado sobre las áreas sembradas. Esto da como resultado el recuento por mililitro de muestra.
- Si el número total de colonias es mayor que 75 y el recuento en el área donde se contó la colonia número 20 está completo, el recuento es generalmente bajo debido a un error asociado al crecimiento masivo de las colonias. Es recomendable que el recuento se realice contando los segmentos adyacentes anulares alrededor de la circunferencia hasta contar al menos 50 colonias. Calcular el recuento dividiendo las colonias contadas por el volumen del área donde se contaron las colonias.
- Si se cuentan menos de 20 colonias en toda la placa, el intervalo de confianza para el recuento obtenido es amplio.
- Si el recuento excede las 75 colonias en la primer área, ej. área 3c, registrar el resultado estimado como  $>300.000$  colonias/ml.

#### 5.6.5.4. Examen e informe de los recuentos de las placas en espiral (utilizando un contador electrónico de colonias)

- Seguir las instrucciones del fabricante, pero verificar manualmente (5.6.5.3.) al menos cuando el equipo se utiliza por primera vez o cuando se examina una nueva matriz.

#### **5.6.6. Cálculo y expresión de resultados**

- a) Calcular el recuento de colonias en la placa en espiral.
- b) Informar los recuentos como el recuento en placa en espiral por g o ml de muestra según corresponda.

## **ANEXO 6: REFERENCIAS**

(1) International Standard. ISO 4833-2: 2013. Microbiology of food chain. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Part 2: Colony count at 30°C by the surface plating technique.

**NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).**

**ISO 6887-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

**ISO 6887-2**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 2: Specific rules for the preparation of meat and meat products

**ISO 6887-3**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products

**ISO 6887-4**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 4: Specific rules for the preparation of products other than milk and milk products meat and meat products, and fish and fishery products

**ISO 6887-5**, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

**ISO 7218**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

**ISO 11133**, Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media.

# Recuento de aerobios mesófilos en muestras de alimentos

## Técnica de recuento en placa

Procedimiento según  
*Bacteriological Analytical Manual* (BAM)  
Capítulo 3, enero de 2001

### 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos por la técnica de recuento convencional de colonias en placa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en muestras de alimentos.

### 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la enumeración de microorganismos aerobios mesófilos por la técnica de recuento de colonias en placa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  en muestras de alimentos congelados, refrigerados, precocidos o preparados.

El método de recuento en placa espiral automatizado para el examen de productos alimenticios y cosméticos (5), que se ajusta a la AOAC *Official Methods of Analysis*, sec. 977.27; no se detalla en este documento.

**Normas de referencia:** Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las referencias citadas en el anexo 4.

### 3. DESARROLLO

#### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Solución buffer fosfato de Butterfield (Solución stock) (ver anexo 2)
- 3.2.2. Buffer para realizar diluciones (ver anexo 2)
- 3.2.3. Agar plate count (APC) (ver anexo 2)
- 3.2.4. Estufa de esterilización
- 3.2.5. Autoclave
- 3.2.6. Estufa de incubación:  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ; leche,  $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.7. Baño de agua circulante para mantener el templado del agar, capaz de mantener la temperatura a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

- 3.2.8. Peachímetro de exactitud 0.01 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.9. Pipetas 1 ml, 5 ml y 10 ml, graduada en 0.1 ml unidades; con propipetas (no pipetear con la boca)
- 3.2.10. Placas de Petri estériles de vidrio, o descartables de plástico (no menos de 15 mm x 90 mm)
- 3.2.11. Contenedores para pipetas y placas de Petri, con adecuada protección
- 3.2.12. Botellas de dilución de 160 ml de capacidad de vidrio de borosilicato resistente, con tapones de goma o tapa a rosca
- 3.2.13. Botellas para diluciones con 90 ml  $\pm$  1 ml de solución fosfato buferado de Butterfield (3.2.2.); para muestras de leche, 99 ml  $\pm$  2 ml del mismo diluyente
- 3.2.14. Balanza; de 2000 g de capacidad; y sensibilidad 0.1 g
- 3.2.15. Recipientes estériles
- 3.2.16. Cuchillos, tenedores, espátulas, pinzas, tijeras, cucharas de mango largo, etc, estériles para el manejo de la muestra
- 3.2.17. Agitador mecánico (tipo vórtex)
- 3.2.18. Equipo para homogeneizado (tipo stomacher)
- 3.2.19. Contador de colonias de campo oscuro, tipo Quebec, o equivalente, con fuente de luz adecuada y con la base o plataforma grillada
- 3.2.20. Refrigerador para enfriar y mantener las muestras que necesitan conservarse entre  $0^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$ ; leche,  $0^{\circ}\text{C} - 4.4^{\circ}\text{C}$
- 3.2.21. Freezer para conservar las muestras freezadas entre  $-15^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- 3.2.22. Termómetros calibrados de rango apropiado
- 3.2.23. Área de trabajo: el área de trabajo debe poseer una mesada nivelada con una superficie amplia, en una habitación limpia, bien iluminada y ventilada, libre de polvo y corrientes de aire. La densidad microbiana del aire en la zona de trabajo, medida por sedimentación durante el procedimiento analítico, no debe exceder las 15 colonias/placa, correspondientes a 15 minutos de exposición
- 3.2.24. El espacio de almacenamiento, debe estar libre de polvo e insectos y debe contar con protección adecuada para los equipos y suministros

### **3.3. Principio**

El método está basado en las siguientes etapas:

- 3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.
- 3.3.2. Inoculación e incubación
- 3.3.3. Recuento de las colonias
- 3.3.4. Expresión de resultados

### **3.4. Muestreo**

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

### **3.4.3. Recepción de la muestra**

**3.4.3.1. Condiciones del recipiente contenedor de las muestras.** Chequear en los recipientes defectos físicos groseros. Detenidamente, inspeccionar pequeños derrames en bolsas y botellas plásticas, agujeros o marcas de perforaciones. Si las muestras fueron colectadas en botellas plásticas, chequear si éstas presentan rajaduras o fisuras y/o tapas flojas. Si se usan bolsas plásticas en la toma de muestras, tenga la precaución de que los alambres del cierre no perforen otras bolsas cercanas.

### **3.4.3.2. Almacenamiento**

Siempre que sea posible, analizar las muestras inmediatamente luego de recibirlas. Sin embargo, si el análisis tuviera que ser diferido o pospuesto, refrigerar las muestras perecederas no freezables entre 0°C - 4°C por no más de 36 h. Los productos que requieran ser freezados almacenarlos a -20°C hasta su análisis. Almacenar los productos enlatados (no perecederos), o alimentos de baja humedad, a temperatura ambiente hasta el momento de ser realizado el análisis.

## **3.5. Procedimiento**

### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones**

NOTA: Para el punto de la preparación de la suspensión inicial nos remitimos al **Capítulo 1 del BAM, abril de 2003, que a continuación se detalla.**

#### **3.5.1.1. Suspensión inicial**

##### **3.5.1.1.1. Descongelado**

Utilizar técnicas asépticas para el manejo del producto. Antes de manipular, limpiar las áreas de análisis estrictas y sus alrededores. Asimismo, humedecer la zona de análisis propiamente dicha con un agente desinfectante comercial. Preferiblemente, no descongelar las muestras freezadas previo al análisis. Si fuera necesario atemperar una muestra congelada para obtener una porción analítica, descongelarla en su envase original o en el recipiente en el cual se recibió en el laboratorio. Siempre que sea posible, evitar transferir la muestra a un envase secundario para su descongelado. Usualmente, una muestra puede ser descongelada a 2°C - 5 °C dentro de las 18 h. Si se desea un descongelado rápido, descongelar la muestra a menos de 45°C, por no más de 15 min. Cuando se descongela una muestra

a temperatura elevada, agitarla continuamente en un baño de agua termostáticamente controlado.

### **3.5.1.1.2. Homogeneizado**

En las muestras de alimentos es esperable encontrar, varios grados de distribución no uniforme de microorganismos. Para asegurarnos una distribución más homogénea, agitar enérgicamente las muestras líquidas, y si resultara práctico, cuando se trate de muestras secas de 100 g o más, mezclar con cucharas estériles antes de retirar la unidad analítica. **Utilizar una unidad analítica de 50 g** de alimentos líquidos o sólidos para determinar el **recuento en placa de aerobios**. Utilizar el tamaño de la unidad analítica y los volúmenes de diluyente apropiados recomendados para ser utilizados en los métodos del BAM. Si el contenido de un envase no es homogéneo (por ej. una comida congelada), macerar completamente el contenido del envase y retirar la unidad analítica, o preferiblemente, analizar cada porción de alimento en forma separada, dependiendo de los propósitos del ensayo.

### **3.5.1.1.3. Pesada**

Pesar 50 g  $\pm$  0.1 g del alimento.

### **3.5.1.1.4. Mezclado y dilución de muestras que requieren recuento de microorganismos.**

**a. Todos los alimentos/comidas excepto aquellas que contengan harina de nuez, nueces en mitades o en fragmentos mayores.** Adicionar 450 ml del diluyente Butterfield (BDB, ver anexo 2), a un frasco que contiene 50 g de una unidad analítica y homogeneizar por 2 minutos. Esta operación da como resultado la dilución  $10^{-1}$ . Realizar las diluciones a partir del homogenato original rápidamente, utilizando pipetas que suministren volúmenes en forma precisa. No utilizar pipetas para suministrar volúmenes menores al 10% de su capacidad. Por ejemplo, no utilizar pipetas con capacidad mayor a 10 ml para suministrar volúmenes de 1 ml; para suministrar volúmenes del orden de 0.1 ml, no utilice pipetas con capacidad mayor a 1 ml. Preparar todas las diluciones decimales con 90 ml de BDB, más 10 ml de la dilución previa, excepto que se especifique algo diferente. Agitar todas las diluciones vigorosamente 25 veces durante 7 segundos. No deberían transcurrir más de 15 minutos entre que se realiza la preparación del homogenato y la serie completa de las diluciones, y el momento en que el inóculo toma contacto con el medio de cultivo.

### **b. Para nueces en mitades o fragmentos mayores.**

Asépticamente pesar 50 g de la unidad analítica dentro de un frasco con tapa a rosca. Adicionar 50 ml de diluyente (BDB, ver anexo 2) y

agitar vigorosamente 50 veces, para obtener la dilución  $10^0$ . Dejar reposar 3 min - 5 min y agitar 5 veces para resuspender justo antes de realizar las diluciones decimales e inoculaciones.

**c. Harina de nuez.** Asépticamente pesar 10 g de la unidad analítica en un frasco con tapa a rosca. Adicionar 90 ml de diluyente BDB y agitar vigorosamente 50 veces en para obtener la dilución  $10^{-1}$ . Dejar reposar 3 min - 5 min y agitar 5 veces para resuspender justo antes de realizar las diluciones decimales y las inoculaciones.

### 3.5.1.2. Diluciones decimales

A partir del homogenato del alimento o primera dilución transferir 10 ml, a 90 ml de diluyente BDB. Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$ , utilizando pipetas estériles diferentes para cada dilución, para preparar las diluciones decimales sucesivas de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , y otras que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver 3.5.3.). Evite la formación de espuma durante el proceso. Agite todas las diluciones 25 veces durante 7 segundos.

**NOTA:** Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril. Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

### 3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo máximo transcurrido entre la preparación de la suspensión inicial y el momento en que el inóculo toma contacto con el medio de cultivo no debe superar los 15 minutos.

## 3.5.2. Inoculación e incubación

### 3.5.2.1. Inoculación

Pipetear 1 ml de cada dilución por separado y por duplicado, y verter en placas de Petri correctamente rotuladas. Agitar nuevamente el frasco de dilución 25 veces durante 7 segundos, si pasan más de 3 minutos antes de la siembra en las placas de Petri. Añadir en cada placa, 12 ml - 15 ml de agar de recuento en placa (PCA, ver anexo 2) enfriado a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Evitar verter el medio sobre el inóculo. Mezclar con suavidad y con un movimiento uniforme, por rotación alternada hacia atrás y hacia adelante, sobre una superficie plana y nivelada. Dejar solidificar. El tiempo de solidificación no debe exceder los 10 minutos.

**3.5.2.2. Incubación.** Invertir las placas de Petri solidificadas e incubar durante  $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$  a  $35^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . No apilar las placas cuando el agar no ha solidificado. Las placas deben estar separadas unas de otras y de las paredes y techo de la estufa por lo menos a una distancia de 25 mm.

**NOTA:** Para **muestras de leche**, realizar tres controles: un control de agar PCA (ver Anexo 2), un control de diluyente (BDB, ver anexo 2), y pipetear el diluyente para un control de pipeta.

**NOTA:** Cuando la **muestra contenga materiales higroscópicos**, como por ejemplo, harina o almidón, adicione inmediatamente el agar para diluir.

### **3.5.3. Recuento y selección de las colonias**

Después de la incubación por el período especificado en 3.5.2.2, contar las colonias bajo luz tenue sin confundir con precipitados del alimento o partículas indisolubles. Examinar elementos dudosos bajo lente de aumento. Las "colonias diseminadas" o dispuestas "en rosario", se consideran como una colonia. Seleccionar las placas que se encuentren en un rango de lectura **entre un mínimo 25 colonias y un máximo de 250 colonias** (para placas de 90 mm de diámetro).

### **3.5.4. Calculo y expresión de resultados** (Ver referencias 6, 8)

#### **1. Para placas con un mínimo 25 colonias y un máximo de 250 colonias**

$$N = \frac{\sum C}{[(1 \times n_1) + (0.1 \times n_2)] \times (d)}$$

$$\frac{(31 + 31) \text{ colonias}}{0.0015 \text{ ml}} = 4.1 \times 10^4$$

Donde:

**N:** número de colonias por ml o g de producto

**ΣC:** es la suma de todas las colonias en todas las placas contadas/tenidas en cuenta\*

**n<sub>1</sub>:** es el número de placas de la primera dilución contada\*/

**n<sub>2</sub>:** es el número de placas de la segunda dilución contada\*/

**d**: es la primera dilución a partir de la cual se obtiene el recuento.

Ejemplo:

<b>1:100</b>	<b>1:1000</b>
<b>232-244</b>	<b>33-28</b>

$$N = \frac{(232 + 244 + 33 + 28)}{[(1 \times 2) + (0.1 \times 2)] \times 10^{-2}}$$

$$N = 537/0.022$$

$$N = 24.409$$

$$N = 24.000$$

$$N = 2.4 \times 10^4 \text{ UFC/g}$$

**NOTA:** Cuando los recuentos de placas por duplicado caigan dentro y fuera del rango de colonias 25-250, **utilizar sólo aquellos recuentos que caigan dentro del rango.**

Para evitar crear falsas impresiones de precisión y exactitud cuando calculamos el recuento de aerobios mesófilos, informar sólo los dos primeros dígitos significativos. Redondear a dos cifras significativas sólo al momento de expresar el resultado. En el caso de muestras de leche, cuando ninguna placa de todas las diluciones realizadas contenga colonias, informar el recuento de aerobios mesófilos como menor a 25 colonias en recuento estimado. Redondear incrementando el segundo dígito en una cifra el siguiente número, cuando el tercer dígito sea 6, 7, 8 o 9 y usar ceros a la derecha para los sucesivos dígitos. Redondear disminuyendo en una cifra el segundo dígito, cuando el tercer dígito es 1, 2, 3 o 4. Cuando el tercer dígito es 5, redondear hacia abajo cuando el segundo dígito es par, y redondear hacia arriba cuando el segundo dígito es impar.

Ejemplos:

<b>Recuento calculado</b>	<b>PCA</b>
12.700	13.000
12.400	12.000
15.500	16.000
14.500	14.000

**NOTA 5:** Preferiblemente expresar el resultado como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

**NOTA 6:** Expresar el resultado como número de colonias **N** por mililitro (para los productos líquidos) o por gramo (para el resto de los productos).

Ver anexo 3: **Casos no comunes de recuentos de aerobios mesófilos.**

#### 4. ANEXOS

##### **ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento en placa de microorganismos aerobios mesófilos a 35°C ± 1°C**

###### **Preparación de la muestra:**

50 g de muestra + 450 ml de diluyente (dilución 1/10)  
Homogeneizar 2 minutos



###### **Preparación de las diluciones decimales:**

10 ml de la dilución inicial + 90 ml de diluyente  
(10<sup>-2</sup>)



###### **Inoculación e incubación:**

Transferir, por duplicado, 1 ml de las diluciones preparadas en placas de Petri de 90 mm, agregar 12 ml a 15 ml de APC preenfriado a 45°C ± 1°C.  
**Incubar** las placas invertidas a 35°C ± 1°C, durante 48 h ± 2 h



###### **Recuento de las colonias:**

Seleccionar las placas con un mínimo de **25** colonias y un máximo de **250** colonias



###### **Expresión de resultados**

## **ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos**

### **1. Diluyente: Solución buffer fosfato de Butterfield (Solución stock)**

Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34 g
Agua destilada	500 ml

Ajustar el pH a 7.2 con NaOH 1N. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar en heladera.

### **2. Buffer para realizar diluciones de Butterfield (BDB)**

Tomar 1,25 ml de la solución stock y llevar a volumen de 1000 ml con agua destilada. Fraccionar en frascos o tubos de  $90 \pm 1$  ml. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **3. Agar plate count (PCA) o Agar placa levadura (APL)**

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro

Calentar los ingredientes para disolver. Fraccionar en tubos o frascos de capacidad adecuada. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Ajustar el pH final a  $7.0 \pm 0.2$ .

### **ANEXO 3: Guía para informar casos no comunes de recuentos de aerobios mesófilos.**

El *Official Method of Analysis* (3) no provee una guía para el cálculo y expresión de recuento en placa, mientras que el *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 16 Ed. (2) presenta una guía detallada; por consiguiente para unificar, remitirse a las guías APHA según la modificación señalada en las referencias (6) y (8). Informar todos los recuentos en placa (2) realizados a partir de placas por duplicado. En el caso de muestras de leche, informar todos los recuentos (2) en placa, contabilizando las placas y sus duplicados, que contengan menos de 25 colonias, como así también menos de 25 colonias como recuento estimado. Informar todos los recuentos de aerobios en placa (2) contabilizados a partir de placas duplicadas que contengan más de 250 colonias, así como estimados (en más de 250 colonias). Los recuentos por fuera del rango normal 25-250 pueden proporcionar indicadores erróneos de la composición microbiana real de la muestra. Los factores de dilución pueden exagerar los recuentos **bajos (menores de 25) y en las placas "sobrecrecidas"/"incontables"**, (con más de 250 colonias) puede ser difícil contar o bien podría ser inhibido el desarrollo de algunas bacterias, resultando en un recuento bajo. Informar recuentos menores a 25 o mayores 250 UFC como recuentos de aerobios e placa estimados (EAPC) siglas en inglés. Use la siguiente guía:

- 1- **Placas normales (25-250)** Seleccionar la/s placa/s libres de "colonias diseminadas". Contar todas las UFC incluyendo aquellas del tamaño preciso en las placa/s seleccionada/s. Registrar las diluciones usadas y el número total de colonias contadas.
- 2- **Placas con más de 250 colonias.** Cuando el número por placa excede las 250 colonias, en todas las diluciones, registrarlas como incontables (muy numerosas para ser contadas, MNPC) para todas aquellas **menos las que estén cercanas a 250**, en las que se contarán las UFC en las porciones de la placa donde se observe una distribución representativa de las colonias. Ver referencia 2 para una guía detallada. Expresar el recuento de aerobios en placa APC como recuento ESTIMADO de aerobios en placa (APCE), para resaltar que fue estimado a partir de los recuentos que se alejan del rango 25-250.
- 3- **"Colonias diseminadas"**. Las "colonias diseminadas" son usualmente de tres tipos diferentes: 1) una cadena de colonias, no muy distinguibles separadamente, que parecen haberse producido por desintegración de un agregado bacteriano; 2) aquellas que desarrollan un film entre el agar y

el fondo de la placa; y 3) aquellas que forman un film en el agua sobre los bordes o sobre la superficie del agar. Si las placas preparadas a partir de una muestra, presentan o tienen excesivo sobrecrecimiento, de manera tal que: a) el área cubierta por sobrecrecimiento, incluyendo el área total de crecimiento reprimido, excede el 50% del área total, o b) el área de crecimiento reprimido excede el 25% del área total de **la placa, informar las placas como "sobrecrecidas"**. Cuando sea necesario contar las placas con sobrecrecimiento no descartadas según a) o b) como se mencionó arriba, contar cada uno de los tres tipos distintivos como si procedieran de una única colonia. Para el primer caso, si se presenta una única cadena, contarla como una colonia simple. Si aparece más de una cadena con orígenes aparentes separados, contar cada una como una colonia simple. No contar cada crecimiento individual de una cadena como una colonia separada. Los tipos 2 y 3, usualmente son el resultado de colonias diferentes y se  **cuentan como tales. Combine el recuento de "colonias diseminadas" y el recuento de colonias, para calcular el recuento de aerobios en placa.**

- 4- **Placas sin UFC.** Cuando las placas de todas las diluciones no presentan colonias, informar el recuento de aerobios mesófilos tan bajo como **"uno por"** aquel correspondiente a la dilución más baja usada. Marcar el recuento de aerobios mesófilos con un **asterisco** para denotar que fue **estimado** a partir de los recuentos que cayeron fuera del rango de 25-250 por placa. Cuando las placas de una muestra se presumen contaminadas o con alguna otra característica no satisfactoria, informar el/los resultado/s como **"accidente de laboratorio" (AL)**.

### **Cálculo y Expresión de resultados NO COMUNES en el recuento de aerobios mesófilos**

**1. Todas las placas con menos de 25 UFC.** Cuando las placas de ambas diluciones caen debajo de las 25 UFC, informar el recuento en placa real, pero informarlo como menor a  $25 \times 1/d$ , donde **d** es el factor de dilución a partir del cual se realizó el primer recuento obtenido.

Ejemplo:

<b>Colonias</b>		
<b>1:100</b>	<b>1:1000</b>	<b>APCE / ml(g)</b>
18	2	< 2.500
0	0	< 2.500

APCE: recuento de aerobios en placa ESTIMADO

**2. Todas las placas con más de 250 UFC.** Cuando las placas de las dos diluciones seleccionadas contienen más de 250 UFC cada una (pero menos que 100/cm<sup>2</sup>), estimar el recuento de aerobios mesófilos (APCE) de las placas cercanas a 250 y multiplicar por la dilución.

Ejemplo:

Colonias		
1:100	1:1000	APCE / ml (g)
MNPC	640	640.000

MNPC: muy numerosas para ser contadas o incontables

APCE: recuento de aerobios en placa ESTIMADO

**3. Todas las placas con "colonias diseminadas" y/o que hayan sufrido accidentes de laboratorio (AL).** Informarlas respectivamente como "sobrecrecidas" (SC) o "accidente de laboratorio" (AL).

**4. Todas las placas con un promedio de más de 100 UFC x cm<sup>2</sup>.** Estimar el recuento en placa de aerobios como mayor que 100 veces la mayor dilución sembrada, sobre el área de la placa. Los ejemplos siguientes tienen un recuento promedio de 110 x cm<sup>2</sup>.

Ejemplo:

Colonias / Dilución		
1:100	1:1000	APCE / ml (g)
MNPC	7,150 (a)	> 6.500.000 EAPC (b)
MNPC	6.490 (c)	> 5.900.000 EAPC

(a) Basado en un área de la placa igual a 65cm<sup>2</sup>.

(b) APCE, recuento en placa de aerobios estimado

(c) Basado en un área de placa igual a 59 cm<sup>2</sup>.

ANEXO 4: FOTOS

1. Agar recuento en placa



**Izquierda:** Placa con crecimiento máximo de UFC.  
**Derecha:** Placa con crecimiento mínimo de UFC.



Placa con crecimiento entre 25-250 UFC.

## **ANEXO 5: REFERENCIAS**

**Fuente del texto web:** *Bacteriological Analytical Manual*, 8th Edition, Revision A, 1998. Chapter 3. Última revisión de la página: 04/10/2013.

- (1) American Public Health Association. 1984. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 2nd ed. APHA, Washington, DC
- (2) American Public Health Association. 1993. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16<sup>th</sup> ed. APHA, Washington, DC
- (3) Association of Official Analytical Chemists. 1990. Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> ed. AOAC, Arlington, VA
- (4) Donnelly, C.B., J.E. Gilchrist, J.T. Peeler, and J.E. Campbell. 1976. Spiral plate count method for the examination of raw and pasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:21-27.
- (5) Gilchrist, J.E., C.B. Donnelly, J.T. Peeler, and J.E. Campbell. 1977. Collaborative study comparing the spiral plate and aerobic plate count methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 60:807-812.
- (6) International Dairy Federation. 1987. Milk and Milk Products: Enumeration of Microorganisms—Colony Count at 3°C. Provisional IDF Standard 100A. IDF, Brussels, Belgium.
- (7) Jarvis, B., V.H. Lach, and J.M. Wood. 1977. Evaluation of the spiral plate maker for the enumeration of microorganisms in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 149-157.
- (8) Niemela, S. 1983. Statistical evaluation of Results from Quantitative Microbiological Examinations. Report No. 1, 2nd ed. Nordic Committee in Food Analysis, Uppsala, Sweden.
- (9) Tomaszewicz, D.M., D.K. Hotchkiss, G.W. Reinbold, R.B. Read, Jr., and P.A. Hartman. 1980. The most suitable number of colonies on plates for counting. *J. Food Prot.* 43:282-286.
- (10) Zipkes, M.R., J.E. Gilchrist, and J.T. Peeler. 1981. Comparison of yeast and mold counts by spiral, pour, and streak plate methods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64:1465-1469.

**Fuente del texto web:** *Bacteriological Analytical Manual*, Edition 8, Revision A, 1998. Chapter 1.

(1) American Public Health Association. 1985. Laboratory Procedures for the Examination of Seawater and Shellfish, 5th ed. APHA, Washington, DC.

(2) AOAC INTERNATIONAL. 1995. Official Methods of Analysis, 16th ed. AOAC INTERNATIONAL, Arlington, VA.

(3) Food and Drug Administration. 1989. Laboratory Procedures Manual. FDA, Rockville, MD.

(4) Food and Drug Administration. 1978. EDRO Data Codes Manual. Product Codes: Human Foods. FDA, Rockville, MD.

(5) Food and Drug Administration. 1993. Investigations Operations Manual. FDA, Rockville, MD.

(6) International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1986. Microorganisms in Foods. 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications, 2nd ed. University of Toronto Press, Toronto, Ontario, Canada.

(7) National Academy of Sciences. 1969. An Evaluation of the Salmonella Problem. National Academy of Sciences, Washington, DC.

NOTAS PERSONALES



A series of horizontal dashed lines for taking notes.

# **Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos**

## **Técnica de Recuento en placa**

Procedimiento según ICMSF - 2000

### **1. OBJETIVO**

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, por la técnica de recuento en placa en muestras de alimentos.

### **2. ALCANCE**

El presente procedimiento se aplica para realizar el Recuento de microorganismos aerobios mesófilos en muestras de alimentos por el método de Recuento en Placa por siembra en todo el medio (Método 1) y por Siembra en Extensión de Superficie (Método 2).

### **3. DESARROLLO**

#### **3.1. Definiciones**

Microorganismos aerobios mesófilos son aquellos microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) que se desarrollan en presencia de oxígeno libre y a una temperatura comprendida entre 20°C y 45°C, con una zona óptima entre 30°C y 40°C.

#### **3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos**

- 3.2.1. Agua de peptona para diluciones
- 3.2.2. Agua de peptona salina para diluciones
- 3.2.3. Una cabina o estufa de desecación para secar la superficie del medio sólido contenido en las placas. La temperatura más adecuada es 50°C.
- 3.2.4. Tween 80 al 1%
- 3.2.5. Agar para recuento en placa
- 3.2.6. Estufa de incubación (29°C - 31°C)
- 3.2.7. Estufa de esterilización
- 3.2.8. Homogeneizador de una o dos velocidades, con control por reostato.

- 3.2.9. Vasos o recipientes de vidrio o de metal, adecuados para el homogeneizador, de 1 litro de capacidad, con tapa, resistentes a las temperaturas de esterilización en autoclave. Debe utilizarse un recipiente estéril (esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos) para cada muestra de alimento a analizar
- 3.2.10. Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- 3.2.11. Balanza de una capacidad no inferior a 2.500 g y de una sensibilidad de 0.1 g
- 3.2.12. Instrumentos para preparar las muestras: cuchillos, tenedores, pinzas, tijeras, cucharas, espátulas, todo ello previamente esterilizado en autoclave o por aire caliente
- 3.2.13. Bolsas de polietileno de paredes delgadas aproximadamente del calibre 200) de unos 18 x 30 cm y con el fondo soldado
- 3.2.14. Baño de agua o estufa de aire para templar y mantener el medio fundido a 44°C - 46°C
- 3.2.15. Heladera a 2°C - 5°C
- 3.2.16. Peachimetro de exactitud 0.01 a 25°C ± 1°C
- 3.2.17. Pipetas bacteriológicas estériles de 1 ml, 5 ml y 10 ml de idénticas características
- 3.2.18. Tubos de cultivo para el diluyente de 15 ml - 20 ml de capacidad
- 3.2.19. Placas de petri de vidrio (100 x 15 mm) o plástico de (90 x 15 mm) de diámetro
- 3.2.20. Contador de colonias (se recomienda el modelo Quebec de campo oscuro o equivalente)
- 3.2.21. Dispositivo de registro automático del número de colonias contadas
- 3.2.22. Varillas de vidrio en forma de bastón de hockey para distribuir el inóculo, dobladas en ángulo recto a 3 cm de un extremo.

### 3.3. Principio

Los métodos utilizados para el recuento de microorganismos aerobios mesófilos están basados en las siguientes etapas:

- 3.3.1. Preparación y homogeneización de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.
- 3.3.2. Plaqueo de acuerdo al método utilizado de un medio de cultivo selectivo de una cantidad específica de la muestra problema, si es líquida o de la suspensión inicial si es sólida y de las diluciones sucesivas.
- 3.3.3. Incubación en aerobiosis a 29°C - 31°C durante el tiempo establecido, según el método utilizado.
- 3.3.4. Cálculo del número de microorganismo aerobios mesófilos por gramo o mililitro de muestra a partir del número de colonias obtenidas de las placas que dan resultados significativos.

### 3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones**

##### **3.5.1.1. PROCEDIMIENTO 1**

3.5.1.1.1. Una vez tomada la muestra debe iniciarse el análisis tan pronto como sea posible. La muestra debe refrigerarse a 0°C - 5°C si no puede ser estudiada inmediatamente después de su llegada al laboratorio. Si la muestra está congelada, descongelarla en su envase original (o en el recipiente en el que llegó al laboratorio) durante un tiempo máximo de 18 horas en una heladera o frigorífico a 2°C - 5°C. Si la muestra congelada puede ser fácilmente triturada, no es necesario descongelarla.

3.5.1.1.2. Tarar el vaso del homogeneizador estéril y vacío y pesar en él 50 g  $\pm$  0.1 g representativo de la muestra del alimento. Si el contenido del envase no es homogéneo (como sucede, por ejemplo, en un plato precocinado congelado), deberá tomarse una muestra de 50 g a partir de un macerado de todos los componentes o se analizarán separadamente cada uno de ellos, según la finalidad del examen.

3.5.1.1.3. Añadir al vaso del homogeneizador 450 ml de agua peptona para diluciones o de agua peptona salina para diluciones. De este modo se obtiene una dilución  $10^{-1}$ .

3.5.1.1.4. Homogeneizar el alimento y hacer las diluciones inmediatamente.

3.5.1.1.5. Medir 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  del homogeneizado, evitando la formación de espuma y pasarlo a uno de los blancos de dilución conteniendo 9 ml de diluyente ó medir 10 ml de la dilución  $10^{-1}$  y pasarlo a 90 ml de diluyente. Agitar esta dilución y las subsiguientes enérgicamente 25 veces en un arco de 30 cm. Repetir esta operación utilizando las diluciones progresivamente más elevadas para preparar las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  ó las necesarias según indique la experiencia para el alimento que se va a analizar.

### 3.5.1.2. PROCEDIMIENTO 2

3.5.1.2.1. Comenzar a trabajar tan pronto como sea posible después de la toma de muestra. Pesar en una bolsa de polietileno previamente tarada, al menos 10 g representativos de la muestra total. Los alimentos congelados no precisan ser previamente descongelados a no ser que ello resulte necesario para pesar las unidades de muestra. Tampoco es necesario picar, antes de homogeneizar, alimentos como la carne. Si es preciso descongelar la muestra, ésta se mantendrá en su envase original (o en el recipiente en el que llegó al laboratorio) en una heladera o frigorífico a 2°C - 5°C y se iniciará el análisis tan pronto como la descongelación permita tomar adecuadamente las unidades de muestra (el tiempo máximo de descongelación no superará las 18 horas).

3.5.1.2.2. Añadir un volumen de diluyente igual a 9 veces la muestra. Así se obtiene una dilución  $10^{-1}$ .

3.5.1.2.3. Si se sabe o se sospecha que el alimento contiene gérmenes patógenos, es conveniente colocar la bolsa conteniendo la muestra y el diluyente dentro de otra bolsa como precaución frente a la posibilidad de que se rompa la primera.

3.5.1.2.4. Para alimentos con un elevado contenido en grasa (superior al 20%), como ocurre por ejemplo en ciertas carnes, es necesario añadir un 1% de Tween 80 ó de otro tensioactivo no tóxico.

3.5.1.2.5. **Colocar la bolsa en el "Stomacher" y hacer funcionar el aparato durante 60 segundos.**

3.5.1.2.6. Agitar enérgicamente la bolsa con las manos y pipetear 10 ml en un frasco conteniendo 90 ml de diluyente, o bien pasar 1 ml a un tubo conteniendo 9 ml de diluyente. De este modo se obtiene la dilución  $10^{-2}$ .

3.5.1.2.7. Agitar enérgicamente la suspensión de 100 ml 25 veces en un arco de 30 cm, o aspirar 10 veces la suspensión de 10 ml con una pipeta estéril. Pipetear 10 ml en un nuevo blanco de dilución de 90 ml ó 1 ml en uno de 9 ml, obteniendo de esta forma la dilución  $10^{-3}$ . Repetir esta operación para preparar las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ , ó las necesarias, según indique la experiencia, para el alimento que se va a analizar.

### 3.5.2. Inoculación e incubación

#### 3.5.2.1. MÉTODO 1: Recuento estándar en placa o recuento en placa por siembra en todo el medio

Preparar la suspensión inicial y diluciones por uno de los dos procedimientos detallados en 3.5.1.1. y 3.5.1.2.

3.5.2.1.1. Pipetear por duplicado, en placas de Petri, alícuotas de 1 ml de las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , y  $10^{-5}$  y una alícuota de 0,1 ml de la dilución  $10^{-5}$ , lo que supone la siembra por placa de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  g de alimento. Se aconseja esta serie de diluciones en aquellos casos en que se desconoce en número aproximado de gérmenes presentes en el alimento, pero el rango de diluciones preparadas y sembradas puede modificarse en función de la cifra de microorganismos esperada. De todos modos, siempre deben sembrarse tres diluciones distintas.

3.5.2.1.2. Fundir el agar para recuento en placa utilizando vapor o agua hirviendo y procurando que este tratamiento térmico no sea excesivamente prolongado. Templar el medio a  $44^{\circ}\text{C}$  -  $46^{\circ}\text{C}$  y controlar cuidadosamente su temperatura para que al mezclarlo con la dilución del alimento no sean inactivados los gérmenes. Verter inmediatamente en las placas de Petri 10 ml - 15 ml del medio fundido y templado. El período de tiempo transcurrido entre la realización de las diluciones y el vertido del medio no debe superar los 20 minutos y es preferible que sea inferior a 10 minutos.

3.5.2.1.3. Acto seguido, mezclar el inóculo con el medio fundido, inclinando y girando las placas. La forma adecuada de llevar a cabo esta operación sería la siguiente: (a) imprimir a la placa movimientos de vaivén 5 veces en una dirección, (b) hacerla girar 5 veces en sentido de las agujas del reloj, (c) volver a imprimir movimientos de vaivén en una dirección que forme ángulo recto con la primera y (d) hacerla girar 5 veces en sentido contrario a las agujas del reloj.

3.5.2.1.4. Con el fin de controlar la esterilidad, preparar una o varias placas conteniendo medio y diluyente sin inocular. Transcurrido el período de incubación, el número de colonias presentes en estas placas no debe modificar el recuento en más de una unidad en la segunda cifra significativa.

3.5.2.1.5. Una vez solidificado el agar, invertir las placas e incubarlas a  $29^{\circ}\text{C}$  -  $31^{\circ}\text{C}$  durante  $48 \pm 3$  h.

### **3.5.2.2. MÉTODO 2: Recuento en placa por siembra en extensión en superficie**

Preparar la suspensión inicial y diluciones por uno de los dos procedimientos detallados en 3.5.1.1. y 3.5.1.2.

3.5.2.2.1. Añadir a cada placa de Petri 15 ml de medio para recuento en placa fundido y enfriado a  $45^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$  y dejar solidificar. Secar las placas preferiblemente a  $50^{\circ}\text{C}$  durante 1.5 - 2 h. Si las placas se

preparan con antelación, no deben guardarse más de 24 horas a temperatura ambiente ó de 7 días en heladera o frigorífico a 2°C - 5°C.

3.5.2.2.2. Tomar dos alícuotas de 0.1 ml de la dilución más elevada y depositarlas en la superficie del medio contenido en 2 placas de Petri (2 placas por dilución, sembrando en cada una 0.1 ml). Repetir esta operación con cada dilución hasta llegar a la más concentrada utilizando siempre la misma pipeta que se vaciará y llenará tres veces antes de transferir a cada placa los 0.1 ml. Deben sembrarse por lo menos tres diluciones aún en el caso de que se conozca el número aproximado de microorganismos presentes en la muestra de alimento.

3.5.2.2.3. Extender las alícuotas de 0.1 ml sobre la superficie del medio tan pronto como sea posible, utilizando las varillas de vidrio en forma de bastón (emplear una varilla de vidrio para cada placa). Dejar secar las superficies de las placas durante 15 minutos.

3.5.2.2.4. Incubar las placas invertidas durante 3 días a 29°C - 31°C.

### **3.5.3. Recuento de colonias**

Las indicaciones señaladas pueden ser utilizadas tanto en el Método 1 como en el Método 2:

3.5.3.1. Elegir las dos placas, correspondientes a una dilución, que presenten entre 30 y 300 colonias. Contar todas las colonias de cada placa utilizando el contador de colonias y el dispositivo de registro automático. Hallar la media aritmética de los dos valores y multiplicarla por el factor de dilución (la inversa de la dilución cuyas placas han sido seleccionadas). Dar el valor obtenido como el recuento estándar en placa.

3.5.3.2. Si una de las placas de la dilución elegida presenta algo menos de 30 colonias o algo más de 300, deben de contarse también todas las colonias de ambas y como en el caso anterior, hallar la media aritmética y multiplicarla por el factor de dilución. El valor obtenido se dará como el recuento estándar en placa.

3.5.3.3. Cuando las placas de dos diluciones consecutivas presentan entre 30 y 300 colonias, deben hallarse los recuentos estándar en placa de cada dilución tal como se ha señalado anteriormente y se dará como resultado la media de los dos valores obtenidos, a no ser que uno de ellos sea superior al doble del otro, en cuyo caso se dará como recuento estándar en placa el valor más bajo.

#### **3.5.3.4. Cálculo del recuento estándar en placa estimado**

(a) Si ninguna de las placas tiene entre 30 y 300 colonias, el valor calculado se da como el recuento estándar en placa estimado y el cálculo del número de microorganismos presentes en el alimento se lleva a cabo en los distintos casos en la forma que se indica en los apartados (b), (c) y (d), a continuación.

(b) Si todas las placas presentan más de 300 colonias, dividir las dos placas, correspondientes a la dilución más elevada, en secciones radiales (2, 4 u 8) y contar todas las colonias obtenidas en cada caso por el factor adecuado, con el fin de conseguir una estimación del número total de colonias presentes en la placa. Hallar la media del valor estimado por las dos placas y multiplicar por el factor de dilución correspondiente. El valor obtenido se da como el recuento estándar en placa estimado.

(c) Si en las placas inoculadas con la dilución menos concentrada se encuentran más de 200 colonias en una sección correspondiente a la octava parte de la placa, multiplicar 1.600 (procedente de  $200 \times 8$ ) por el factor de dilución y expresar el recuento estándar en placa estimado como superior ( $>$ ) al valor obtenido. En estos casos resulta aconsejable señalar entre paréntesis la dilución utilizada.

(d) Cuando no se encuentran colonias en las placas correspondientes a la dilución más concentrada, expresar el recuento estándar en placa estimado como inferior a ( $<$ ) 1 multiplicado por el factor de la dilución más concentrada.

#### **3.5.3.5 Presencia de colonias de crecimiento difusivo en superficie**

(a) Cuando en las placas elegidas aparezcan estas colonias y siempre que el área ocupada por ellas no supere la mitad de la placa, contar las colonias de otro tipo que se encuentran fuera de esta zona. Corregir la cifra obtenida teniendo en cuenta el área en que no se han podido contar las colonias.

(b) Siempre que la zona ocupada por este tipo de colonias supere la cuarta parte de la superficie de la placa hay que anotar su presencia. Si este problema lo presenta más de una placa de cada veinte hay que tomar las medidas necesarias para evitar su aparición (como, por ejemplo, reducir la humedad de la estufa de incubación o mezclar el inóculo con el medio fundido y templado de forma más completa).

#### **3.5.4. Expresión de los resultados**

Cuando se dan los valores del recuento estándar en placa o del recuento estándar en placa estimado, deben utilizarse únicamente dos cifras significativas. Estas dos cifras corresponden a los dígitos primero y segundo (empezando por la izquierda) de la media de las colonias halladas o estimadas. Los dígitos restantes tienen que ser substituidos por ceros. Por ejemplo, si el valor calculado fue 523.000, éste ha de darse como 520.000 ( $52 \times 10^4$ ). Si el tercer dígito

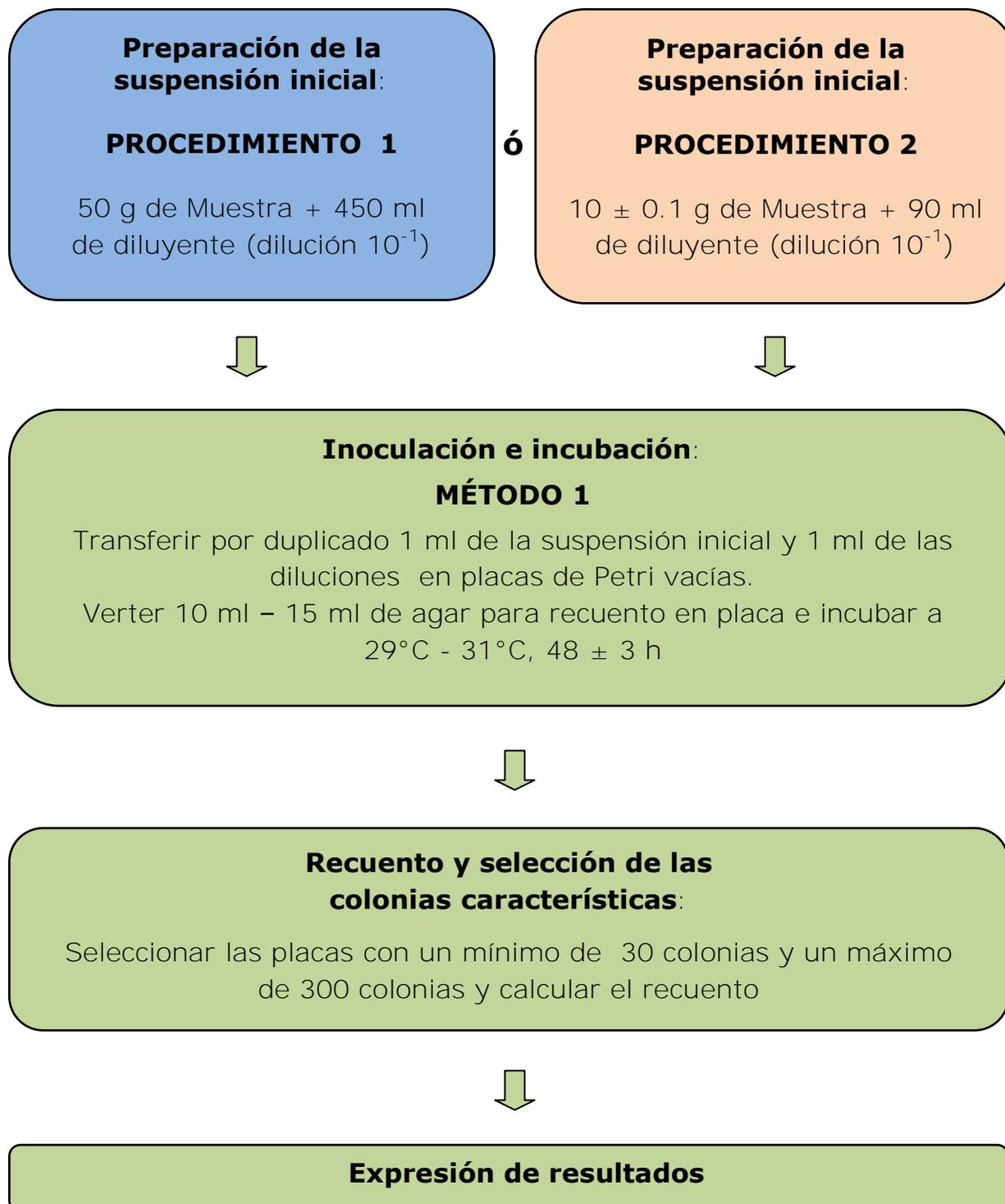
empezando por la izquierda es 5 o superior, se le añade una unidad al segundo dígito (se redondea). Por ejemplo, si el valor calculado es 83.600, este debe hacerse como 84.000 ( $84 \times 10^3$ ).

Los resultados se expresan como UFC de microorganismos aerobios mesófilos por gramos o por mililitro del alimento según corresponda.

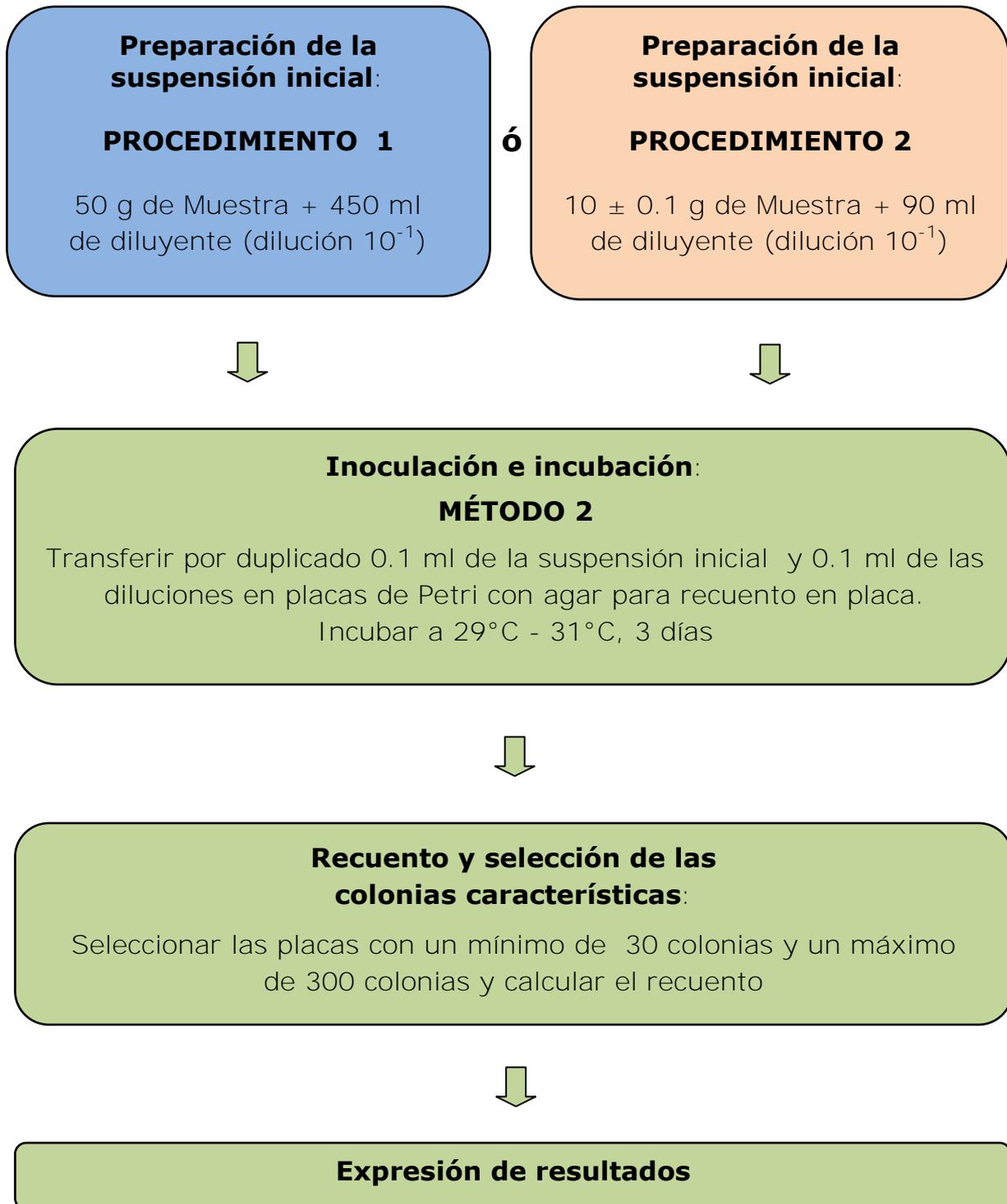
#### 4. ANEXOS

##### ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de microorganismos aerobios mesófilos

###### MÉTODO 1



**MÉTODO 2:**



## **ANEXO 2: Medios de cultivo y reactivos**

### **1. Agua de peptona para diluciones**

**Instrucciones:** Disolver 1 gramo de peptona en 1 litro de agua destilada y ajustar el pH a  $7 \pm 0.1$ . Distribuir en frascos para diluciones o en tubos en volúmenes predeterminados, de tal forma que después del tratamiento en autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos) el volumen sea de  $\pm 2\%$  del deseado; ó, si los recipientes tienen marcado el volumen, reajustar éste de modo aséptico con una pipeta después de la esterilización.

### **2. Agua de peptona salina para diluciones**

Peptona	1 g
Cloruro de sodio	8.5 g

**Instrucciones:** Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada y ajustar el pH a  $7 \pm 0.1$ . Distribuir en frascos de dilución o en tubos, en volúmenes predeterminados, de tal forma que después del tratamiento en autoclave ( $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos) el volumen sea el deseado  $\pm 2\%$ . Si los recipientes estuviesen graduados, reajustar los volúmenes asépticamente con una pipeta después de la esterilización.

### **3. Agar para recuento en placa**

Triptona	5 g
Glucosa	1.0 g
Extracto de levadura	2.5 g
Agar	15 g

**Instrucciones:** Añadir los ingredientes a un litro de agua destilada, calentar hasta la ebullición agitando para obtener la completa disolución, enfriar a  $45^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$  y ajustar la reacción de forma que el pH después de la esterilización sea de  $7.0 \pm 0.1$ . Distribuir en la forma más conveniente y esterilizar en el autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

Este medio existe en el mercado en forma deshidratada; reconstituirlo en la forma indicada en el envase.

**ANEXO 3: FOTOS**



Hongos y Levaduras



Bacterias

**ANEXO 4: REFERENCIAS**

(1) Microorganismos de los Alimentos 1. Su significado y Método de Enumeración 2<sup>da</sup> Ed. ICSMF - 2000.

NOTAS PERSONALES



Handwriting practice area consisting of multiple sets of horizontal dashed lines for writing notes.



# *Mohos y Levaduras*



# Mohos y levaduras

## 1. Generalidades

Los hongos son miembros del reino vegetal que no están diferenciados en raíces, tallos y hojas; carecen del pigmento fotosintético verde, la clorofila. Presenta múltiples formas, incluidos setas, mohos y levaduras.

Comúnmente se da el nombre de moho a ciertos hongos multicelulares filamentosos, dotados de un micelio verdadero, microscópicos, y cuyo crecimiento en los alimentos se conoce fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso.

Los hongos son microorganismos aerobios estrictos, eucarióticos, característicamente miceliares, y heterótrofos con nutrición por absorción, desarrollan en un rango de pH de 2 a 9, temperaturas entre 10 a 35°C y pueden crecer en condiciones de actividad de agua ( $a_w$ ) relativamente bajas ( $<0.85$ ), aunque las levaduras generalmente requieren una mayor actividad de agua.

Asimismo las levaduras son hongos que crecen generalmente en forma de agregados sueltos de células independientes, que pueden ser globosas, ovoides, piriformes, alargadas o casi cilíndricas. En algunos casos, forman cadenas de células alargadas, adheridas de modo suelto, semejantes a un micelio, por lo que se las denomina pseudomicelio. Cuando crecen sobre medios sólidos, forman colonias de aspecto característico que recuerdan a las colonias bacterianas. En casi todas las especies de interés industrial, el modo habitual de reproducción vegetativa es por gemación. Muchas de ellas presentan reproducción sexual por medio de ascosporas y, a diferencia de los mohos, las levaduras no pueden identificarse solamente por sus caracteres morfológicos; se precisa la ayuda de pruebas bioquímicas para la identificación específica.

La importancia de la presencia de mohos y levaduras en los alimentos está determinada por la capacidad de producir diferentes grados de deterioro y descomposición de los mismos. Además los hongos producen metabolitos tóxicos conocidos como micotoxinas, compuestos estables que no se destruyen durante el procesamiento de alimentos, por lo que son responsables de intoxicación con consecuencias graves (cáncer, mutagénesis) en los órganos afectados. También están asociados a reacciones alérgicas e infecciones sobretodo en la población inmunocomprometida, en ancianos y niños.

## **2. Referencias**

(1) Pascual Anderson, M., Calderon y Pascual, V., 2º Edición 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Editorial Díaz de Santos, S. A. Madrid España. Capítulo 16 Joaquín Berenguer Soler. Pág: 141-148.

(2) Hayes, P. R. Microbiología e higiene de los alimentos. Editorial Acribia S. A. España 1993. Capítulo 1. Pág: 1-22.

(3) International Food and Drug Administration "Bacteriological Analytical Manual", BAM Online, enero 2001, capítulo 18.

NOTAS PERSONALES



A series of horizontal dashed lines for taking notes.

# Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras

## Parte 2: Técnica de recuento en placa para productos con actividad de agua menor o igual a 0.95

Procedimiento según International Standard Organization  
ISO 21527-2:2008

### 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la enumeración de mohos y levaduras presentes en productos alimenticios con actividad de agua menor o igual a 0.95.

### 2. ALCANCE

Método horizontal para la enumeración de mohos xerófilos y levaduras osmófilas viables, por la técnica de recuento de colonias en placa a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , en alimentos para el consumo humano y alimentación animal que tengan una actividad de agua igual o menor a 0.95 (frutas secas, mermeladas, carnes secas o saladas, granos, cereales, harinas, especias, condimentos, etc.)

Esta parte de la norma no es aplicable a productos deshidratados con una actividad de agua menor o igual a 0.60 (cereales deshidratados, productos oleaginosos, especias, plantas leguminosas, semillas, bebidas instantáneas

en polvo, productos secos para alimentación animal, etc.) y no permite la enumeración de esporas de mohos.

No es indicada para la enumeración de hongos xerófilos halófilos tales como se encuentran en pescado seco.

### 3. DESARROLLO

#### 3.1. Definiciones

Levaduras osmófilas y mohos xerófilos: hongos capaces de crecer a una actividad de agua menor o igual a 0.95

#### 3.2. Medios de cultivo, equipos y materiales

3.2.1. Caldo agua peptona al 0.1%

3.2.2. Agar dicloran glicerol 18 % (DG18)

- 3.2.3. Estufa de esterilización
- 3.2.4. Autoclave
- 3.2.5. Estufa de incubación capaz de funcionar a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.6. Peachímetro de exactitud 0.01 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .
- 3.2.7. Agitador mecánico (tipo vortex)
- 3.2.8. Microscopio (campo claro, ampliación de 250 a 1000 veces)
- 3.2.9. Lupa (aumento de 6.5 a 50 veces)
- 3.2.10. Baño de agua, o aparato similar, capaz de funcionar a  $44^{\circ}\text{C}$  a  $47^{\circ}\text{C}$
- 3.2.11. Pipetas de 1 ml, graduadas en intervalos de 0.1 ml
- 3.2.12 Erlenmeyer, frascos y tubos, para la preparación y el almacenamiento de los medios de cultivo, y para la realización de las diluciones
- 3.2.13. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro.
- 3.2.14. Ansas de platino/iridio o níquel/cromo de aproximadamente 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables
- 3.2.15. Espátula de Drigalsky
- 3.2.16. Porta y cubreobjetos

#### Opcionales:

- 3.2.17. Cloranfenicol
- 3.2.18. Clorhidrato de clorotetraciclina
- 3.2.19. Elementos traza (ver anexo 2.2)
- 3.2.20. Tergitol
- 3.2.21. Tween 80

### **3.3. Principio**

Se siembra en la superficie de placas con medio de cultivo específico, un volumen de la muestra (si el producto es líquido), o una alícuota de la suspensión inicial (en el caso de otros productos). Si se presume una alta contaminación del alimento se pueden sembrar diluciones decimales del mismo o de la suspensión inicial.

Posteriormente las placas se incuban aeróbicamente a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 7 días.

Luego se cuentan las colonias de hongos desarrolladas. Si es necesario diferenciar levaduras de bacterias, se realiza un examen con una lupa binocular o un microscopio.

El número de levaduras y mohos por gramo o por mililitro de muestra se calcula a partir del número de colonias obtenidas de las placas elegidas en los niveles de dilución que desarrollaron colonias contables. Los mohos y las levaduras se cuentan por separado, si es necesario.

### **3.4. Muestreo**

El ensayo debe realizarse a una muestra representativa que no debe haber sido dañada o cambiada durante el transporte al laboratorio o su almacenamiento. La muestra no debe congelarse. El muestreo no es parte del método especificado en esta parte de la ISO 21527. El muestreo se llevará a cabo de conformidad con la norma internacional específica, adecuada al producto en cuestión. Si no hay una norma internacional específica, se recomienda que las partes interesadas lleguen a un acuerdo sobre este tema.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones (ISO 6887-1:1999)**

##### **3.5.1.2. Suspensión inicial**

El diluyente recomendado es el **Caldo agua peptona al 0.1% (ver anexo 2)**, excepto para muestras que requieran una preparación específica.

Se recomienda el uso de un diluyente con una cantidad suficiente de soluto (ej. una solución al 20% a 35% de glicerol o D-glucosa) para disminuir el shock osmótico de mohos xerófilos y levaduras osmófilas cuando se realizan las diluciones decimales antes de la siembra.

Si la muestra es sólida o el producto lo requiera (ej: un líquido con alta carga microbiana), realizar una suspensión inicial (1/10).

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar  $x \text{ g} \pm 5\%$  ó  $x \text{ ml} \pm 5\%$  de la muestra (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9 \times \text{g}$  ó  $9 \times \text{ml}$  (dilución 1/10) y homogenizar entre 1 a 3 min dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

##### **3.5.1.3. Diluciones decimales**

Transferir con una pipeta  $1 \text{ ml} \pm 5\%$  de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril. Se recomienda utilizar caldo de agua de peptona al 0.1% como diluyente.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta conteniendo el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar preferentemente utilizando un agitador mecánico durante 5 s a 10 s para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación utilizando la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc., diluciones, hasta que se obtenga un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento.

NOTA: Agitar la suspensión inicial y diluciones con el fin de evitar la sedimentación de partículas que contienen microorganismos.

Debido a la rápida sedimentación de las esporas en la pipeta, mantener la pipeta en una posición horizontal (no vertical), cuando se llena con el volumen apropiado de la suspensión inicial y diluciones.

#### **3.5.1.4. Duración del procedimiento**

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiental del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

#### **3.5.2 Inoculación e incubación**

3.5.2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 0.1 ml de la muestra si el producto es líquido ó 0.1 ml de la suspensión inicial (dilución 1/10) por duplicado en placas de **agar dicloran glicerol 18% (DG18)**.

Repetir el procedimiento para las diluciones decimales si es necesario. Para facilitar el recuento de bajas poblaciones de levaduras y mohos, se puede inocular un volumen de hasta 0.3 ml de una dilución  $10^{-1}$ ; o directamente de la muestra si es líquida, en tres placas.

3.5.2.2. Distribuir el inóculo tan pronto como sea posible sobre la superficie del agar con una espátula estéril, hasta que el líquido se absorba completamente en el medio.

NOTA: Se puede utilizar para la siembra el método de placa vertida, pero en este caso se validará la equivalencia de resultados comparando con los de la inoculación en superficie. La discriminación y la diferenciación de mohos y levaduras no son admisibles. El método de siembra en superficie puede dar recuentos más altos. Este permite una máxima exposición de las células al oxígeno atmosférico y evita cualquier riesgo de inactivación térmica de los propágulos fúngicos. Los resultados pueden depender del tipo de hongos.

3.5.2.3 Incubar las placas aeróbicamente sin invertir (con la tapa superior hacia arriba), a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 7 días. Si es necesario. Se recomienda incubar las placas en una bolsa de plástico abierta con el fin de no contaminar la estufa en caso de dispersión de los hongos.

### 3.5.3. Recuento de colonias

3.5.3.1 Realizar el recuento entre el 2° y el 5° día de incubación. Si se han desarrollado mohos de crecimiento rápido, contar el 2° día y luego el 5° y el 7°.

Seleccionar las placas con menos de 150 (generalmente entre 10 y 150):

Si la microflora está compuesta principalmente de mohos se seleccionan las placas dentro del intervalo de recuentos más bajos.

Si la microflora está compuesta principalmente de levaduras se seleccionan las placas que contienen hasta el límite superior de recuento.

Puede llevarse a cabo un examen con una lupa binocular o con un microscopio con el fin de distinguir entre levaduras o mohos y colonias bacterianas.

Contar las colonias de levaduras y las colonias / propágulos de mohos por separado, si es necesario.

Si la identidad de las colonias es dudosa, se examinan preparaciones húmedas o teñidas de células procedentes de un mínimo de 5 colonias por muestra para confirmar que no hay bacterias presentes

NOTA 1: El método de recuento de mohos y levaduras puede ser impreciso ya que el cultivo desarrollado consiste en una mezcla de micelio y esporas asexuales y sexuales. El número de unidades formadoras de colonias dependen del grado de fragmentación del micelio y la proporción de esporas capaces de crecer en el medio en placa.

NOTA 2: La no linealidad de los recuentos de dilución en placas a menudo se produce, es decir, diluciones 1:10 de muestras a menudo no dan lugar a reducciones de 10 veces en los números de colonias recuperadas en el medio.

Esto se ha atribuido a la fragmentación del micelio y la rotura de grupos de esporas durante la dilución, además de la inhibición competitiva cuando un gran número de colonias están presentes en las placas.

**PRECAUCIÓN - Las esporas de hongos se dispersan en el aire con gran facilidad. Manipular las placas de Petri con cuidado**

**para evitar el desarrollo de colonias satélites que darían lugar a una sobreestimación de la población en la muestra.**

#### **3.5.4. Expresión de los resultados**

Según ISO 7218:2007: Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.

3.5.4.1. Se informa **recuento de mohos y levaduras** en la porción de muestra analizada (por mililitros para muestras líquidas, o por gramo para el resto de los productos). Ver Anexo 3: Cálculo y expresión de resultados.

3.5.4.2. Si las dos placas correspondientes a la muestra sembrada (productos líquidos) o a la suspensión inicial (otros productos) no contienen colonias de mohos y/o levaduras, informar el resultado como sigue:

$< 10$  UFC/ ml (productos líquidos)  
 $< 10^2$  UFC/g (otros productos)

Volumen sembrado = 0.1 ml

#### 4. ANEXOS

##### ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento de enumeración de mohos y levaduras

**Preparación de la muestra:** x g de muestra + 9 x ml de diluyente (dilución 1/10) y homogeneización (1 a 3 min)



**Preparación de diluciones decimales:** 1 ml de la suspensión inicial + 9 ml del diluyente (dilución  $10^{-2}$ ). Proceder de igual manera para las siguientes diluciones.



**Inoculación e incubación:** Sembrar una placa por dilución con 0.1 ml de muestra líquida ó suspensión inicial y 0.1 ml de dilución decimal ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , etc.), en placas de Petri con **Agar DG18**. Incubar a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 5 a 7 días.



**Recuento:** Seleccionar las placas con menos de 150 colonias de mohos y/o levaduras (generalmente entre 10 y 150)



**Expresión de resultados**

**ANEXO 2: Medios de cultivo**
**1. Diluyentes: ver norma ISO 6887-1: 1999**
**1.1. Caldo agua peptona al 0.1%**

Digesto enzimático de tejido animal o vegetal	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

pH: 7.0 ± 0.2

NOTA: Es posible agregar al diluyente un agente tensoactivo como el Tween 80 en una concentración al 0.05 % para reducir el aglutinamiento de esporos de mohos y conidias.

**2. Agar Selectivo**
**2.1. Agar dicloran glicerol 18 % (DG18)**

Digesto enzimático de caseína	5.0 g
D-Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O)	0.5 g
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina)	0.002 g
Glicerol anhidro	220 g
Agar	12 - 15 g
Cloranfenicol	0.1 g
Agua destilada	1.000 ml

pH: 5.6 ± 0.2

Preparar las placas con 15 ml de de agar, dejar solidificar, utilizar inmediatamente o conservar en la oscuridad.

**2.2 Agregados opcionales para el Agar dicloran glicerol 18 % (DG18)**

Cloranfenicol (50 mg/l) y clorhidrato de clorotetraciclina (50 mg/l): Cuando existe el problema de un sobrecrecimiento bacteriano como por ejemplo en carne fresca.

Elementos traza: para que los mohos exhiban toda su morfología en especial algunos pigmentos.

Agregar una solución de elementos traza de 1 ml por litro de medio, antes del autoclavado de la siguiente solución:

ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.0 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.5 g
Agua destilada	1.000 ml

Tergitol (1ml/l): para impedir el sobrecrecimiento de *Mucoraceae*

### **ANEXO 3: Cálculo y expresión de resultados (ISO 7218:2007)**

Para placas con un mínimo de 10 colonias y un máximo de 150 colonias el número de microorganismos **N** presentes en la muestra de análisis se calcula como, la media corregida de dos diluciones consecutivas según la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1.1 \times d}$$

**ΣC:** Suma de las colonias contadas en las dos placas escogidas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias.

**V :** Volumen del inóculo utilizado en cada placa en mililitros.

**d :** Es la dilución correspondiente a la primera dilución escogida

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior. Si es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1,0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de mohos y levaduras **N** por mililitro (para los productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

**ANEXO 4: Fotos de hongos desarrollados en Agar Dicloran Glicerol 18 % (DG18)**



*Rhodotorula mucilaginosa*



*Mucor racemosus*



*Saccharomyces cerevisiae*

**ANEXO 5: Ejemplos de la actividad de agua de acuerdo a los productos que se desean analizar**

<b>Actividad de agua</b>	<b>Ejemplos de matrices de alimentos</b>
≥ 0.95	Alimentos altamente perecederos (frutas frescas y en conserva, verduras, carne, pescado), leche, embutidos cocidos, panes, alimentos que contienen hasta 4% de sacarosa o 7% de NaCl (sal).
≥ 0.91	Quesos duros como el Cheddar, carne curada, concentrados de zumos de frutas con adición de 55% de sacarosa y 12% de NaCl.
≥ 0.87	Salchicha fermentada, bizcochos, queso seco, margarina, alimentos que contienen el 65% de sacarosa y 15% de NaCl (sal)
≥ 0.80	La mayoría de los concentrados de zumos de frutas, leche condensada, sirope, harina, tortas de alto contenido de azúcar, legumbres contienen de 15% a 17% de humedad.
≥ 0.75	Mermelada, frutas confitadas, mazapán, malvaviscos, pastel.
≥ 0.65	Copos de avena que contienen 10% de humedad, mermelada, miel, frutos secos.
≥ 0.60	Frutas secas que contienen 15% a 20% de humedad, caramelos, miel, barras de cereales, piensos para perros, alimentos granulados, granos, cereales y productos de cereales.
≥ 0.50	Fideos que contienen 12% de humedad, especias que contienen 10% de humedad.
≥ 0.40	Huevo en polvo entero con 5% de humedad, turrón.
≥ 0.30	Galletas, galletas saladas, masa de pan que contiene 3% a 5% de humedad, salsa base deshidratada.
≥ 0.03	Leche entera en polvo que contiene 2% a 3% de humedad, sopas deshidratadas, café instantáneo.

## ANEXO 6: REFERENCIAS

Para las referencias con fecha sólo se aplica la edición citada. Para las referencias sin fecha se aplica la última edición del documento de referencia (incluyendo cualquier modificación).

**ISO 6887** (todas las partes), Microbiología de los alimentos y piensos - Preparación de muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico.

**ISO 7218**, Microbiología de los alimentos y los piensos Requisitos generales y de orientación para el examen microbiológico.

**ISO 8261**, Leche y productos lácteos - Orientaciones generales para la preparación de las muestras, suspensiones iniciales y diluciones decimales para examen microbiológico.

**ISO / TS 11133** (todas las partes), Microbiología de los alimentos y piensos - Directrices sobre la preparación y producción de medios de cultivo.

**ISO 21527-1**, Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: Técnica de recuento en placa para productos con actividad de agua superior a 0.95 .

NOTAS PERSONALES



A series of horizontal dashed lines for taking notes.

NOTAS PERSONALES



Handwriting practice area with horizontal dashed lines.

# Recuento de unidades formadoras de colonias de Mohos y Levaduras en leche y productos de la leche

## Técnica de recuento en placa a 25°C

Procedimiento según  
International Standard ISO 6611:2004

### 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar la detección y el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) de mohos y/o levaduras viables por la técnica de recuento de colonias en placa a 25°C en muestras de leche y productos de la leche.

### 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar la detección y enumeración de mohos y/o levaduras viables por la técnica de recuento de colonias en placa a 25°C en muestras de:

- leche, productos líquidos de la leche,
- leche deshidratada, suero dulce deshidratado, suero de leche deshidratado, lactosa,
- queso,
- caseína ácida, caseína láctica, caseína de cuajo (caseína rennet),
- caseinato, suero ácido en polvo,
- manteca,
- productos lácteos congelados (incluido helados),
- flanes, postres, leche fermentada y crema.

Nota: Este método no es adecuado para un gran número de levaduras termolábiles (en queso fresco). En tales casos se prefiere el método de siembra en superficie.

**Normas de referencia:** Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el anexo 4. Referencias.

## 3. DESARROLLO

### 3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento, se define a mohos y levaduras como microorganismos que forman colonias a 25°C en medios selectivos bajo las condiciones especificadas en este procedimiento.

### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos (ver anexo 2)

- 3.2.1. Agua de peptona bufferada (APB)
- 3.2.2. Solución salina peptonada (SSP)
- 3.2.3. Solución de Ringer de potencia 1/4x
- 3.2.4. Solución de peptona
- 3.2.5. Solución tamponada de fosfato
- 3.2.6. Solución de citrato sódico
- 3.2.7. Solución de fosfato ácido dipotásico
- 3.2.8. Solución de fosfato ácido dipotásico con agente antiespumante
- 3.2.9. Solución de tripolifosfato sódico
- 3.2.10. Monooleato de sorbitán (polisorbato 80)
- 3.2.11. Diluyente de uso general con solución de alfa-amilasa
- 3.2.12. Agua de peptona tamponada con púrpura de bromocresol
- 3.2.13. Agar extracto de levadura-glucosa-oxitetraciclina (OGA)
- 3.2.14. Agar extracto de levadura-glucosa-cloranfenicol (YGC)
- 3.2.15. Estufa de esterilización (calor seco)
- 3.2.16. Autoclave (calor húmedo)
- 3.2.17. Estufa de incubación: 25°C ± 1°C
- 3.2.18. Peachímetro de exactitud 0.1 a 25°C ± 1°C
- 3.2.19. Baño de agua con capacidad para operar a 45°C ± 1°C
- 3.2.20. Contador de colonias, que consiste de una fuente de luz y un fondo oscuro en la base, equipado con una lente de aumento para ser utilizado con un aumento de 1,5 x, y un contador mecánico ó electrónico digital
- 3.2.21. Pipetas de 1 ml de capacidad y de 10 ml graduadas en intervalos de 0.1 y 0.5 ml respectivamente con filtro de algodón
- 3.2.22. Ansan de platino/iridio o níquel/cromo de aproximadamente 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables
- 3.2.23. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm o bolsas de plástico estériles de capacidad apropiada.
- 3.2.24. Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- 3.2.25. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro o de 140 mm en caso que fuera necesario.
- 3.2.26. Vortex
- 3.2.27. Cuentas de vidrio
- 3.2.28. Varilla de vidrio

### **3.3. Principio** (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.

3.3.2. Las placas se preparan colocando la cantidad establecida de muestra si es líquida o de la suspensión inicial en el caso de otros productos y agregando, por vertido, el medio de cultivo selectivo especificado.

Otras placas se preparan, bajo las mismas condiciones, utilizando las diluciones decimales de la muestra o las diluciones decimales de la suspensión inicial.

3.3.3. Las placas se incuban aeróbicamente a 25°C durante 5 días.

3.3.4. El número de unidades formadoras de colonias (UFC) de mohos y/o levaduras por gramo ó mililitro del producto se calcula a partir del número de colonias obtenidas en las placas elegidas basándonos en la dilución, a fin de obtener un resultado significativo.

### **3.4. Muestreo**

La muestra representativa debe ser enviada al Laboratorio. No debe sufrir daños ni cambios durante su transporte y/o almacenamiento.

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología. El método de muestreo recomendado está desarrollado en la ISO 707.

En quesos madurados utilizando levaduras o recubrimientos de mohos es deseable excluir éste recubrimiento para realizar la toma de muestra para el análisis. En esos casos, el recubrimiento puede removerse utilizando un bisturí ó un cuchillo estériles antes de comenzar el muestreo.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra**

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 5 y las normas específicas para el alimento en cuestión (ver anexo 4. Referencia 3).

##### **3.5.1.1 Productos congelados**

Los productos almacenados congelados deberían descongelarse hasta alcanzar una consistencia que permita su procesamiento, por ejemplo manteniéndolos a una temperatura de 18°C a 23°C (temperatura de Laboratorio) durante un tiempo máximo de 3 h. o a una temperatura de 3°C ± 2°C durante un tiempo máximo de 24 h. Las muestras

deberían procesarse lo más rápido posible una vez descongeladas. Véase la norma ISO 6887-1.

Si el producto se mantiene aún congelado mientras se procesa, puede utilizarse el diluyente (ver anexo 2) a la temperatura del Laboratorio para facilitar su descongelación.

### **3.5.1.2. Productos secos y duros**

Para mezclar productos duros en el Stomacher (3.2.24), la muestra y el diluyente se colocan en dos o más bolsas estériles para evitar que se perforen las bolsas y que se pierda parte de la muestra.

Estos productos no se deben homogeneizar en el Stomacher durante más de 2.5 minutos cada vez. En el caso de productos secos y duros ó heterogéneos, puede ser necesario triturar la muestra (sin diluyente). En éste caso, para evitar un aumento excesivo de la temperatura, no se deben triturar durante más de 1 minuto.

### **3.5.1.3. Productos líquidos y no viscosos**

La muestra para análisis se agita manualmente (ver procedimiento específico para leche y productos lácteos líquidos) ó mecánicamente para asegurar una distribución uniforme de los microorganismos en toda la muestra antes del análisis.

### **3.5.1.4. Productos heterogéneos**

En los productos heterogéneos (que contienen porciones de distintos alimentos) debería recogerse alícuotas de cada componente, representativas de sus proporciones en el producto original.

También se puede homogeneizar toda la muestra de laboratorio para conseguir que la porción para análisis sea más homogénea.

Puede resultar necesario triturar la muestra. En este caso, para evitar un aumento excesivo de temperatura, no se debe triturar durante más de 1 minuto.

## **3.5.2. Suspensión inicial**

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa  $x$  g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen  $x$  ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad).

Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9x$  g ó  $9x$  ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

### **3.5.2.1. Procedimientos generales**

#### **3.5.2.1.1. Caso general para los productos ácidos**

Cuando se utiliza una solución en suspensión de productos ácidos, se verifica que el pH se revierta a un valor neutro. El uso de un diluyente con indicador de pH añadido (3.2.12.) puede evitar la necesidad de utilizar y esterilizar sondas de pH; se añade hidróxido de sodio (NaOH) hasta que el indicador comience a cambiar de color. En los diluyentes tamponados suele ser necesaria la adición del NaOH para aumentar la capacidad tamponante del diluyente. La concentración del NaOH añadido depende de la acidez del producto. La concentración más adecuada (por ej. 0.1 mol/l ó 1 mol/l) es la concentración que todavía mantiene una proporción cercana a 1 a 9 con el diluyente.

#### **3.5.2.1.2. Alimentos de alto contenido en materia grasa (contenido en materia grasa > 20%)**

El uso de un diluyente con una cantidad añadida de monooleato de sorbitán (polisorbato 80) (3.2.10.) entre 1 g/l y 10g/l, en relación aproximada a los niveles de materia grasa (por ej. se añaden 4 g/l para un contenido de materia grasa del 40%) puede mejorar la emulsificación durante la suspensión.

### **3.5.2.2 Procedimientos específicos**

#### **3.5.2.2.1. Leche y productos lácteos líquidos**

La muestra para análisis se mezcla exhaustivamente para que los microorganismos se distribuyan lo más homogéneamente posible invirtiendo el recipiente de la muestra 25 veces. Al invertirlo evitar la formación de espuma o bien esperar a que desaparezca la espuma formada.

El tiempo transcurrido entre la mezcla y la toma de la porción para análisis no debe ser mayor a 3 minutos.

Se retira como mínimo 1 ml de la muestra para análisis con una pipeta estéril y se añade un volumen 9 veces superior del diluyente de uso general (ver anexo 2) Se agita esta solución inicial para obtener una dilución del orden de  $10^{-1}$ .

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.2. Leche en polvo, suero dulce deshidratado, suero de leche deshidratado y lactosa**

Se mezcla exhaustivamente el contenido del recipiente cerrado por agitación repetida e inversión.

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en la botella que contiene el diluyente necesario.

Si la muestra para análisis se presenta en un recipiente original sin abrir y éste está demasiado lleno como para permitir una agitación suficiente, se transfiere a un recipiente de mayor tamaño y se mezcla. Se abre el recipiente, se retira la porción para análisis necesaria con una espátula y se procede según se indica a continuación. El recipiente se vuelve a cerrar inmediatamente.

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en un recipiente de vidrio estéril (por ejemplo un vaso de precipitados) y se añade el material en polvo a la botella de dilución que contiene diluyente de uso general (ver anexo 2). Para el suero de leche agrio se utiliza solución de fosfato ácido dipotásico (3.2.7.) a un pH de  $8.4 \pm 0.2$  o, en caso necesario, para leche en polvo obtenida mediante rodillos (Hatmaker), se utiliza solución de citrato sódico (3.2.6.) o solución de fosfato ácido dipotásico (3.2.7.) a un pH de  $7.5 \pm 0.2$ .

NOTA: Para conseguir una mejor reconstitución, y en particular para leche en polvo obtenida mediante rodillos (Hatmaker), pueden resultar convenientes las cuentas de vidrio (3.2.27.). Si se utilizan, deberían añadirse a la botella antes de su esterilización.

Para disolver la muestra para análisis, se remueve suavemente para humedecer el producto en polvo y a continuación se agita la botella durante unos 7 segundos. Puede utilizarse un Stomacher (3.2.24.) como alternativa a la agitación.

Se deja en reposo durante 5 minutos, agitando ocasionalmente.

El diluyente puede precalentarse a  $45^{\circ}\text{C}$  si no puede conseguirse una suspensión homogénea incluso después de mezclar. Dicho procedimiento adicional se menciona en el informe del análisis.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

### **3.5.2.2.3. Queso y productos elaborados a base de queso**

Se pesan 10 g de la muestra para análisis en un recipiente o bolsa estéril y se procesa en un equipo de mezclado tipo Stomacher (3.2.24.).

Otra alternativa es pesar 10 g de la muestra para análisis en un recipiente estéril y añadir 90 ml del diluyente de uso general (Anexo 2 punto 1) ó como diluyente para el queso, 90 ml de solución de citrato sódico (3.2.6.) ó de solución de fosfato ácido dipotásico (3.2.7.) a un pH de  $7.5 \pm 0.2$ .

Se mezcla hasta que todo el queso quede bien homogeneizado. Se deja en reposo hasta que desaparezca toda la espuma.

El diluyente puede precalentarse a  $45^{\circ}\text{C}$  si no se puede obtener una suspensión homogénea incluso después de mezclar.

Dicho procedimiento adicional se menciona en el informe del análisis.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.4. Caseína ácida, caseína láctica, caseína al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseína rennet) y caseinatos**

##### **3.5.2.2.4.1. Caso general**

Se mezcla exhaustivamente el contenido del recipiente cerrado por agitación repetida e inversión.

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en la bolsa de plástico estéril de un Stomacher (3.2.24.) Se añaden 90 ml del diluyente adecuado a temperatura ambiente, de la siguiente manera:

- a) para caseína ácida y láctica, se diluyen con solución de fosfato ácido dipotásico con agente antiespumante (3.2.8.) a un pH de  $8.4 \pm 0.2$  unidades;
- b) para caseinato, se diluye con solución de citrato sódico (3.2.6) o con solución de fosfato ácido dipotásico (3.2.7.) a un pH de  $7.5 \pm 0.2$  o solución salina peptonada (3.2.2.);
- c) para caseína al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseína rennet), se diluye con solución de fosfato ácido dipotásico con agente antiespumante (3.2.8.) a un pH de  $7.5 \pm 0.2$  unidades.

Se mezcla bien manualmente y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. En caso necesario se mezcla durante 2 minutos en el Stomacher (3.2.24.) utilizando dos bolsas estériles para los productos granulados. Se deja en reposo durante 5 minutos.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

##### **3.5.2.2.4.2. Caso especial: caseína al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseína rennet)**

La caseína al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseína rennet) puede resultar difícil de disolver. Puede utilizarse un protocolo opcional al descrito en el apartado 3.5.2.2.4.1.

El uso de solución de fosfato ácido dipotásico con agente antiespumante (3.2.8.) como diluyente para las caseínas rennet puede no ser eficaz en la disolución de los granos. Dichos granos de caseína dificultan el recuento de microorganismos a 30°C. Por consiguiente, se recomienda el siguiente procedimiento opcional.

En caso necesario, se tritura la caseína seca antes de recoger la porción para análisis. Se transfieren aproximadamente 20 g de la porción para análisis a un recipiente adecuado. Se trituran utilizando un aparato con cuchillas capaz de girar a una frecuencia de aproximadamente 20.000 rpm, equipado con un sistema que prevenga que la muestra se caliente durante la trituración.

Se pesan 5 g de la muestra para análisis preparada de ésta forma en una botella estéril de 250 ml. Se añaden cuentas de vidrio (3.2.27.) para mezclar y 95 ml de la solución de tripolifosfato sódico (3.2.9.) precalentada a 37°C. Se mezcla dejando la botella en el sistema de mezclado durante 15 min. A continuación se introduce en el baño de agua (3.2.19.) calentado a 37°C durante 15 min mezclando de vez en cuando.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.5. Manteca**

Véase la norma ISO 707/IDF 50 si se considera necesario excluir de la investigación la superficie de una muestra de manteca.

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se llevan al recipiente para muestras. El recipiente se introduce en el baño de agua (3.2.19.) calentado a 45°C. Se mantiene dentro del baño de agua hasta que toda la porción para análisis se funde. Se añaden 90 ml del diluyente de uso general (anexo 2 punto 1) calentado a 45°C y se mezcla. Esta operación se realiza más fácilmente en un mezclador tipo Stomacher (3.2.24.). Como opción puede utilizarse solamente la fase acuosa para la dilución de la siguiente manera.

Se recoge una porción para análisis de 50 g que contenga una proporción volumen: masa de agua del  $W\%$ .

Se añaden  $[50 - (50 \times W/100)]$  ml del diluyente de uso general (anexo 2 punto 1) precalentado en el baño de agua (3.2.19.) a 45°C. En éstas condiciones, 1 ml de fase acuosa corresponde a 1g de manteca.

Ejemplo: Para 50 g de manteca con una proporción volumen: masa de agua de aproximadamente el 16%, la fase acuosa representa 8 ml de líquido. Se añaden  $[50 - (50 \times 16/100)] = 42$  ml del diluyente de uso general precalentado en el baño de agua a 45°C.

El recipiente se introduce en el baño de agua calentado a 45°C hasta que se funde la manteca. Se retira del baño de agua, se agita bien y se deja que las fases se separen durante un tiempo no superior a 15 min. En caso necesario, la fase de materia grasa se retira con una espátula o una varilla de vidrio (3.2.28.).

En caso necesario para separar las fases, se transfiere la porción para análisis fundida a un tubo de centrifuga estéril (o bien se funde la porción para análisis directamente en el tubo) y se centrifuga a una frecuencia de rotación que permita la separación de fases. Puede ser necesario retirar asépticamente la fase de materia grasa (superior) utilizando un tubo estéril conectado a una bomba de vacío. Se pipetea de la fase inferior.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.6. Helados**

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en un erlenmeyer o en una bolsa de plástico estéril para Stomacher.

Se añaden 90 ml de diluyente de uso general (anexo 2 punto 1) a temperatura ambiente y se mezcla. El producto se funde a la vez que se mezcla.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.7. Crema de leche y postres en base a leche (pH > 5)**

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en un recipiente de vidrio estéril adecuado con cuentas de vidrio estériles (3.2.27.). Se añaden 90ml del diluyente de uso general (anexo 2 punto 1) a temperatura ambiente y se agita para disgregar. Como opción puede utilizarse un Stomacher (3.2.24).

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.8. Leche fermentada y Crema ácida (pH < 5)**

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en un recipiente de vidrio estéril adecuado con cuentas de vidrio estériles (3.2.27.). Se añaden como diluyente 90 ml de agua de peptona bufferada (3.2.1) o de solución de fosfato ácido dipotásico (3.2.7.) a un pH de  $7.5 \pm 0.2$  a temperatura ambiente y se agita de forma manual. Como alternativa puede utilizarse un Stomacher (3.2.24.).

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

#### **3.5.2.2.9. Polvo para preparar alimentos infantiles a base de leche**

Se mezcla exhaustivamente el contenido del recipiente cerrado por agitación repetida e inversión. Si la muestra para análisis se encuentra en su recipiente original sin abrir y éste está demasiado lleno como para permitir que se mezcle lo suficiente se transfiere a un recipiente estéril de mayor tamaño y se mezcla. Se abre el recipiente, se retira la porción para análisis necesaria con una espátula y se continúa según se indica a continuación. El recipiente se vuelve a cerrar inmediatamente.

Se pesan 10 g de la muestra para análisis y se introducen en un recipiente de vidrio estéril adecuado. Se añade al material en polvo el diluyente de uso general (anexo 2 punto 1) o, para muestras con un alto contenido en almidón, un diluyente para casos especiales (anexo 2 punto 2).

Como opción se pesan 10 g de la muestra para análisis directamente en el recipiente con el diluyente necesario.

El diluyente puede precalentarse a 45°C si no puede conseguirse una suspensión homogénea incluso después de mezclarlo con la muestra. Dicho procedimiento adicional se menciona en el informe.

Para conseguir una mejor reconstitución, podría resultar conveniente el uso de cuentas de vidrio (3.2.27.). Si se utilizan, se añaden al recipiente de vidrio adecuado antes de su esterilización.

Para disolver la muestra, se remueve suavemente para humedecer el producto en polvo y a continuación se agita el recipiente de forma manual durante unos 7 segundos o en forma opcional puede utilizarse un Stomacher (3.2.24.). Se deja en reposo durante 5 min, agitando de vez en cuando.

Se preparan diluciones sucesivas conforme al punto 3.5.3.

Las muestras con un alto contenido de almidón pueden ocasionar problemas debidos a la elevada viscosidad de la solución base.

Se utiliza el diluyente de uso general con solución de alfa amilasa (3.2.11.) para reducir la viscosidad de la solución inicial o bien se utiliza una cantidad doble de diluyente. Esta dilución adicional se toma en consideración en los exámenes posteriores.

### **3.5.3. Diluciones decimales sucesivas (ISO 6887-1:1999)**

Transferir con una pipeta 1 ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril a la temperatura apropiada.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver 3.5.3.).

Cuando se transfieren volúmenes de una dilución inicial viscosa, como las de la caseína ácida o de rennet (3.5.2.2.4.), la pipeta se enjuaga con diluyente aspirando varias veces, utilizando el diluyente del tubo empleado para preparar la dilución decimal.

**IMPORTANTE:** Si el proceso mencionado se realiza sin enjuagar la pipeta cuando se transfiere una dilución inicial viscosa, se transfiere un volumen incorrecto de dilución inicial.

### 3.5.4. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta los dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

### 3.5.5. Inoculación e incubación

3.5.5.1. Tomar dos placas de Petri estériles (3.2.25.). Transferir a cada placa por medio de una pipeta estéril (3.2.21.), 1 ml de la muestra, si es líquida, o 1 ml de la suspensión inicial si se trata de otros productos.

3.5.5.2. Tomar otras dos placas de Petri estériles. Transferir a cada placa utilizando otra pipeta estéril, 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  (en el caso de muestras líquidas) o 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  (en el caso de otros productos).

3.5.5.3. Si es necesario, repetir la operación utilizando diluciones decimales mayores.

3.5.5.4. Vierta aproximadamente 15 ml del medio que contiene clorhidrato de Oxitetraciclina (3.2.13.) o del medio que contiene Cloranfenicol (3.2.14.), previamente calentado y mantenido a 45°C en un baño de agua (3.2.19.), dentro de cada placa de Petri. Evitar verter el medio directamente sobre el inóculo.

3.5.5.5. Cuidadosamente, mezclar el inóculo con el medio por rotación de las placas de Petri y permitir que la mezcla se solidifique dejando la placa de Petri reposar, hasta que se enfríe, sobre una superficie horizontal fría.

3.5.5.6. El tiempo transcurrido entre la preparación de la primera dilución y la mezcla del inóculo con el medio no debe exceder los 15 minutos.

3.5.5.7. Preparar un número suficiente de placas de control para chequear la esterilidad.

3.5.5.8. Después de invertir las placas sembradas, colocarlas (manteniéndola en una posición horizontal) en la estufa (3.2.17.) a 25°C por 5 días.

Para prevenir la propagación debe tomarse algunas precauciones

- La adición de una sobrecapa de medio de cultivo luego de la solidificación del agar sembrado o
- Agregar un papel de filtro con una gota de glicerol en la tapa de la placa.



3.5.5.9. No apilar más de seis placas de Petri. Separar las pilas de placas unas de otras y de las paredes y el techo de la estufa.

### 3.5.6. Recuento y selección de las colonias

3.5.6.1. Enumerar las colonias de cada placa. Evitar incluir en el recuento las colonias bacterianas que pudieran haber crecido de manera ocasional.

Si es necesario distinguir las colonias de mohos de las colonias de levaduras, sobre la base de sus características morfológicas.

3.5.6.2. Seleccionar sólo las placas que contiene por lo menos 10 y no más de 150 colonias. Si parte de las placas está cubierta por mohos, o si es difícil el recuento de colonias aisladas, contar las colonias de las placas de la siguiente dilución, aunque su número sea menor que 10. En éste último caso proceda como en 3.5.8.2.

### 3.5.7. Confirmación

La identidad de las colonias dudosas ó muy pequeñas se investigará por microscopía.

Si fuera necesario, confirmar **por microscopía como mínimo  $\sqrt{n}$** , siendo n el número de colonias contadas.

### 3.5.8. Expresión de los resultados (ISO 7218:2007- ver anexo 4 referencia 4)

3.5.8.1. Seleccionar las placas que contiene por lo menos 10 y no más de 150 colonias.

Calcular el número de UFC de mohos y/o levaduras, N, por gr ó por ml de producto, utilizando la siguiente fórmula:

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

donde:

**$\sum c$ :** es la sumatoria de las colonias contadas en las placas seleccionadas;

**$n_1$ :** es el número de placas seleccionadas de la primera dilución que tienen entre 10 y 150 colonias;

**$n_2$ :** es el número de placas seleccionadas de la segunda dilución que tienen entre 10 y 150 colonias;

**d:** es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución.

En el caso de que haya más de dos diluciones cuyo recuento se encuentre entre 10 y 150 colonias la fórmula deberá ser modificada teniendo en cuenta la dilución adicional. Para tres diluciones la fórmula será la siguiente:

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

donde:

**n<sub>3</sub>**: es el número de placas seleccionadas de la tercera dilución que tienen entre 10 y 150 colonias.

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas.

Cuando se realiza la operación, si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior; si la tercera cifra es igual ó superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

El resultado se expresa como UFC de mohos y/o levaduras por ml ó por gr del producto, tomando como resultado un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada.

Ejemplo:

El recuento en UFC de mohos y levaduras ha proporcionado los siguientes resultados (se incubaron dos placas de Petri por dilución):

- Para la primera dilución seleccionada ( $10^{-2}$ ), 83 y 97 colonias;
- Para la segunda dilución seleccionada ( $10^{-3}$ ), 33 y 28 colonias:

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

$$= \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10.954$$

Redondeando el resultado como se especifica en 3.5.5.1.

En el ejemplo dado se expresa de la siguiente manera: 11.000 ó  $1.1 \times 10^4$  UFC de mohos y/o levaduras por gr ó ml del producto.

3.5.8.2. Si las dos placas correspondientes a la muestra analizada (producto líquido) ó a la suspensión inicial (otros productos) contienen menos de 10 colonias, se informa el resultado de la siguiente manera:

- menor a 10 UFC de mohos y/o levaduras por ml. (productos líquidos);
- menor a  $10 \times 1/d$  UFC de mohos y/o levaduras por gr (otros productos), siendo d el factor de dilución de la suspensión inicial.

3.5.8.3. Si sólo hay placas conteniendo más de 150 colonias se realiza un recuento estimativo de las placas que contienen alrededor de 150 colonias y se multiplica el número estimado por la recíproca del valor que corresponde a la dilución más alta. Se expresa el **resultado como "número estimado de UFC de mohos y/o levaduras por gr ó por ml del producto"**.

#### 4. ANEXOS

##### **ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de mohos y/o levaduras**

**Preparación de la muestra:** x g de muestra + 9 x ml de diluyente (dilución 1/10) y diluciones sucesivas.



**Inoculación e incubación:** transferir por duplicado 1 ml. de las diluciones preparadas en placas con OGA o YGC. Incubar a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , durante 5 días.



**Recuento y selección de las colonias características:**  
seleccionar las placas con un máximo de 150 colonias y hasta 2 diluciones sucesivas. Realizar el recuento.



**Expresión de resultados**



**ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos****1. Diluyentes de uso general****1.1. Agua peptona bufferada (BPW)**

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**1.2. Solución salina peptonada (SFP)**

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**1.3. Solución de Ringer de potencia 1/4x**

Cloruro de sodio (NaCl)	2.25 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.105 g
Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> ) anhidro	0.06 g <sup>(a)</sup>
Carbonato ácido de sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	0.05 g
Agua destilada estéril	1000 ml

(a) Como alternativa, se utilizan 0.12g de CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

**1.4. Solución de peptona**

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la peptona en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

### 1.5. Solución tamponada de fosfato

Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	42.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en 500 ml de agua destilada. Luego diluir hasta 1000 ml con el resto del agua. La solución concentrada se almacena refrigerada. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Para utilizar como diluyente se añade 1ml de la solución concentrada a 1000ml de agua. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 15 minutos.

## 2. Diluyentes de uso especial

Estos diluyentes deben utilizarse solamente para la preparación de las suspensiones iniciales

### 2.1. Solución de citrato sódico

Citrato trisódico dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en el agua, calentando en caso necesario a una temperatura de  $45$  a  $50^{\circ}\text{C}$ . Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de  $7.5 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ . Esta solución se utiliza para la leche en polvo obtenida mediante rodillos, el queso y para algunos caseinatos.

### 2.2. Solución de fosfato ácido de potasio

Fosfato dipotásico monoácido ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en el agua, calentando en caso necesario a una temperatura de  $45$  a  $50^{\circ}\text{C}$ .

Para el suero agrio en polvo, se ajusta el pH de forma que para la dilución inicial tras la esterilización, sea de  $8.4 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Para el queso, la leche en polvo obtenida mediante rodillos, la leche fermentada, los caseinatos y la crema agria, se ajusta el pH de forma que tras la esterilización sea de  $7.5 \pm 0.2$  a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Esta solución se utiliza para el queso, la leche en polvo obtenida mediante rodillos, la leche fermentada, algunos caseinatos, el suero agrio en polvo y la crema agria.

### 2.3. Solución de fosfato ácido dipotásico con agente antiespumante

#### 2.3.1. Solución de fosfato dipotásico monoácido

Fosfato dipotásico monoácido ( $K_2HPO_4$ )	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en el agua, calentando en caso necesario a una temperatura de 45 a 50°C.

#### 2.3.2. Solución concentrada de antiespumante

Polietilenglicol 2000	1 g
Agua destilada	100 ml

Disolver el polietilenglicol en el agua y mezclar.

Añadir 1 ml de la solución concentrada del antiespumante (2.3.2.) a 1L de la solución de  $K_2HPO_4$  (2.3.1.).

Ajustar el pH de forma que la dilución inicial tanto para la caseína láctica como ácida, tras la esterilización, sea de  $8.4 \pm 0.2$  a 25°C, y para la caseína al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseína rennet), tras la esterilización, sea de  $7.5 \pm 0.2$  a 25°C.

Esta solución se utiliza para caseína ácida, caseína láctica y caseínas al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseínas rennet).

### 2.4. Solución de tripolifosfato sódico

Tripolifosfato sódico ( $Na_5O_{10}P_3$ )	20.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver la sal en el agua, calentando en caso necesario. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Almacenar a una temperatura de 5°C  $\pm$  3°C durante un máximo de un mes.

Esta solución se utiliza como diluyente alternativo para caseínas al cuajo mediante hidrólisis enzimática (caseínas rennet) difíciles de disolver.

### 2.5. Diluyente de uso general con solución de alfa amilasa

Añadir 12.5 mg de alfa amilasa, de una actividad específica de aproximadamente 400 unidades <sup>(1)</sup> por miligramo sobre 225 ml del diluyente de uso general. Este diluyente se utiliza para una porción de muestra para análisis de 25 g. Se utilizan cantidades proporcionales para la preparación de porciones de ensayo diferentes (por ejemplo, para una porción para análisis de 10 g se añaden 5 mg de alfa amilasa sobre 90ml de diluyente de uso general).

Esta solución se utiliza para alimentos que contienen almidón.

(1) Esta unidad (frecuentemente denominada Unidad Internacional o Unidad Estándar) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto en condiciones normales.

## 2.6. Agua de peptona tamponada con púrpura de bromocresol

Agua de peptona tamponada (1.1)	1000 ml
Púrpura de bromocresol (solución en alcohol al 4%, por ej. solución etanólica)	0.1ml

Añadir la solución de púrpura de bromocresol al agua peptonada.

Esta solución se utiliza con ciertos productos ácidos de forma que el ajuste de pH se pueda realizar sin el uso de una sonda de pH estéril (3.5.2.1.1.).

El púrpura de bromocresol es amarillo a pH ácido, virando a púrpura a un pH superior a 6.8 .

## 3. Medios de cultivo

### 3.1. Extracto de levadura glucosa oxytetraciclina (OGA)

#### 3.1.1. Medio base

Extracto de levadura en polvo	5.0 g
Glucosa ( $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ )	20.0 g
Agar	10 - 15g <sup>a</sup>
Agua destilada	900 ml

<sup>a</sup> Dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 6.6 a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

#### 3.1.2. Solución de oxitetraciclina

Clorhidrato de oxytetraciclina ( $C_{22}H_{30}O_{11}.HCl$ )	50.0 mg
Agua destilada	50 ml

Disolver el clorhidrato de oxytetraciclina en agua. Preparar la solución en el momento de su uso. Esterilizar la solución por filtración.

### 3.1.3. Medio completo

Solución de clorhidrato de oxytetraciclina	10ml
Medio base	90 ml

Calentar el medio base esterilizado a 45°C. Llevar la solución de oxitetraciclina a 45°C y añadir asepticamente 10 ml de ésta solución a 90 ml del medio base.

### 3.2. Extracto de levadura glucosa cloranfenicol (YGC)

Extracto de levadura en polvo	5.0 g
Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ )	20.0 g
Cloranfenicol ( $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ )	0.1 g <sup>a</sup>
Agar	10 - 15g <sup>b</sup>
Agua destilada	1000 ml

a Para obtener una concentración final de 100 µg/ml en el medio

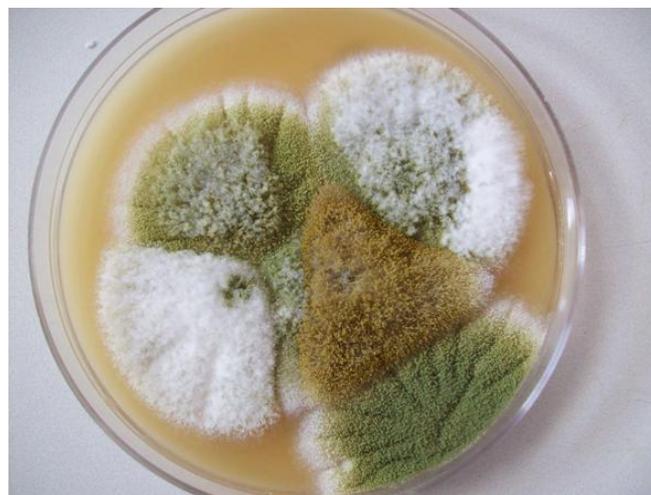
b Dependiendo de la firmeza del agar

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH si es necesario para obtener un valor después de la esterilización de 6.6 a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 3 : FOTOS

**Medio YGC**

hongos provenientes de muestras de helado



## ANEXO 4 : REFERENCIAS

(1) International Standard. ISO 6611: 2012. Milk and milk products. Enumeration of colony – forming units of yeasts and/or molds – Colony – count technique at 25°C. 2004.

(2) International Standard. ISO 6887 – 1. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. First edition, 1999-02-15.

(3) International Standard. ISO 6887 – 5. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products. 2010. Esta norma anula y sustituye a la Norma ISO 8261:2002.

(4) International Standard. ISO 7218: 2007. Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 2007-08-15.

**NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).**

**ISO 6887-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions

**ISO 6887-5**, Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products

**ISO 7218**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

**ISO/TS 11133-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

**ISO/TS 11133-2:2003**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.

# Recuento de mohos y levaduras muestras de alimentos

## Técnica de recuento en placa

Procedimiento según APHA 2001. Capítulo 20.

### 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de mohos y levaduras por la técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos.

### 2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica para realizar el recuento de mohos y levaduras por la técnica de recuento de colonias en placa en muestras de alimentos.

### 3. DESARROLLO

#### 3.1. Definiciones

Para el propósito de este documento, se define a mohos y levaduras como microorganismos que forman colonias en medios selectivos bajo las condiciones especificadas en este procedimiento.

#### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Estufa de esterilización
- 3.2.2. Autoclave
- 3.2.3. Balanza
- 3.2.4. Contador de colonias
- 3.2.5. Frascos de 150 ml de capacidad
- 3.2.6. Estufa de incubación
- 3.2.7. Agitador mecánico o vortex
- 3.2.8. Placas de Petri de 100 x 15 mm
- 3.2.9. Pipetas
- 3.2.10. Tips para pipetas
- 3.2.11. Heladera
- 3.2.12. Termómetros
- 3.2.13. Baño de agua
- 3.2.14. Espátulas de vidrio
- 3.2.15. Buffer fosfato de Butterfield

- 3.2.16. Agua peptona al 0.1 %.
- 3.2.17. Agar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) para alimentos con actividad de agua < 0,95
- 3.2.18. Agar Dicloran 18 % Glicerol (DG 18) para alimentos con actividad de agua  $\leq 0.95$
- 3.2.19. Agar plate count (PCA)

### 3.3. Principio (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

- i. Preparación del homogenato, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas
  - ii. Inoculación e incubación
- 3.3.1. Recuento y selección
  - 3.3.2. Confirmación
  - 3.3.3. Expresión de resultados

### 3.4. Muestreo

El plan de muestreo a utilizar está fuera del alcance de esta metodología.

### 3.5. Procedimiento

#### 3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones

##### 3.5.1.1. Preparación de la muestra

Las muestras líquidas o semilíquidas en recipientes que tienen un espacio de aire pueden ser mezcladas invirtiendo rápidamente el envase de la muestra 25 veces. Los envases de las muestras que están 2/3 a 3/4 llenos deberán ser agitados 25 veces en 7 segundos en un radio de 30 cm. El intervalo entre el agitado y la remoción de la porción para el ensayo no deberá exceder los 3 minutos. Para asegurarse una muestra homogénea cuando no hay espacio de aire presente, abrir asépticamente el envase y verter el producto del envase lleno a otro estéril ida y vuelta tres veces.

Las muestras en polvo deben ser asépticamente revueltas con una cuchara estéril o espátula u otro utensilio para asegurar una muestra homogénea.

##### 3.5.1.2. Suspensión inicial

3.5.1.2.1. Muestras líquidas: para productos líquidos no viscosos (por ejemplo de viscosidad no mayor a la de la leche) transferir con una pipeta estéril 11 ml de la muestra a un frasco con 99 ml del

diluyente. Si la pipeta se contamina antes de completar la transferencia, reemplazarla por otra estéril. No introducir la pipeta más de 2.5 cm debajo de la superficie de la muestra. La pipeta deberá ser vaciada en el diluyente permitiendo que la columna escurra desde la marca de la graduación al punto inferior de la pipeta dentro de los 2 a 4 segundos, entonces tocar el borde inferior de la pipeta contra el cuello del recipiente del diluyente. No soplar la última gota o enjuagar la pipeta en el líquido de la dilución.

Para productos con una viscosidad similar a la de la leche, la última gota deberá caer de la pipeta.

Para productos líquidos viscosos pesar 11 g de la muestra en 99 g del diluyente. Esto corresponde a una dilución 1:10.

3.5.1.2.2. Muestras sólidas: Pesar 11 g de la muestra en un recipiente estéril y agregar 99 ml del diluyente.

Se puede sembrar una cantidad mayor de la muestra y agregar una cantidad necesaria del diluyente para llegar a una dilución 1/10 (ej. 50 g de muestra en 450 ml del diluyente)

3.5.1.2.3. Pueden usarse una variedad de diluyentes dependiendo de la naturaleza del producto. Los más comúnmente usados son el buffer fosfato de Butterfield y peptona al 0.1 %.

Agitar por 2 minutos a baja velocidad (aproximadamente 8000 rpm) para dispersar el material. El tiempo de agitación puede variar dependiendo del tipo de alimento. Algunos agitadores pueden operar a velocidades menores a 8000 rpm. Es preferible usar inicialmente una velocidad mayor por pocos segundos. No se deberá demorar más de 15 minutos desde el momento en que la muestra es agitada hasta hacer todas las diluciones en el medio apropiado.

### **3.5.1.3. Diluciones decimales**

Transferir con una pipeta 1 ml de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se hacen las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento.

## **3.5.2. Inoculación e incubación**

### **3.5.2.1. Agar DRBC**

3.5.2.1.1. Se recomienda agregar al agar DRBC, cloranfenicol 100  $\mu\text{g/ml}$ . El agregado puede hacerse antes de la esterilización en autoclave.

3.5.2.1.2. Se vierten 15 - 20 ml del medio en placas de Petri de 9 cm de diámetro y luego de se secan a temperatura ambiente por una noche (21 - 25°C). Almacenar las placas de DRBC en la oscuridad para evitar la fotogeneración de inhibidores a partir del colorante rosa de bengala.

3.5.2.1.3. Inocular 0.1 ml de la dilución decimal apropiada por duplicado sobre el agar solidificado y distribuir en toda la superficie usando una espátula de vidrio estéril.

Si el recuento estimado de la muestra es menor a 100 UFC/g o ml, inocular 1 ml dividiendo el volumen en cuatro placas, tres con 0.3 ml y una con 0.1 ml.

3.5.2.1.4. Incubar las placas sin invertir por 5 días a 22 - 25°C en pilas de no más de 3 placas; sin tocar hasta que las colonias puedan contarse, ya que el movimiento de las placas puede provocar un crecimiento secundario (debido al desplazamiento de esporas) e invalidar el resultado final. Contar las placas que contengan entre 15 - 150 colonias. Contar por el lado inferior de la placa luego que el desarrollo de hongos haya ocurrido.

En la placa seleccionada, contar separadamente las colonias con aspecto filamentosas, algodonosas o pulverulentas lo que es característico de los mohos y registrar el resultado.

En la misma placa, las colonias remanentes pueden ser levaduras o bacterias. Seleccionar al menos cinco colonias y verificar la morfología de las células al microscopio, observando si el cultivo es de levaduras, bacterias o una mezcla de ambos. Determinar el número de levaduras.

Para calcular el número total de mohos y levaduras, sumar al número de colonias de mohos el número confirmado de levaduras y multiplicar por la inversa de la dilución.

3.5.2.1.5. Informar el recuento como UFC por gramo o ml de muestra.

### **3.5.2.2. Agar PCA suplementado con cloranfenicol**

El método es igual al descrito en 3.5.2.1. excepto que el agar PCA es suplementado con 100  $\mu\text{g/ml}$  de cloranfenicol y las placas no necesitan ser almacenadas en la oscuridad.

### **3.5.2.3. Agar DG18**

Cuando son testeados alimentos con baja actividad acuosa tales como cereales, harinas, nueces y especias, el agar DG18 es el mejor porque permite que los hongos xerófilos sean enumerados. El método es similar al descrito en 3.5.2.1, pero las placas no necesitan ser almacenadas en la oscuridad.



## 4. ANEXOS

### ANEXO 1: Medios de cultivos y reactivos

#### 1. Agua peptona bufferada (BPW)

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

#### 2. Agua peptona al 0.1%

Peptona	1.0 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua destilada. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.1$  a  $25^\circ\text{C}$ . Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

#### 3. Buffer fosfato de Butterfield

##### 3.1. Solución stock

Potasio dihidrógeno fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	34 g
Agua destilada csp	1000 ml

Disolver el fosfato monopotásico en 500 ml de agua. Ajustar el pH a  $7.2 \pm 0.2$  con 175 ml con solución de NaOH 1N. Diluir a un litro y esterilizar  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Almacenar en heladera.

##### 3.2. Buffer fosfato de Butterfield

Solución stock	1,25 ml
Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Tomar 1.25 ml de la solución stock preparada y llevar a un litro de volumen con agua. Dispensar en botellas y esterilizar por 15 minutos a  $121^\circ\text{C}$ .

#### 4. Agar dicloran – rosa de bengala cloranfenicol (DRBC)

(Dichloran – rose bengal chloramphenicol agar)

Digesto enzimático de tejido animal	5.0 g
D-glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	0.5 g
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) (1 ml de una solución al 2 % p/v en etanol)	0.002 g
Rosa de bengala (0.5 ml de una solución al 5 % p/v en agua)	0.025 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Dispensar los ingredientes en agua y hervir hasta disolver el agar. Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

pH final: 5.6 ± 0.2

Almacenar el medio preparado en la oscuridad para evitar la descomposición del rosa de bengala. Las soluciones de rosa de bengala y dicloran no necesitan esterilización y son estables por largos períodos.

**Precaución,** el cloranfenicol es tóxico; el contacto con la piel deberá evitarse.

Preparar las placas con 15 ml de agar, dejar solidificar, utilizar inmediatamente o conservar en la oscuridad

#### 5. Agar dicloran glicerol 18 % (DG18)

Digesto enzimático de caseína	5.0 g
D-gGlucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	10.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.0 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	0.5 g
Dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) (1 ml de una solución al 2 % p/v en etanol)	0.002 g
Glicerol anhidro	220 g
Agar	20 g
Cloranfenicol	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Suspender los ingredientes excepto el glicerol en 800 ml de agua grado reactivo y calentar hasta disolver el agar antes de añadir el

agua para llegar a un litro. Añadir el glicerol y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

pH final:  $5.6 \pm 0.2$

Preparar las placas con 15 ml de agar, dejar solidificar, utilizar inmediatamente o conservar en la oscuridad.

### **6. Agar Plate Count (PCA) con cloranfenicol**

Triptona	5 g
Extracto de levadura	2.5 g
Dextrosa	1 g
Agar	15 g
Cloranfenicol	0.1 g
Agua destilada	1000 ml

Suspender los ingredientes en agua, calentar hasta ebullición para disolver el agar y esterilizar a 121°C por 15 minutos.

**ANEXO 2: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de mohos y levaduras**

**Homogeneización:** 11 g de muestra + 99 ml del diluyente (dilución 1/10)



**Preparación de diluciones decimales:** transferir 1 ml de la dilución 1/10 a 9 ml del diluyente (dilución 1/100) y así sucesivamente



**Inoculación e incubación:** transferir por duplicado 0,1 ml de las diluciones preparadas en placas de Petri con DRBC o DG 18, Incubar a 22 - 25°C, 5 días



**Recuento y selección de las colonias características:** seleccionar en las placas las colonias típicas de mohos y contar. Para el recuento de



**Confirmación**

Confirmar por observación microscópica las colonias presuntivas de levaduras. En base al % de colonias confirmadas estimar el recuento de levaduras



**Expresión de resultados**

Sumar el número de colonias de mohos y el de levaduras para informar el recuento en UFC/g o ml

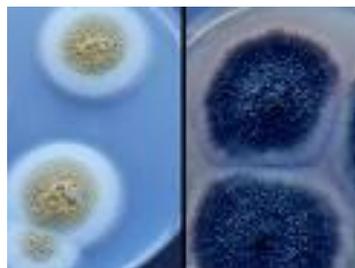
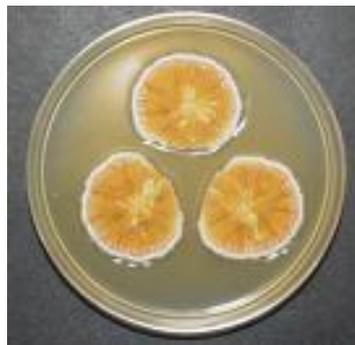
## ANEXO 3: FOTOS

### 1. Agar PCA con cloranfenicol

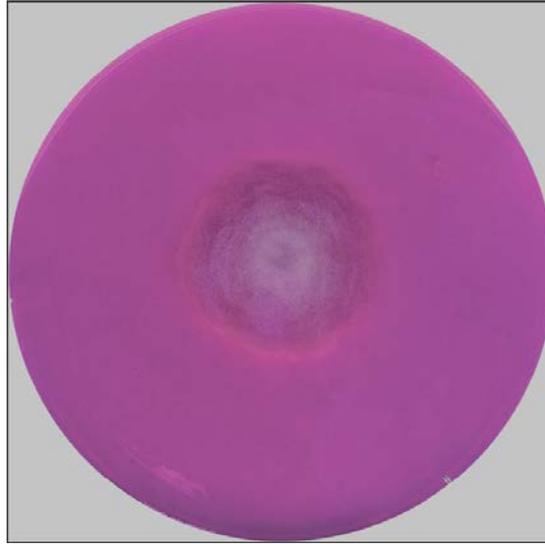
1.1. Las levaduras en el interior del medio desarrollan como colonias redondas y lenticulares



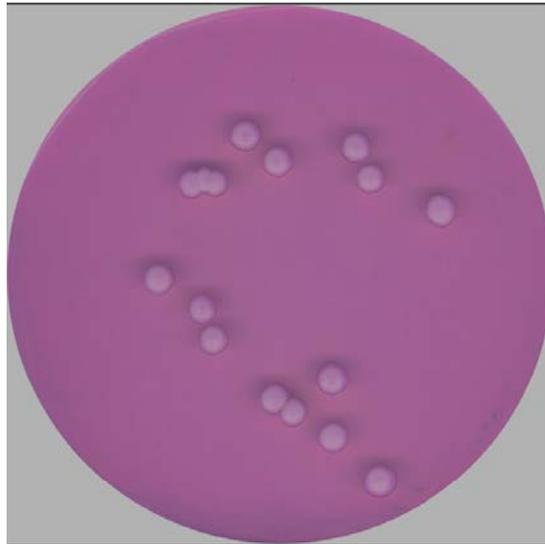
1.2. Los mohos desarrollan en la superficie del medio como propágulos o gérmenes planos o afelpados (vellosos) o con cuerpos de fructificación o esporangios coloreados. Los mohos en el interior del medio pueden desarrollar como colonias redondas y lenticulares.



2. Agar Dicloran – rosa de bengala cloranfenicol (DRBC)



*Mucor racemosus*



*Saccharomyces cerevisiae*

3. Agar Dicloran glicerol 18% (DG18)



*Rhodotorula mucilaginosa*



*Mucor racemosus*



*Saccharomyces cerevisiae*

#### **ANEXO 4: REFERENCIAS**

- (1) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 4a. edición, 2001, American Public Health Association
- (2) Microbiological Examination Methods of Food and Water, A Laboratory Manual, Neusely da Silva y colaboradores, Institute of Food Technology - ITAL, Campinas, SP, Brazil.

NOTAS PERSONALES



Handwriting practice area with horizontal dashed lines.



## **Anaerobio Sulfito Reductores**



# Anaerobios sulfito reductores

## 1. Generalidades

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo bacteriano asociado al género *Clostridium*. Se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos, formadores de esporas que tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados, formando colonias negras características. Generalmente, las células vegetativas tienen forma de bacilos, pudiendo variar desde bacilos cocoides cortos a largos bacilos filamentosos. Pueden aparecer sueltos, en parejas o en cadenas.

La mayoría son móviles por flagelos peritricos, (con la excepción de *C. perfringens*) son de tamaño variable midiendo 0.3 – 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.5 - 20  $\mu\text{m}$  de longitud. Las esporas pueden ser central, subterminal y terminal, resistentes al calor. Son Gram positivos en cultivos jóvenes pero se decoloran en los envejecidos.

A pesar de ser bacterias anaerobias obligadas, no todos tienen la misma sensibilidad al oxígeno. Crecen a temperatura de 37°C, la actividad acuosa ( $a_w$ ) mínima para su desarrollo es 0.95<sup>(1)</sup> y a un pH entre 7 y 7.4, de modo que son fácilmente inactivadas a pH ácido o básico, como el ácido estomacal, el de limpiadores y desinfectantes como el cloro e incluso el pH de ácidos orgánicos.

Los *Clostridium* no tienen un sistema citocromo completo y por lo tanto son oxidasa negativa. La mayoría de las cepas son catalasa y superóxidodismutasa (SOD) negativa, aunque se han reportado pequeñas cantidades de actividad para algunas especies.

*Clostridium spp.* tienen diversas vías metabólicas y pueden ser sacarolíticos, proteolíticos, ambos o ninguno. Los productos finales del metabolismo fermentativo son mezclas de ácidos y alcoholes, una característica que se puede utilizar para fines de identificación en el laboratorio.

Las exotoxinas extracelulares y enzimas producidas por *Clostridium* son los principales factores de virulencia. Los *Clostridium* producen una mayor diversidad de toxinas que cualquier otro género de bacterias.

## 2. Taxonomía

La clasificación taxonómica según el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP), ubica a los *Clostridium* en el



Phylum Firmicutes, Clase *Clostridia*, Orden *Clostridiales*, familia *Clostridiaceae*, género *Clostridium*.<sup>(2)</sup>

La clasificación de los microorganismos pertenecientes a este género se ha establecido tradicionalmente de acuerdo con las características morfológicas, culturales y bioquímicas, asociación con determinadas enfermedades, patogenicidad, toxigenicidad y propiedades serológicas.

En los últimos tiempos, ésta clasificación se basa en homologías existentes en la secuencia del ADN y del ARN ribosómico 16S. La amplia variedad en el contenido de guanina y citosina del ADN (% de G+C) de las especies del género *Clostridium* sugiere que éste podría dividirse al menos en dos géneros: las especies con un contenido en G+C del 22 % al 34 % y aquellas que tienen de 40 % a 55 %.

Actualmente, en la Lista de nombres procariotas del Manual de Bergey (LPSN), "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" año 2014-1 se citan 203 especies y 5 subespecies del género *Clostridium spp* de las cuales, cerca de 30 especies son potencialmente patógenos para el hombre.

### 3. Reservorio

Las bacterias del género *Clostridium* son ubicuas en el medio ambiente, y sus esporas se encuentran habitualmente en el suelo, polvo, sedimentos, medio acuático, vegetación en descomposición y en el tracto digestivo de los animales, incluido el hombre. En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, tanto crudos, como parcialmente tratados tales como: las carnes curadas (principalmente embutidos), conservas, fermentados, ahumados, productos envasados al vacío, semiconservas vegetales y las especias.

Las esporas de *Clostridium* explican su persistencia en ambientes hostiles y también su adquisición exógena por los seres humanos.

### 4. Etiología

Las especies del género *Clostridium* comúnmente asociadas a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son: *Clostridium botulinum* cuya toxina afecta al sistema nervioso, causando la toxiinfección llamada botulismo y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo.

La intoxicación por *C. perfringens* es generalmente breve, autolimitada y rara vez es mortal. Sin embargo, las neurotoxinas de *C. botulinum* se encuentran entre los más tóxicos de sustancias que

se producen naturalmente y causa graves enfermedades, a veces mortales, con síntomas persistentes durante varios meses.

En los alimentos, recuentos elevados de los anaerobios sulfito-reductores pueden indicar la existencia de éstos patógenos. Además, evidencian una posible deficiencia en las buenas prácticas de fabricación a lo largo del proceso de transformación, o materia prima de baja calidad.

Debido a las características que poseen los anaerobios sulfito-reductores se suelen usar como indicadores de la calidad higiénica del agua y de los alimentos.

## 5. Determinación

La detección de *Clostridium* sulfito reductores, así como el recuento, se puede hacer:

- investigando la presencia de formas vegetativas y esporuladas, conjuntamente.
- investigando la presencia de formas esporuladas, únicamente.

La detección y el recuento se realiza utilizando medios de cultivo que en su fórmula contienen sulfito de sodio, sobre el cual estos microorganismos, ejercen su acción reductora transformándolo en sulfuro que al actuar sobre el hierro forma sulfuro de hierro. La presencia de sulfuro de hierro se pone de manifiesto por la aparición del color negro de las colonias.

El cultivo de los *Clostridium* exige una atmosfera exenta de oxígeno, lo que se consigue:

- Con la regeneración de los medios de cultivo antes de ser sembrados. Por el cultivo en anaerobiosis
- Mediante jarras para anaerobiosis
- Por la obturación del medio sembrado con una capa de parafina estéril
- Por la siembra en profundidad del medio

Para obtener únicamente las formas esporuladas de *Clostridium* sulfito reductores, se aprovecha su termorresistencia, calentando a 80°C el producto, la suspensión madre o las diluciones decimales. De esta manera, se destruyen las formas vegetativas.

## 6. Legislación

El Código Alimentario Argentino (C.A.A.) establece la detección o el recuento de anaerobios sulfito reductores para diversos alimentos.

Los productos comprendidos en salazones y chacinados, están sujetos, para su análisis microbiológico, aun programa de atributos de 3 clases, que incluye al Recuento de anaerobios sulfito reductores.

La metodología que establece el C.A.A. para el análisis de estos alimentos cárneos, es la Norma ISO 15213:2003.

## **7. Referencias**

(1) <sup>(1)</sup>Sven-Olof Enfors, (2008), Food Microbiology. The ecological basis of food spoilage, cap. 2 KTH – Biotechnology Stockholm p. 12.

(2) <sup>(2)</sup>George M. Garrity et al (2007) Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea (Formerly the Taxonomic Outline of the Prokaryotes).

(3) Health Protection Agency (2008) IDENTIFICATION OF CLOSTRIDIUM SPECIES National Standard Method (NSM) BSOP ID 8 Issue nº: 3.

(4) EFSA (2005) Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission related to Clostridium spp. in foodstuffs.

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/199.pdf>

(5) Pascual Anderson, M.R. & Calderón y Pascual V. (2000) Microbiología Alimentaria, Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas 2 edición, Investigación y recuento de Clostridium sulfito-reductores, Capítulo 9. Ediciones Díaz de Santos, pp. 73-75.

(6) Euzéby JP (2014). Clostridium. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature.

<http://www.bacterio.net/clostridium.html> (consulta: 11 de junio 2014)

(7) Argentina, Código Alimentario Argentino.  
[http://www.anmat.gov.ar/ativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/ativas_alimentos_caa.asp)

NOTAS PERSONALES



Area for personal notes with horizontal dashed lines.

# Método Horizontal para el Recuento de bacterias sulfito reductoras que crecen en anaerobiosis

Procedimiento según  
International Standard Organization ISO 15213: 2003

## 1. OBJETIVO

El presente procedimiento tiene como objetivo describir la metodología llevada a cabo por el Laboratorio de Microbiología para realizar el recuento de bacterias sulfito-reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbicas por el método horizontal en muestras de alimentos y muestras ambientales en el área de producción y manipulación de alimentos.

## 2. ALCANCE

Este procedimiento es un método horizontal para la enumeración de bacterias sulfito-reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbicas. Aplicable a productos para consumo humano y animal y muestras ambientales en el área de producción y manipuleo de alimentos.

**Normas de referencia:** Para la aplicación del presente procedimiento son indispensables las normas citadas en el anexo 5. Referencias.

## 3. DESARROLLO

### 3.1. Definiciones

Bacterias sulfito-reductoras que crecen bajo condiciones de anaerobiosis: bacterias que forman colonias típicas bajo las condiciones especificadas en esta Norma Internacional.

### 3.2. Medios de cultivo, reactivos, materiales y equipos

- 3.2.1. Agua peptona bufferada (BPW)
- 3.2.2. Solución salina peptonada (SFP)
- 3.2.3. Agar Sulfito hierro (Iron sulfite agar)
- 3.2.4. Estufa de esterilización
- 3.2.5. Autoclave

- 3.2.6. Estufa de incubación:  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , y si fuera necesario, a  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.7. Baño de agua o aparato similar capaz de mantener la temperatura a  $44^{\circ}\text{C}$  y  $47^{\circ}\text{C}$
- 3.2.8. Peachímetro de exactitud 0.01 a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 3.2.9. Pipetas de 1 ml de capacidad y de 10 ml graduadas en intervalos de 0.1 y 0.5 ml respectivamente
- 3.2.10. Ansas de platino/iridio o níquel/cromo de aproximadamente 3 mm de diámetro y de punción del mismo material, o equivalentes estériles descartables
- 3.2.11. Tubos de ensayo, botellas o frascos de capacidad apropiada, en particular de 16 mm x 160 mm o bolsas de plásticos estériles de capacidad 500 ml
- 3.2.12. Equipo para mezclado (tipo stomacher) para muestras de alimentos sólidos
- 3.2.13. Agitador mecánico (tipo vortex)
- 3.2.14. Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro o de 140 mm en caso que fuere necesario
- 3.2.15. Jarra de anaerobiosis, con equipo para generación de atmósfera anaeróbica que incluye un sistema para controlar las condiciones de anaerobiosis

### 3.3. Principio (ver anexo 1)

El método está basado en las siguientes etapas:

- 3.3.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones decimales sucesivas.
- 3.3.2. Se preparan por duplicado placas con agar (ó tubos) del medio sulfito-hierro. Usar una cantidad específica de muestra si el producto inicial es líquido, ó usar una cantidad específica de la suspensión inicial y diluciones sucesivas en caso de otros productos.
- 3.3.3. Las placas o tubos son incubadas bajo condiciones anaeróbicas a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h a 48 h (lectura final después de las 48 h) o posiblemente a los  $50^{\circ}\text{C}$  si se sospecha la presencia de bacterias termófilas. Se cuentan colonias características negras rodeadas de una zona negra debido a la formación de sulfuro ferroso como resultado de la reacción entre los iones sulfuro y el  $\text{Fe}^{+3}$  presente en el medio (reducción).
- 3.3.4. El número de bacterias sulfito-reductoras por mililitro o por gramo de muestra se calcula del número de colonias obtenidas en las placas (ó tubos).

### 3.4. Muestreo

Es importante que el laboratorio reciba una muestra que sea verdaderamente representativa que no esté dañada o haya sido cambiada durante el transporte o almacenamiento.

El muestreo no es una parte del método especificado en esta técnica. Si no hay una técnica internacional específica para trabajar con el muestreo del producto en cuestión es conveniente que las partes involucradas lleguen a un acuerdo sobre este tema.

### **3.5. Procedimiento**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra, suspensión inicial y diluciones de acuerdo con ISO 6887-1, ISO 8261 o cualquier técnica específica apropiada para el producto en cuestión.**

El tratamiento térmico de la suspensión inicial puede ser necesario para eliminar formas vegetativas de bacterias esporuladas y/o bacterias no esporuladas. Temperaturas y tiempo de calentamiento varían de acuerdo a las necesidades, desde combinaciones que produzcan una pasteurización definitiva a una temperatura moderada para provocar un efecto activador (ej. 75°C durante 20 minutos), hasta hervir durante varios minutos. En este caso, los resultados son número de esporas de bacterias sulfitos reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbicas.

NOTA: Para este punto referir a la norma ISO 6887 – 1 y las normas específicas para el alimento en cuestión (ver anexo 5. Referencias).

##### **3.5.1.1. Suspensión inicial**

En un frasco estéril o bolsa de plástico estéril pesar con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  una cantidad de masa  $x$  g o medir con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$  un volumen  $x$  ml (como mínimo 10 g ó 10 ml a menos que se indique otra cantidad). Agregar una cantidad del diluyente igual a  $9x$  g ó  $9x$  ml (dilución 1/10) y homogeneizar entre 1 minuto a 3 minutos dependiendo del alimento.

Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura la temperatura del diluyente debería ser aproximada a la temperatura ambiente.

En el caso de recuento de esporas realizar un tratamiento térmico a la suspensión inicial, inmediatamente después de su preparación, por ejemplo 10 minutos a 80°C seguido de un enfriamiento rápido.

NOTA: En algunos casos, particularmente para los productos muy viscosos o muy espesos, podría ser necesario agregar mayor cantidad de diluyente lo cual debe tenerse en cuenta en las operaciones subsiguientes y / o en la expresión de resultados.

##### **3.5.1.2. Diluciones decimales**

Transferir con una pipeta 1 ml (con una incertidumbre de medición de  $\pm 5\%$ ) de la suspensión inicial en un tubo con 9 ml del diluyente estéril.

Para una óptima precisión no introducir la pipeta más de 1 cm en la suspensión inicial y evitar el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril.

Mezclar utilizando preferentemente un agitador mecánico durante 5 segundos a 10 segundos para obtener la dilución  $10^{-2}$ .

Si es necesario repetir esta operación a partir de la dilución  $10^{-2}$  y diluciones sucesivas, utilizando en cada operación una nueva pipeta estéril para obtener las siguientes diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.). Se realizan las diluciones que sean necesarias para obtener un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (ver 3.5.3.).

### 3.5.1.3. Duración del procedimiento

El tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión inicial y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 45 minutos, mientras que el lapso de tiempo límite entre la preparación de la suspensión inicial y el comienzo de la preparación de las diluciones decimales sucesivas es de 30 minutos.

NOTA: si la temperatura ambiente del laboratorio es muy alta estos dos lapsos de tiempo deben ser reducidos.

### 3.5.2. Inoculación e incubación

3.5.2.1. Transferir por medio de una pipeta estéril 1ml de la muestra en placa de Petri estéril, por duplicado, si el producto es líquido, ó 1ml de suspensión inicial en caso de otros productos.

3.5.2.2. Tomar dos placas de Petri estéril. Usar otra pipeta estéril, transferir a cada placa 1ml de la primer dilución decimal ( $10^{-1}$ ) de la muestra si el producto es líquido, ó 1ml de la primer dilución decimal de la suspensión inicial ( $10^{-2}$ ) en caso de otros productos.

Repita el procedimiento descrito con las diluciones sucesivas.

3.5.2.3. Verter en cada caja de Petri aproximadamente 15 ml de agar sulfito-hierro el cual ha sido enfriado a  $44^{\circ}\text{C}$  -  $47^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la inoculación de la caja de Petri y la adición del agar no debería exceder los 15 minutos. Cuidadosamente mezclar el inóculo con el medio por movimientos horizontales y permitir que el medio solidifique.

Después que el medio ha solidificado, verter 5 ml ó 10 ml del mismo medio en la placa.

3.5.2.4. Si se usan tubos, inocular un volumen de 1 ml de cada dilución dentro de tubos, por duplicado, con medio mantenidos a  $44^{\circ}\text{C}$  -  $47^{\circ}\text{C}$ . Mezclar suavemente sin formar burbujas y dejar solidificar el medio en un baño de agua frío.

Después que el medio ha solidificado, verter 2 ml ó 3 ml del mismo medio en cada tubo.

3.5.2.5. Después que solidifique el medio incubar las cajas de Petri en jarra de anaerobiosis a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h a 48 h.



Si se sospecha la presencia de bacterias termófilas, preparar una segunda serie de placas de Petri e incubar a  $50^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

En el caso de tubos, la incubación en jarra de anaerobiosis no es necesaria.

### **3.5.3. Recuento, selección de las colonias y confirmación**

Después de la incubación por 24 h y 48 h, dependiendo del grado de ennegrecimiento y la tasa de crecimiento del microorganismo, contar las colonias negras, posiblemente rodeadas por un halo negro, como bacterias sulfito-reductoras.

NOTA 1: puede ocurrir un difuso e inespecífico ennegrecimiento del medio, especialmente cuando la inoculación se realiza en tubos con agar en lugar de placas de Petri. El crecimiento de bacterias anaerobias, que solo producen hidrógeno y no anhídrido sulfuroso, también puede reducir el sulfito presente y llevar a un ennegrecimiento general del medio.

Contar las colonias de bacterias sulfito-reductoras en cada placa que contenga menos de 150 colonias típicas y menos de 300 colonias en total.

Cuando el número de colonias es alto, algunos tubos pueden ser ilegibles. En este caso, solo los tubos donde las colonias están claramente separadas deben ser considerados para el recuento.

NOTA 2: Esta Norma Internacional puede ser usada solo para el recuento de *Clostridium*. Luego de obtener colonia típica, elegir 5 de cada placa, y confirmar el género *Clostridium* con test de confirmación (por ejemplo pruebas de respiración, pruebas de formación de esporas).

### **3.5.4. Expresión de los resultados**

Se informa recuento de bacterias sulfito-reductoras en la porción de muestra analizada (por gramo o mililitros para muestras líquidas). Ver anexo 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007).

### **3.5.5. Informe del ensayo**

El informe del ensayo debe especificar:

- a) Toda la información necesaria para la completa identificación de la muestra.
- b) El método de muestreo usado si se conocen.

- c) El método de análisis usado, incluyendo la temperatura de incubación, uso de tubos, y cualquier tratamiento térmico para destruir células vegetativas.
- d) Todos los detalles operativos no identificados en la Norma Internacional, o considerados opcionales, junto con detalles de cualquier incidente que pueda haber influenciado en los resultados del análisis.
- e) Los resultados obtenidos.

El informe del ensayo también debe establecer si se realizarán más análisis en un laboratorio de referencia, o si se realizaron, cuáles fueron los resultados.

#### 4. ANEXOS

##### ANEXO 1: Diagrama de flujo del procedimiento para recuento de bacterias sulfito-reductoras que crecen bajo condiciones anaeróbicas

**Preparación de la muestra:** x g de muestra + 9 x ml de diluyente (dilución 1/10)



**Inoculación e incubación:** transferir por duplicado 1 ml de las diluciones preparadas en placas de Petri y/ó tubo con agar sulfito hierro, Incubar a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , por 24 h a 48 h



**Recuento y selección de las colonias características:** seleccionar las placas con colonias negras y contar entre 150-300 colonias



**Expresión de resultados**

## **ANEXO 2: Medios de cultivos y reactivos**

### **1. Diluyente: Agua peptona bufferada (BPW)**

Peptona (enzimática) de caseína	10.0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
Disodio hidrógeno fosfato dodecahidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O)	9.0 g
Potasio dihidrógeno fosfato (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **2. Diluyente: Solución salina peptonada (SFP)**

Digesto enzimático de caseína	1.0 g
Cloruro de sodio	8.5 g
Agua destilada	1000 ml

Disolver los componentes en agua, si es necesario calentar. Ajustar el pH a  $7.0 \pm 0.2$  a 25°C. Distribuir en frascos o tubos de acuerdo a las necesidades analíticas. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

### **3. Agar Sulfito hierro (Iron sulfite agar)**

Digesto enzimático de caseína	15.0 g
Digesto pancreático de soja	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Bisulfito de sodio (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	1.0 g
Citrato de amonio hierro (III)	1.0 g
Agar	9.0 - 18 g <sup>a</sup>
Agua	1000 ml

<sup>a</sup> dependiendo de la fuerza de gel del agar

Disolver los ingredientes en agua calentándolos. Si es necesario, ajustar el pH para que luego de la esterilización sea de  $7.6 \pm 0.2$  a 25°C. Verter 250 ml de medio en frascos de 500 ml.

Si el recuento se realiza por medio de tubos de ensayos, verter 20 a 25 ml de medio en los tubos. Esterilizar 15 minutos en autoclave a 121°C. Antes de usar, desairar el medio.

## ANEXO 3: Cálculo y expresión de los resultados (ISO 7218:2007)

### 1.1 Método de cálculo: caso general

Para que el recuento sea válido, se suele considerar necesario que el recuento de colonias se realice al menos en una placa que contenga un mínimo de 10 colonias.

El número de microorganismos  $N$  presentes en la muestra para análisis se calcula como la media corregida de dos diluciones consecutivas, utilizando la ecuación (1)

$$(1) \quad N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d}$$

Donde:

**$\Sigma C$ :** es la suma de las colonias contadas en dos placas de las dos diluciones consecutivas, de las cuales al menos una contiene un mínimo de 10 colonias;

**$V$ :** es el volumen de inóculo utilizado en cada placa, en mililitros;

**$d$ :** es la dilución correspondiente a la primera dilución elegida ( $d = 1$  cuando se utiliza el producto líquido sin diluir).

El resultado calculado se redondea a dos cifras significativas. Cuando se realiza esta operación:

- si la tercera cifra es inferior a 5, no se modifica la cifra anterior;
- si la tercera cifra es igual o superior a 5, la cifra anterior se incrementa en una unidad.

Preferiblemente el resultado se expresa como un número entre 1.0 y 9.9 multiplicado por la potencia de 10 adecuada, o como un número entero con dos cifras significativas.

El resultado se expresa como número de microorganismos  $N$  por mililitro (para productos líquidos) o por gramo (para el resto de productos).

Ejemplo 1: El recuento ha proporcionado los siguientes resultados:

- Para la primera dilución escogida ( $10^{-2}$ ): 168 colonias;
- Para la segunda dilución ( $10^{-3}$ ): 14 colonias.

$$N = \frac{\Sigma C}{V \times 1,1 \times d} = \frac{168 + 14}{1 \times 1,1 \times 10^{-2}} = \frac{182}{0,011} = 16545$$

Redondeando el resultado como se indicó, el número de microorganismos es de 17.000 o  $1.7 \times 10^4$  por mililitro o por gramo de producto.

NOTA: en caso de sembrar 0.1 ml  $V = 0.1$  ml

**1.2. Método de cálculo para recuento bajo:** caso en el que una placa (muestra para análisis o suspensión inicial o primera dilución) contiene menos de 10 colonias

- Si la placa contiene menos de 10 colonias, pero como mínimo 4, el resultado se calcula siguiendo el caso general (1.1) y se expresa como: *"el número estimado de microorganismos x por mililitro (productos líquidos) o por gramo (resto de productos)"*.
- Si el resultado total oscila entre 1 y 3, la precisión del análisis es demasiado baja y el resultado debe expresarse como: *"hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a (4xd) por gramo o ml"*.

Ejemplo: Si la dilución inoculada es  $10^{-1}$ :

*Hay microorganismos presentes, pero a un nivel inferior a 40 UFC/g ó ml*

**1.3. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) no contiene colonias**

Si la placa que contiene la muestra para análisis (productos líquidos) o la suspensión inicial (resto de productos), o la primera dilución inoculada o escogida no contiene colonias, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Menos de 1/d microorganismos por mililitro" (productos líquidos) o "menos de 1/d microorganismos por gramo" (resto de los productos).*

Donde  $d$  es el factor de dilución de la suspensión inicial, o la primera dilución inoculada o escogida ( $d = 10^0 = 1$  cuando se inocula directamente la muestra para análisis).

Ejemplo:

- Si la dilución más concentrada sembrada fue:  $10^{-1}$

⇒ < 10 UFC /ml o g

- Si la dilución más concentrada sembrada fue:  $10^{-2}$

⇒  $< 100 \text{ UFC /ml o g}$

**1.4. Método de cálculo para el caso en el que la placa (muestra para análisis, suspensión inicial o primera dilución) contiene más de 300 colonias**

Si el recuento de colonias en todas las placas de todas las diluciones es incontable, mayor a 300, el resultado se expresa de la siguiente manera:

*"Más de 300/d microorganismos /g ó ml"*

Donde **d** es la dilución correspondiente a la última dilución escogida.

Ejemplo:

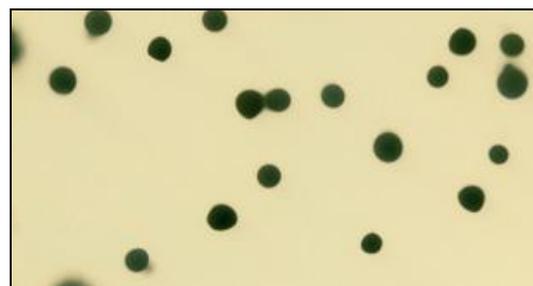
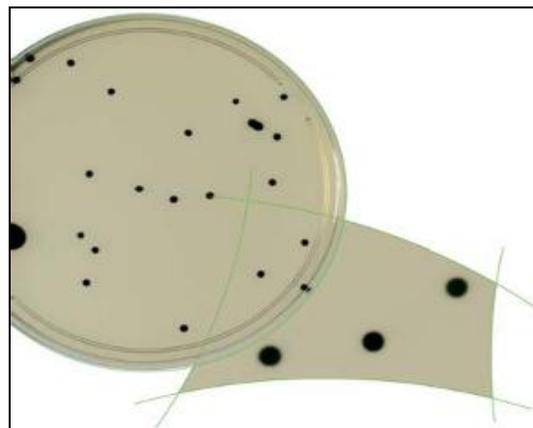
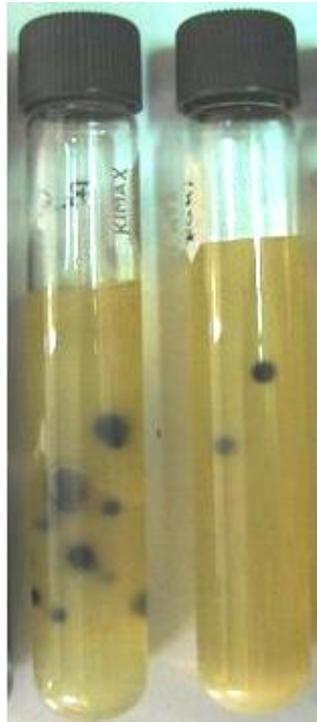
- Si la última dilución (más diluida) sembrada fue:  $10^{-3}$

$> 300.000 \text{ microorganismos / ml o g}$

⇒  $> 3 \times 10^5 \text{ UFC/ml o g}$

ANEXO 4: FOTOS

Agar sulfito-hierro



## **ANEXO 5: REFERENCIAS**

**NOTA: Las siguientes normas de referencias son indispensables para la aplicación del presente procedimiento. Para cada norma de referencia debe aplicarse la edición citada, en caso de no especificarse la misma, deberá aplicarse la última edición (incluyendo cualquier modificación).**

**ISO 6887-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.

**ISO 8261**, Milk and milk products- General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination.

**ISO 7218**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations.

**ISO/TS 11133-1**, Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines on preparation and production of culture media - Part 1 : General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory

### **Bibliografía**

NMKL N° 95:1997, Sulfite reducing Clostridia: Determination in food.

NOTAS PERSONALES



Handwriting practice area consisting of multiple sets of horizontal dashed lines for notes.