



Universidad Pública de Navarra

ESCUELA TECNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRONOMOS

**COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE SIEMBRA EN EL ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO DE PESCADO**

**Máster Universitario en Tecnología y Calidad en las
Industrias Agroalimentarias**

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Leticia de Fátima Tomás

Dirigido por:

Juan I. Maté

Idoia Fernández Pan

Pamplona, Junio de 2015

Agradecimientos

En primer lugar mi agradecimiento más sincero a mi director de Máster Juan Maté, y a Idoia Fernández por su confianza y apoyo para iniciarme en la investigación, por las innumerables horas que me ha dedicado, por lo mucho que me ha enseñado, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis profesores de máster por las horas que me han dedicado durante todo el año en los cursos del Máster, que fueron muy interesantes.

A Juanjo, Gustavo y Ximena por facilitarnos lo necesario para realizar este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio, en especial a Victor Otero.

A mis compañeros de trabajo (VCM), que mismo de lejos mi dieran mi acompañaran y mi apoyaran

A mis padres, mis hermanas y toda la familia por darme todo, haber estado conmigo y haberme animado a seguir adelante.

A mi novio Miliço Soares por la fuerza durante todo el tiempo que estuve en el Master.

A mis amigos y los demás

Índice

Lista de tablas	4
Lista de figuras	6
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	9
OBJETIVOS	12
ESTRUCTURA DEL TRABAJO	13

PARTE I

1. Microbiología por grupos de alimentos	14
1.1. Análisis por tipo de alimento	14
1.1.1. Productos cárnicos.....	15
1.1.2. Leche y productos lácteos	23
1.1.3. Pescado.....	29
1.1.4. Huevos y ovoproductos	32
1.1.5. Otros alimentos	33
2. Técnicas microbiológicas.....	37
2.1. Limpieza del área de trabajo: condiciones asépticas.....	37
2.2. Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivos	38
2.2.1. Preparación de material	38
2.2.2. Preparación de medios de cultivo.....	39
2.3. Toma de muestra	41
2.3.1. Toma de muestra asépticamente.....	42
2.3.2. Manipulación del alimento.....	43
2.3.3. Muestreo: dilución madre y seriada	43
2.4. Técnicas de siembra	45
2.4.1. Métodos de Recuento en Placa.....	46
i. Siembra en superficie	46
ii. Siembra en masa o en profundidad	46
2.4.2. Siembra en tubos	48
2.4.3. Métodos rápidos aplicados en microbiología de alimentos.....	49

i.	Siembra en espiral	49
ii.	Siembra en Petri filme	50
iii.	Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos	51
2.5.	Manipulación de material en condiciones asépticas.....	53
2.6.	Gestión de residuos	56
2.6.1.	Procedimientos de manipulación y eliminación de material	57
2.7.	Incubación y Recuento	59
i.	Incubación	59
ii.	Recuentos	59
3.	Protocolos.....	64
3.1.	Análisis de microorganismos indicadores.....	64
3.1.1.	<i>Aerobios mesofilos</i>	64
3.1.2.	<i>Enterobacterias</i>	68
3.1.3.	<i>Psicrotrofos totales</i>	72
3.1.4.	<i>Enterococcus</i>	75
3.1.5.	<i>Clostridium sulfito reductor</i>	79
3.1.6.	<i>Coliformes totales</i>	82
3.1.7.	<i>Coliformes fecales</i>	90
3.1.8.	<i>Escherichia coli</i>	95
3.1.9.	<i>Staphylococcus aureus</i>	104
3.2.	Análisis de microorganismos patógenos	108
3.2.1.	<i>Salmonella</i>	108
3.2.2.	<i>Shigella</i>	114
3.2.3.	<i>Listeria monocytogenes</i>	119
3.2.4.	<i>Campylobacter jejuni</i>	123
3.2.5.	<i>Clostridium perfringes</i>	128
3.2.6.	<i>Vibrio cholera</i>	131
3.2.7.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	137
3.2.8.	<i>Bacillus cereus</i>	143
3.3.	Microorganismos alterantes	148
3.3.1.	<i>Pseudomonas</i>	148
3.3.2.	<i>Bacterias ácido lácticas</i>	151

3.3.3. Mohos y levaduras	155
4. Legislaciones y normas: recopilación de Normas.....	159

PARTE II

1. Materiales, medios y equipos	161
2. Metodología	162
2.1. Preparación de medios y materiales	162
2.2. Preparación de muestras y diluciones seriadas.....	162
2.2.1. Siembra en profundidad	163
2.2.2. Siembra en superficie	164
2.3. Incubación y lectura	164
3. Resultados	165

PARTE III

1. Introducción	168
2. Objetivos.....	170
3. Materiales y Métodos	171
3.1. Materiales.....	171
3.2. Metodología	172
3.3. Diseño experimental.....	174
4. Resultados y Discusión	175
4.1. Repetibilidad de los análisis (dentro de cada metodos de siembra)	175
4.2. Comparación de técnicas de siembra	177
5. Conclusión.....	181
 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	 182
ANEXO I.....	192

Lista de tablas

Tabla 1. Microorganismos en canales de animales.....	16
Tabla 2. Microorganismos en carnes de aves.....	17
Tabla 3. Microorganismos en carne refrigerada y congelad.....	18
Tabla 4. Microorganismos en carne picada.....	19
Tabla 5. Microorganismos en productos cárnicos crudos curados.....	20
Tabla 6. Microorganismos en carne seca.....	21
Tabla 7. Microorganismos en carne envasada al vacío	22
Tabla 8. Microorganismos en leche	23
Tabla 9. Microorganismos en leche deshidratada.....	24
Tabla 10. Microorganismos en nata.....	25
Tabla 11. Microorganismos en leche fermentada.....	26
Tabla 12. Microorganismos en queso.....	27
Tabla 13. Microorganismos en mantequillas.....	28
Tabla 14. Microorganismos en pescado fresco.....	29
Tabla 15. Microorganismos en pescado refrigerado/congelado.....	30
Tabla 16. Microorganismos en pescado salado y seco.....	30
Tabla 17. Microorganismos en pescado ahumado.....	31
Tabla 18. Microorganismos en huevos y ovoproductos.....	32
Tabla 19. Microorganismos en hortalizas.....	33
Tabla 20. Microorganismos en frutas.....	34
Tabla 21. Microorganismos en cereales y derivados.....	35

Tabla 22. Microorganismos en aguas y bebidas.....	36
Tabla 23. Número Más Probable por g/ml utilizando tres series de tubos.....	63
Tabla 24. Condiciones aplicadas.....	174
Tabla 25. Recuentos de <i>aerobios mesofilos</i> en muestras de merluza.....	179
Tabla 26. Recuentos de <i>aerobios psicrotrofos</i> en muestras de merluza.....	180

Lista de figuras

Fig. 1. Mapa de Mozambique.....	9
Fig. 2. Preparación de medios de cultivo.....	41
Fig. 3. Métodos de siembra en placa.....	47
Fig. 4. Espiral de Arquímedes.....	53
Fig. 5. Equipo de sembrado automático en espiral.....	51
Fig. 6. Transferencia e inoculación de microorganismos.....	53
Fig. 7. Metodo y plantilla de recuento para placas de 100 mm	63
Fig. 8. Recuentos (Log ufc/g) obtenidos en carne picada.....	165
Fig. 9. Recuentos (Log ufc/g) obtenidos en lomo de cerdo.....	166
Fig. 10. Materia prima – Merluza.....	173
Fig. 11. Sembradora espiral.....	173
Fig. 12. Diseño experimental.....	174
Fig 13. Diferencias entre las réplicas analizadas al día 0 (t_0).....	175
Fig 14. Diferencias entre las réplicas analizadas al día 1 (t_1).....	176
Fig 15. Diferencias entre las réplicas analizadas al día 2 (t_2).....	177
Fig 16. Diferencias entre los métodos de siembra.....	188

RESUMEN

Este trabajo fue realizado para completar la formación de un profesor de la facultad de Ingeniería de Alimentos de la Universidad Católica de Mozambique en microbiología de alimentos. Con tal fin, este trabajo se dividió en tres partes; la primera parte consistió en una recopilación bibliográfica sobre los principales microorganismos asociados con cada uno de los grupos de alimentos, y sobre las técnicas y protocolos de análisis para detección de microorganismos indicadores, patógenos y alterantes en los alimentos. La segunda parte se centró en la realización de unas prácticas en microbiología de alimentos teniendo como base los métodos de siembra tradicionales (superficie y profundidad) utilizando muestras de carne picada de vacuno y filetes de lomo de cerdo.

Por último, en la tercera parte, se realizó una comparación de métodos de siembra, utilizando muestras de merluza. Los valores de los recuentos microbianos utilizando la siembra en superficie y en espiral fueron homogéneos mientras que utilizando la siembra en profundidad los recuentos fueron significativamente menores.

Palabras clave: Microbiología de alimentos, protocolos de análisis, siembra en superficie, siembra en profundidad, siembra en espiral.

ABSTRACT

Was performed this work to complete the formation of a professor of the Faculty of Food Engineering of the Catholic University of Mozambique in food microbiology. To that this work was divided into three parts, the first part consisted of a bibliography on the main microorganisms associated with each of the food groups, the basic microbiological techniques and analysis protocols for detection of indicators, pathogens and spoilage microorganisms the food. The second part focused on the realization of practices in food microbiology based on traditional planting methods (surface and depth) using samples of minced beef and pork steaks.

Finally, in the third part, was performed a comparison of planting methods using samples of hake. The values of the microbial counts using planting surface and spiral were homogeneous whereas planting depth using counts were significantly lower.

Keywords: Food microbiology, analysis protocols, surface sowing, planting depth, spiral plating.

INTRODUCCIÓN

Mozambique país localizado en sudeste de África, dividido en 11 provincias y con una población estimada en 24,4 millones de habitantes, ha tenido grandes cambios socioeconómicos en las últimas dos décadas. Arrasado por más de 15 años de guerra civil, que lo convirtió en uno de los países más pobres del mundo, la trayectoria de Mozambique está hoy en día marcada por lo fortalecimiento institucional y el crecimiento económico sorprendente.

La economía del país está basada principalmente en la agricultura, pero el sector industrial, principalmente en la fabricación de alimentos, bebidas se encuentra en crecimiento. Cerca de 70% de los 24,4 millones de habitantes de este lugar viven en zonas rurales, en condiciones precarias, y practican la agricultura de subsistencia la cual depende principalmente de las lluvias. Mozambique está entre los **20 países más pobres del mundo** [88]. El mayor potencial agrícola se encuentra en el Centro y Norte, las provincias en esas regiones producen normalmente más de 80% de los productos alimentares.



Fig. 1. Mapa de Mozambique

De acuerdo con TIA (2002)^[86], los principales cultivos alimentarios son el maíz, la mandioca, las habas, la patata dulce, el azúcar, el arroz, etc y las principales culturas de rendimiento son el anacardo y el algodón.

A pesar de los avances considerables, Mozambique continúa teniendo serios desafíos, ya que el crecimiento económico por sí solo no reduce la inseguridad alimentaria. En las últimas décadas, los países de África Austral han sufrido repetidamente crisis alimentarias graves que han dejado a la población vulnerable frente a la desnutrición, con todas sus consecuencias sanitarias y sociales. Las peores crisis alimentarias de la región, que en el caso de Mozambique han golpeado sobre todo las provincias del sur, han sido desencadenadas por condiciones climáticas extremas, como inundaciones y sequías, responsables de la destrucción de los cultivos y de la escasez de alimentos. En esta última década, las condiciones climáticas adversas han sido responsables de crisis alimentarias graves en 2001/2002 y en 2007 [89].

Los problemas de alimentación tienen varias consecuencias, como la insuficiencia de nutrientes puede resultar en desnutrición crónica en los niños, la anemia por falta de hierro ha sido uno de los problemas más graves [87]. La dieta mozambiqueña es típicamente pobre en grasa, proteínas y micronutrientes. La Nutrición y Seguridad Alimentar constituye uno de los desafíos en las problemáticas actuales de Mozambique. Este tema se ha asociado a la pobreza extrema que aflige cerca de 80% de los mozambiqueños, estos problemas influyen en la calidad alimentaria en el país, es decir, en acceso a alimentos de calidad.

Los problemas de alimentación también se pueden atribuir a la calidad de los alimentos, tanto los producidos a nivel nacional, así como los que llegan de otros países. Todavía son pocas las instituciones que realizan el control de calidad de los alimentos, así como la inspección de los mismos. Estas instituciones tampoco poseen la estructura para garantizar la inocuidad de los alimentos consumido en todo el país.

El control de calidad de alimentos, induce todos los análisis fisicoquímicos como los microbiológicos. Para estos se debe implementar laboratorios que sean capaces de realizar los distintos análisis para un determinado grupo de alimentos. La Microbiología de Alimentos proporciona un análisis sobre los microorganismos alterantes, patógenos y beneficiosos. En este aspecto también debe considerarse los principales procedimientos

y técnicas que se emplean para determinar la incidencia de estos microorganismos, por lo que el conocimiento y la aplicación práctica de métodos para la detección rápida de microorganismos.

Debido a la gran diversidad de metodologías utilizadas en la ejecución de los análisis microbiológicos, el presente TFM está justificado como apoyo al fortalecimiento del laboratorio de microbiología de la Universidad Católica de Mozambique (UCM), con el fin último de prestar servicios a la comunidad, y como consecuencia última de mejorar la calidad de los alimentos consumidos por la población mozambiqueña.

La Universidad Católica de Mozambique (UCM), fue fundada el 10 de agosto de 1996 por la Conferencia de Obispos de Mozambique. En ese momento, la educación superior en Mozambique sólo estaba disponible en la capital, al sur del país. La universidad actualmente tiene campus en Beira, Chimoio, Cuamba, Nampula, Pemba, Quelimane y Tete. Uno de los propósitos tener la enseñanza superior accesible en el centro y norte de Mozambique.

La UCM en la población de Chimoio, en el centro del país, cuenta con diversas facultades, incluyendo Ingeniería de los Alimentos, que dispone de un laboratorio de análisis físico-químico y microbiológico, que recientemente ha empezado a ofrecer servicios a la comunidad. En las pequeñas y grandes empresas, así como ayuntamientos de la región para lo cual hace falta especialistas en el área alimentaria. Dada la importancia de la industria alimentaria, el problema de seguridad alimentaria y la importancia de la microbiología como parte de la calidad alimentaria, se consideró que hacen falta técnicos especialistas en microbiología en la UCM, para atender estas necesidades.

El acuerdo de colaboración entre la UCM y la UPNA ha permitido que un profesor de Ingeniería de alimentos de UCM realice el master en Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias y para especializarse en microbiología de alimentos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Formar a un profesor de la Universidad Católica de Mozambique (UCM) en técnicas de microbiología de alimentos.

Para ello se lleva a cabo los siguientes **objetivos específicos**:

- Describir los protocolos de las diferentes metodologías de análisis de microorganismos de los diferentes grupos de alimentos
- Realizar un entrenamiento práctico en microbiología de alimentos, utilizando las diferentes metodologías convencionales de análisis microbiológico para los diferentes grupos de alimentos.
- Adquirir habilidades en el desarrollo de la metodología para la cuantificación de microorganismos alterantes e indicadores, y la detección de patógenos más comunes de los alimentos.
- Realizar una comparación de tres técnicas de siembra en el análisis microbiológico.

ESTRUCTURA DEL TRABAJO

Para el alcance del objetivo principal del trabajo, este se encuentra dividido en tres secciones.

- La primera sección (Parte I) contempla una recopilación bibliográfica sobre los principales microorganismos asociados con cada uno de los grupos de alimentos, las técnicas microbiológicas elementales, enfatizando las técnicas convencionales de análisis microbiológicas de alimentos. Se describen diversos protocolos de análisis para detección de microorganismos indicadores, patógenos y alterantes, y la legislación asociada a los límites microbiológicos para cada alimento.
- En la segunda sección (Parte II), se enfoca en el entrenamiento práctico, utilizando las metodologías convencionales de análisis microbiológico, que se llevaran a cabo como medio de adquirir conocimientos y habilidades en las técnicas usadas en detección los microorganismos.
- Para finalizar, en la tercera sección (Parte III), se realiza una comparación de los métodos de siembra, basado en siembra tradicional (en superficie y en profundidad) y la siembra en espiral utilizando muestras de pescado.

A continuación paso a describe cada una de las partes que constituyen el trabajo.

PARTE I

A continuación se describen los principales microorganismos asociados con cada uno de los grupos de alimentos, los análisis por tipo de microorganismos, las técnicas convencionales de análisis microbiológicas de alimentos, y recopilación de normas/legislaciones asociadas a cada grupo de alimentos.

1. Microbiología por grupos de alimentos

1.1. Análisis por tipo de alimento

Con base en su constitución y características que contienen los diferentes alimentos, éstos se clasifican en cinco grupos:

- Carne y productos cárnicos
- Leche y productos lácteos
- Huevos y ovoproductos
- Productos de pesca
- Productos alimenticios diversos (Verduras, frutas, cereales y derivados, bebidas: agua, entre otros).

1.1.1. Productos cárnicos

La clasificación de los productos cárnicos constituye el punto de partida para su normalización. Productos cárnicos son aquellos productos que contengan carnes de mamífero o aves de corral o caza destinada al consumo humano [1]. La clasificación se basa en criterios como materia prima que las componen, la estructura y los tratamientos se han sometidos en la elaboración. En esta categoría incluye todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos y procesados, carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebozados. A este punto de vista, la carne clasifícase en [2, 3]:

- Canales
 - Bovinas
 - Caprinas
 - Porcinas
- Canales de carne de Aves
- Carnes refrigeradas y congeladas
- Carne envasada al vacío (refrigerada)
- Carne picada
 - Envasada
 - De carnicería
- Crudos – curados tratados por calor
- Carnes secas

Teniendo en cuenta los varios subproductos cárnicos, y que este dependiendo de su microflora, de las condiciones de procesamiento, condiciones de manipulación, pueden tener un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismo.

i. Canales

En los mataderos se obtienen a partir de cada animal una "canal", que es el cuerpo entero de un animal de abasto después de sacrificado y sangrado, suelen ser canales bovinas, caprinas, porcinas y canales de aves, así como de otros tipos de animales comestibles. Por las condiciones de manipulación y la microflora característica del animal, puede ocurrir una contaminación por microorganismos indicadores, patógenos y/o alterantes [4, 5].

Tabla 1. Microorganismos en canales de animales

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos,</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella spp</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Campylobacter jejuni</i>	3.2.4	123
<i>Clostridium perfringes</i>	3.2.5	128
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

ii. Carnes de aves

A este grupo se incluyen: la gallina, el pavo, el pato, codorniz y el resto de especies domésticas comestibles, crudo congelado o refrigerado, y envasada en películas impermeables al oxígeno o envasadas al vacío. La alteración de la carne de aves, es muy similar a la de las carnes rojas. Dependiendo de las condiciones de manipulación y almacenamiento (temperaturas de refrigeración o congelación) suelen crecer microorganismos alterantes y patógenos [6, 7, 9], se presentan en la tabla a continuación.

Tabla 2. Microorganismos en carnes de aves

Indicadores	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesófilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicótrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Enterococcus</i>	3.1.4	75
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Página
<i>Salmonella enteritidis</i>	(*)	
<i>Salmonella typhimurium</i>	(*)	
<i>Salmonella spp.</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	114
<i>Campylobacter jejuni</i>	3.2.4	123
<i>Clostridium pefringens</i>	3.2.5	128
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
Alterantes	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151

(*) No consta en los protocolos

iii. Carne refrigerada y congelada

En la carne refrigerada y congelada refiero las que provienen de canales animales que después del sacrificio y despiece son mantenidos a temperaturas de refrigeración y congelación como medio de conservación, en estas condiciones puede estar presente los siguientes microorganismo [8].

Tabla 3. Microorganismos en carne refrigerada y congelada

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Paginas
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicrotrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Paginas
<i>Clostridium botulinum</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Campylobacter jejuni</i>	3.2.4	123
<i>Clostridium prefringens</i>	3.2.5	128
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

iv. Carne picada

La carne picada obtenida de canales de animales, es mucho más susceptible al desarrollo de microorganismos, es decir, los microorganismos que estaban en la superficie de la carne se distribuyen por toda la masa. El reglamento CE 853/2004 define carne picada como la carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos 1% de sal.

Pueden surgir contaminaciones a partir de las condiciones de manipulación, de almacenamiento, o sea, carne picada proveniente de carnicería que es directamente refrigerada o carne picada envasada en atmosfera modificada y posteriormente conservada a temperaturas de refrigeración. En carne picada suelen proliferar microorganismos patógenos y alterantes, así como algunos indicadores [10, 11, 12].

Tabla 4. Microorganismos en carne picada

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicotrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Pagina
<i>Salmonella spp.</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Clostridium prefringens,</i>	3.2.5	128
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

v. Productos cárnicos crudos curados - Embutidos crudos curados

Son embutidos fermentados: Chorizo, Salchichón, Salami y Lomo embuchado. El Reglamento CE 853/2004 define los preparados de carne: la carne fresca incluida la carne que ha sido troceada, a la que se le han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca. Las condiciones de pH, a_w y condiciones aeróbicas son condiciones extremadamente favorables para el crecimiento de patógenos y de alteración en carnes preparadas, considerando estas condiciones, los microorganismos que pueden desarrollar en embutidos cárnicos curados, se presentan en la tabla abajo [13, 14, 15].

Tabla 5. Microorganismos en productos cárnicos crudos curados

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Clostridium sulfito reductor</i>	3.1.5	79
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Echerichia coli</i>	3.1.8	95
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

vi. Carne seca

Es un subproducto cárnico, procedente de carne cruda de canales animales que se ha sometido a un proceso de salado y posterior secado. Con la finalidad de analizar los parámetros de calidad microbiológica del producto transformado, suelen realizarse análisis de patógenos e indicadores [16, 17].

Tabla 6. Microorganismos en carne seca

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Clostridios sulfito reductores</i>	3.1.5	79
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Echerichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinum</i>	(*)	
<i>Salmonella</i>	3.2.1	108
<i>Clostridium perfringens</i>	3.2.5	128
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

vii. Carne envasada al vacío

En la carne envasada al vacío, carne cruda refrigerada en forma de cortes primarios envasados en bolsas impermeables en atmosfera modificada, pueden estar presentes [18].

Tabla 7. Microorganismos en carne envasada al vacío

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicrotrofos totales</i>	3.1.3	72
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Pagina
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151

1.1.2. Leche y productos lácteos

En este apartado destaca además de la leche cruda, los productos lácteos como:

- Leche líquida procesada,
- Leche deshidratada,
- Nata,
- Leches fermentada: yogur
- Queso
- Mantequilla

i. Leche

Por leche se entiende como leche de vaca, se procede de otro animal debe mencionar expresamente la especie. Siendo de la leche líquida [22]:

- Leche cruda, el reglamento 853/2004 define leche cruda como la producida por la glándula mamaria de animales de abasto que no hay sido calentada a una temperatura superior a 40 °C ni sometida a un tratamiento de efecto equivalente.
- Leche procesada – para consumo directo, siendo enteras, semidesnatadas y desnatadas, tratadas por: Pasteurizada, Esterilizada y Ultra alta temperatura (UHT). Pueden estar presentes los microorganismos que se presentan en la tabla siguiente [24, 25, 26, 29].

Tabla 8. Microorganismos en leche

Indicadores	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Echerichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Pagina
<i>Corynebacterium spp.</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Campylobacter spp</i>	3.2.4	123
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
Alterantes	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151

(*) No consta en los protocolos

ii. Leche en deshidratada

La leche deshidratada son productos con contenido reducido de agua, que pasan por un tratamiento térmico. En este grupo se incluye leche en polvo como leche totalmente deshidratada, leche condensado y evaporada como parcialmente deshidratada, considerado como productos lácteos pasteurizados, y como la leche procesada pueden dividirse en desnatada, semidesnatada y desnatada. En leche deshidratada pueden estar presentes los microorganismos que se presentan en la tabla [23, 24, 26].

Tabla 9. Microorganismos en leche deshidratada

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Estafilococo coagulosa positiva</i> **	(*)	
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	114
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y leveduras</i> *	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

*Principalmente en leche en polvo

** El Reglamento 2014, establece que valores altos de *Estafilococo coagulosa positiva*, se deberá realizarse pruebas de Enterotoxinas estafilococias

iii. Nata

Parte de la leche rica en grasa que separa por desnatado y otros medios. Según la legislación española se clasifica en: doble nata, nata y nata delgada o ligera, siendo en polvo o esterilizada según la legislación. Se pueden desarrollar los siguientes microorganismos [23, 26].

Tabla 10. Microorganismos en nata

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Eschericia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y leveduras</i>	3.3.3	155

iv. Leche fermentada

La **leche fermentada** es un producto lácteo obtenido por medio de la fermentación de la leche, que puede haber sido elaborado a partir de productos obtenidos de la leche con o sin modificaciones en la composición por medio de la acción de microorganismos adecuados y teniendo como resultado la reducción del pH con o sin coagulación [27].

En este grupo se destaca el yogur, como parte de una fermentación láctica termófila, que se somete a una posterior pasteurización. Según la legislación española yogur pasteurizado después de la fermentación es el producto obtenido del yogur que como consecuencia de la aplicación de un tratamiento por el calor posterior a la fermentación equivalente a una pasteurización ha perdido la viabilidad de las bacterias lácticas específicas. Aquí se destacan los siguientes microorganismos [28].

Tabla 11. Microorganismos en leche fermentada

Indicadores	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
Alterantes	Protocolo	Página
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

v. Queso

El queso puede ser definido como un producto de la concentración de los sólidos de la leche, por medio de la coagulación [30]. Según su consistencia, los quesos pueden agruparse en cinco categorías: blandos, semiblandos, semiduros, duros y extraduros. El los quesos se pueden desarrollar los siguientes microorganismos que se presenta la tabla 12, procedentes de fallos en la manipulación, indicadores de higiene y contaminación [31, 32, 33, 39].

Tabla 12. Microorganismos en queso

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Pagina
<i>Estafilococcus coagulosa positiva*</i>	(*)	
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Pagina
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3.2.7	137
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Pagina
<i>Bacterias acido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

*El Reglamento 2014, establece que valores altos de *Estafilococcus coagulosa positiva*, se deberá realizarse pruebas de Enterotoxinas estafilococias

vi. Mantequillas

Se entiende por mantequilla (manteca) el producto graso derivado exclusivamente de la leche y/o de productos obtenidos de la leche, principalmente en forma de emulsión del tipo agua en aceite [34]. Como criterios de calidad de mantequillas se destacan en la tabla 13, los microorganismos que suelen desarrollarse [35, 40].

Tabla 13. Microorganismos en mantequillas

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	114
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

1.1.3. Pescado

El pescado y mariscos son alimentos que experimenta una serie de cambios desde el momento de su captura debido a su composición, característica que lo convierte en un producto con un alto grado de susceptibilidad al deterioro y putrefacción [36]. En este grupo incluye desde el:

- Pescado fresco,
- Pescado refrigerado/congelado,
- Pescado salado y seco,
- Pescado ahumado,
- Pescado enlatado.

i. Pescado fresco

La especie de pescado determina el número y tipo de bacterias presentes inicialmente, mientras que las condiciones de manipulación y almacenamiento condicionan la flora alterante [38]. En pescados provenientes de aguas dulces o marinas, suelen proliferar microorganismos tabla 14[36, 37, 38].

Tabla 14. Microorganismos en pescado fresco

Indicadores	Protocolo	Pagina
<i>Estafilococo coagulasa positiva</i>	(*)	
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicrotrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Clostridium sulfito reductor</i>	3.1.5	79
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	1.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Pagina
<i>Clostridium botulinum</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Clostridium perfringens</i>	3.2.5	128
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.2.6 ⁽⁻⁾	131
<i>Vibrio cólera</i>	3.2.6	131
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
Alterantes	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151

(*) No consta en los protocolos. (-) Se considera el protocolo de *Vibrio cholera*

ii. Pescado refrigerado/congelado

En este apartado incluye todo pescado fresco que a prior si mantiene en temperaturas de refrigeración o congelación, como medio de conservación. En este suelen proliferarse como más comunes microorganismos, los presentados en la tabla 15 [36, 38, 69].

Tabla 15. Microorganismos en pescado refrigerado/congelado

Indicadores	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicrotrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Pagina
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.2.6 ⁽⁻⁾	131
Alterantes	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151

(*) No consta en los protocolos. (-) Se considera el protocolo de *Vibrio cholera*

iii. Pescado salado y seco

El proceso de salar en pescado sigue siendo una de las técnicas más usadas como medio de conservación, por este disminuir la actividad de agua del alimento [70]. En este grupo se pueden desarrollarse microorganismos por deficiente manipulación del alimento, tabla 16 [70, 71].

Tabla 16. Microorganismos en pescado salado y seco

Indicadores	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Coliformes totales</i>	3.1.3	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Pagina
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	3.2.6 ⁽⁻⁾	131
Alterantes	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos. (-) Se considera el protocolo de *Vibrio cholera*

iv. Pescado ahumado

El pescado ahumado, es un subproducto de los pescados, que pasa por un proceso de deshidratación superficial, seguido de salado para reducción de la actividad de agua, en este tipo de pescado suelen desarrollarse microorganismos indicadores, patógenos y alterantes [72].

Tabla 17. Microorganismos en pescado ahumado

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinium</i>	(*)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	131
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

1.1.4. Huevos y ovoproductos

El huevo es un alimento de gran valor nutritivo que de forma natural se encuentra protegido de la contaminación exterior gracias a la barrera física que le proporciona su cáscara y membranas [41].

Este documento define los valores considerados de referencia para la caracterización de los derivados del huevo de fabricación y uso más común en España [41, 42]:

- huevo líquido pasteurizado,
- huevo entero, clara y yema pasterizados,
- huevo entero, clara y yema deshidratada,
- huevo en polvo y
- huevo cocido

Ovoproductos son los productos transformados resultantes de la transformación de huevos, de diversos componentes o mezclas de huevos, o de la transformación subsiguiente de tales productos transformados [42].

Tanto en huevos y ovoproductos, suelen desarrollarse los siguientes microorganismos índices y patógenos, como indicadores de higiene de proceso, manipulación adecuada de los productos y seguridad alimentaria [42, 44, 45, 46].

Tabla 18. Microorganismos en huevos y ovoproductos

Indicadores	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Coliformes fecales*</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
Patógenos	Protocolo	Página
<i>Salmonella enteritidis</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Campylobacter jejuni</i>	3.2.4	123
Alterantes	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas *</i>	3.3.1	148

(*) No consta en los protocolos

*Suelen desarrollarse principalmente en cascara de huevo

1.1.5. Otros alimentos

En este apartado se incluye todas las hortalizas, frutas, cereales y derivados, aguas y bebidas, entre otros.

i. Hortalizas

Las hortalizas se consumen como alimento, ya sea de forma cruda o preparada culinariamente, y que incluye las verduras y las legumbres verdes [53]. De este grupo de destaca los microorganismos (tabla 19) que suelen desarrollarse tanto en las hortalizas crudas, hortalizas / verduras desecadas y hortalizas envasadas en aire o en atmosfera modificada [53, 54, 55].

Tabla 19. Microorganismos en hortalizas

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Pagina
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicotrofos totales</i>	3.1.3	75
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Pagina
<i>Clostridium botulinum</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	119
<i>Clostridium perfringens</i>	3.2.5	128
<i>Vibrio cholerae</i>	3.2.6	131
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Pagina
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

ii. Frutas

Se denomina fruta a todos los frutos comestibles obtenidos que, por su sabor generalmente dulce-acidulado, por su aroma intenso y agradable, y por sus propiedades nutritivas, suelen consumirse mayormente en su estado fresco. Se consideran las frutas frescas, enlatadas, congeladas o refrigeradas y desecadas. En frutas, como cualquier otro alimento, también sufren contaminación microbiológica, siendo común desarrollarse los siguientes microorganismos, Tabla 20 [56, 57].

Tabla 20. Microorganismos en frutas

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Psicotrofos totales</i>	3.1.3	72
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Listeria monocytogenes</i>	3.2.3	114
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

Además, se pueden producir de micotoxinas en frutas desecadas de humedad elevada.

iii. Cereales y derivados

Los cereales son plantas que sirven para la alimentación del hombre y los animales, los más importantes son el trigo, centeno, arroz, maíz, cebada, mijo y avena. De estos se consumen como cereales cocidos, distintos tipos harinas y masas, panes, pastas, productos de pastelería, productos desecados, gachas fermentadas y bebidas alcohólicas, designados como productos derivados de cereales.

La microbiota de los granos de cereales y leguminosas es la proveniente del suelo y el ambiente del depósito, además de la adquirida durante el procesamiento, las especies microbianas más frecuentemente encontradas en los cereales se presentan en la tabla siguiente [20, 21].

Tabla 21. Microorganismos en cereales y derivados

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesófilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Enterococcus</i>	3.1.4	75
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Clostridium botulinum</i>	(*)	
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Shigella</i>	3.2.2	114
<i>Clostridium perfringens</i>	3.2.5	128
<i>Bacillus cereus</i>	3.2.8	143
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido lácticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

Puede ocurrir producción de micotoxinas en los cereales y sus derivados.

iv. Agua y bebidas

Clasifican los sistemas de abastecimiento de agua destinados al consumo humano que sea potable [43], siendo:

- Aguas doces superficiales y subterráneas destinadas al consumo directo o a producción de agua para el consumo humano.
- Agua distribuida por otras fuentes alternativas destinadas al consumo humano directo, como también para ser utilizada en las industrias alimentarias, no tratamiento o en la conservación de géneros alimenticios.

Y excluyen de lo anterior, las aguas minerales naturales y embotelladas que deben ser a cubiertas por otras legislaciones en vigor sobre la materia, las aguas que son productos medicinales, y todas las otras aguas aunque utilizadas en industrias alimentarias por determinación expresa requieran una mayor exigencia de calidad.

El mayor riesgo microbiano del agua es el relacionado con el consumo de agua contaminada con excrementos humanos o animales, aunque puede haber otras fuentes y vías de exposición significativas, se presentan en la tablas 18, las posibles análisis en de microorganismos en aguas y bebidas [43, 58, 59].

Tabla 22. Microorganismos en aguas y bebidas

<u>Indicadores</u>	Protocolo	Página
<i>Aerobios mesofilos</i>	3.1.1	64
<i>Enterobacterias</i>	3.1.2	68
<i>Enterococos</i>	3.1.4	75
<i>Coliformes totales</i>	3.1.6	82
<i>Coliformes fecales</i>	3.1.7	90
<i>Escherichia coli</i>	3.1.8	95
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.9	104
<u>Patógenos</u>	Protocolo	Página
<i>Salmonella spp</i>	3.2.1	108
<i>Clostridium perfringens</i>	3.2.5	119
<i>Vibrio choleare</i>	3.2.6	131
<u>Alterantes</u>	Protocolo	Página
<i>Pseudomonas</i>	3.3.1	148
<i>Bacterias ácido laticas</i>	3.3.2	151
<i>Mohos y levaduras</i>	3.3.3	155

(*) No consta en los protocolos

2. Técnicas microbiológicas

En este apartado enfoca desde las técnicas asépticas que deben tener en cuenta al realizar un análisis de microorganismos en alimentos al momento de aplicar las técnicas descritas en el apartado anterior, siendo estos la área de trabajo, esterilización de los medios, la toma de muestra, las técnicas asépticas de manipuleo del material y las gestión de residuos. Además, se describen los métodos de siembra, recuentos y la interpretación de los resultados. Al final centra en las técnicas de análisis por cada microorganismo.

2.1.Limpieza del área de trabajo: condiciones asépticas

Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto se requiere un ambiente limpio y ordenado. La *técnica aséptica* es un método utilizado para manipular productos estériles a fin de mantener su esterilidad (ausencia total de contaminación) [19]. Este método se refiere a una serie de procedimientos para evitar la contaminación producto por microorganismos y partículas y compete al operador realizar estos procedimientos correctamente. *Asepsia* es el conjunto de medidas que utilizamos para evitar la entrada de microorganismos un ambiente que lógicamente no los tiene, entonces un ambiente aséptico es uno que está libre de la infección [19].

Limpia el área de trabajo utilizando algún desinfectante como puede alcohol u otro. En la actualidad se utilizan campanas de siembra, compartimentos protegidos total o parcialmente por un cristal, donde se coloca la fuente de calor, que pueden incorporar extractores de aire o lámparas especiales que mantienen las condiciones asépticas, pero esta antes de su utilización deben ser desinfectas y mantenerlas en Luz UV hasta el momento de trabajo. O se puede realizar los análisis en un área desinfectada con alcohol y siempre próximo de una llama de machero. Para mantener las mínimas condiciones asépticas durante los análisis, se recomienda:

- Todo el material empleado en el manejo de microorganismos deberá estar estéril.
- Se procurará disponer de todo el material necesario para el procesamiento de la muestra microbiológica al alcance de la mano, para evitar desplazamientos innecesarios.

- Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de la contaminación. Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en la piel, pelo, aire, ropa,, etc.) contaminen las muestras

2.2.Preparación y esterilización de materiales y medios de cultivos

La esterilización es la principal finalidad de la preparación de material en Microbiología, y se define esterilización como la destrucción o eliminación total de todos los microorganismos vivos en un objeto o material, incluida las endosporas bacterianas [19, 47]. El material que se va a esterilizar debe prepararse de tal manera que se conserve sin contaminar una vez esterilizado.

Existen varios métodos para llevar a cabo el proceso de esterilización y la elección de un determinado viene condicionado por el tipo de material que se quiere esterilizar. El método más comúnmente empleado para destruir los microorganismos es el calor, entre otras razones porque es el más económico y el más fácil de controlar.

El calor utilizado con este fin puede aplicarse en forma de calor seco o de calor húmedo, siendo, el calor seco destruye los microorganismos por efectos de oxidación y se requieren temperaturas muy elevadas, se emplea estufas a 160 °C – 180 °C durante 2 horas generalmente para material de vidrio u otros materiales que sean termo resistentes y el calor húmedo elimina los microorganismos a temperaturas menores, ya que la presencia de agua acelera la rotura de los puentes de hidrógeno responsables de la estructura tridimensional de las proteínas, haciendo que éstas se desnaturalicen y pierdan por tanto su funcionalidad, en este caso se emplea el autoclave que trabaja presión encima de la atmosférica y una temperatura de 121 °C durante 15 – 20 minutos [47].

2.2.1. Preparación de material

Normalmente en un análisis microbiológico, suelen usar material de vidrio, en que estos deben estar previamente esterilizados. El material que se va a esterilizar debe prepararse de tal manera que se conserve sin contaminar una vez esterilizado hasta el momento de usarlo. Todo el material de vidrio se suele esteriliza con calor seco, pero puede utilizarse el autoclave (calor húmedo).

- Los tubos, matraces y frascos se cierran con algodón y cubrirse éste con un papel impermeabilizado.
- Las pipetas se les coloca en la boquilla un trocito de algodón que actuará como filtro, una vez preparadas, se introducen en estuches o cajas metálicas, o bien se envuelven individualmente en papel satinado.



Estos pueden ser esterilizados en autoclave a 121 °C o en estufa de esterilización que alcancen 180 °C. Para las pipetas automáticas suelen esterilizarse las puntas involucradas en papel aluminio, en autoclave.

- El material de plástico desechable ya se suministra estéril y listo para su uso. Por ejemplo, las placas de Petri se introducen en bolsas de plástico selladas y se esterilizan con óxido de etileno o radiaciones.
- Las soluciones y medios de cultivo líquidos se introducen en matraces o tubos y se esterilizan, generalmente, en autoclave.



2.2.2. Preparación de medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, preparados en el laboratorio, que suministran los compuestos necesarios para el desarrollo de los microorganismos [47].

Algunas bacterias pueden crecer satisfactoriamente en casi cualquier medio de cultivo, otras bacterias necesitan medios especiales y existen algunas que no pueden crecer en ninguno de los medios desarrollados hasta ahora. Los distintos tipos de medios de cultivo varían según las necesidades de los microorganismos objeto de estudio, pero todos han de mantenerse estériles hasta el momento de la siembra. Según su utilización pueden clasificarse en [48]:

1. **Medios generales**
2. **Medios de enriquecimiento**
3. **Medios selectivos**
4. **Medios diferenciales**

La mayoría de los medios de cultivo se encuentran comercializados, normalmente bajo la forma de liofilizados que es preciso rehidratar, en que lo propios fabricantes indican en el envase tanto la forma de preparar el medio como la composición del mismo. Deben seguirse las indicaciones de la etiqueta teniendo en cuenta que se especifican para pequeños volúmenes, nunca superiores a un litro.

Guía para la preparación de medios de cultivo:

A continuación se citen los pasos para preparación del medio hasta su esterilización.

Lea siempre la etiqueta del envase del medio antes de su uso.



- Pesar la cantidad deseada del mismo y disolverla en agua destilada (*libre de inhibidores del crecimiento*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Llevar a esterilización en autoclave, se es necesario (**dependiendo del medio**).
- Antes de su esterilización, los medios líquidos en caldo se distribuyen en los recipientes adecuados (*tubos o matraces*). En ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe exceder un tercio del volumen total de éste.
- Si es un medio sólido, habitualmente se procede a hervir el agar después de esterilizarlo. Cuando el agar se funde en solución acuosa en ebullición, se percibe con el cambio de color (*se aclara*), una vez hervido se mantiene en baño maría a 45 – 50 °C.
- Se lleva a esterilizar el medio en autoclave a 121°C durante 15 min, en caso de líquidos el escape de vapor debe ser más lento.
- Finalizada la esterilización en el autoclave:
 - Los medios líquidos se dejarán enfriar a temperatura ambiente (*en un medio estéril*).
 - Los medios sólidos (que contengan agar) contenidos en tubos deben inclinarse para que al solidificarse, adopten la forma de agar inclinado (*slant*) si tal es su finalidad o se enfría a 45 -50°C en un baño maría, hasta que se dispense en las placas.



Las placas de Petri pueden también ser preparadas ahora, vertiendo el medio aún fundido y estéril dentro de ellas en un ambiente aséptico. Es posible asimismo conservar el medio destinado a placas solidificado y estéril en tubos, que se fundirán al baño María en el momento de prepararlas. Caldos y medios sólidos pueden conservarse, una vez esterilizados, a temperatura ambiente. Sin embargo, para reducir su deshidratación y el consiguiente cambio de las concentraciones de los componentes es preferible conservarlos a 4°C.

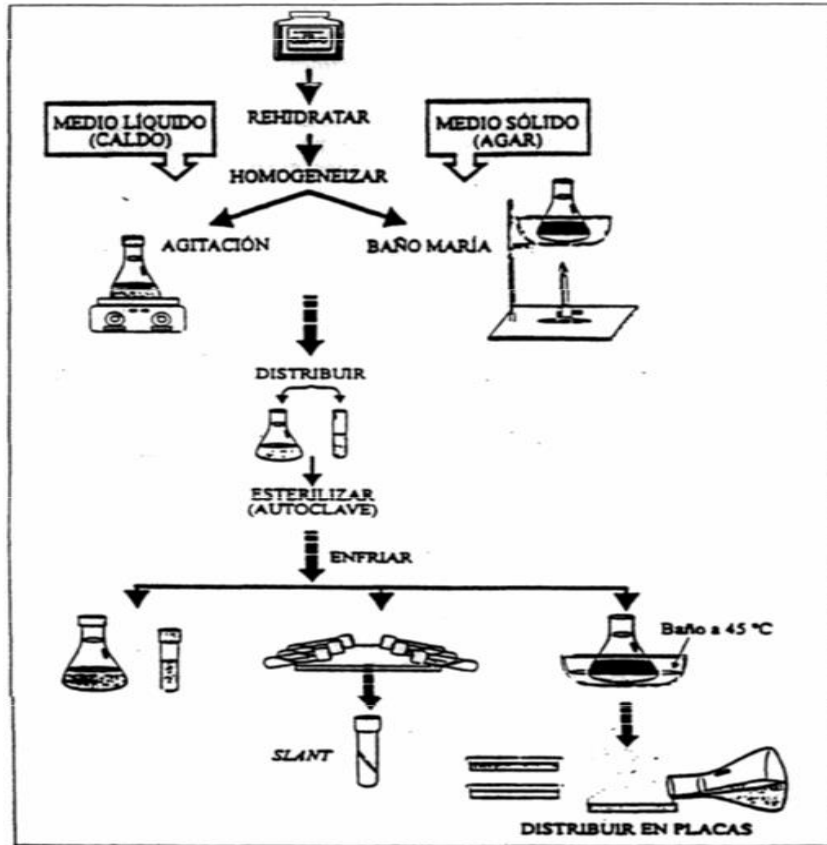


Fig. 2. Preparación de medios de cultivo. Fuente: Ahmed y Carlstrom (2006)^[48]

2.3.Toma de muestra

Las análisis se solicitan para obtener respuesta a una demanda específica, por lo que deben ser realizados sobre muestras recogidas de forma correcta y aplicando las técnicas más adecuadas.

Planes para toma de muestra es un procedimiento para tomar una muestra, realizar un análisis de los elementos apropiados y tomar las decisiones adecuadas basadas en criterios convenidos [50]. Estos planes dependen de la finalidad del análisis, como

evaluación de riesgos sanitarios, mantenimiento de la calidad en el producto, análisis de tendencia, control de material prima, control en la línea de producción, etc.

2.3.1. Toma de muestra asépticamente

- Tomar la muestra asépticamente, empleando cubiertos y botes previamente esterilizados.
- La muestra debe ser representativa y de cantidad suficiente.
- Etiquetada, en el momento de su recogida indicando los datos: lugar de toma de muestra, temperatura, día, nombre de la persona que la recogió,

Método del hisopo – método no destructivo

- Se humedece un hisopo en solución salina estéril.
- Se frota primero verticalmente, luego horizontalmente y, por fin diagonalmente durante un mínimo de 20 segundos por toda la superficie en la superficie del alimento, delimitada con la plantilla.
- Tras la utilización del hisopo húmedo, se repite el mismo procedimiento de muestreo con uno seco.
- Ambos se recogen en un tubo con 10 ml de solución salina estéril y se transportan al laboratorio.

Método destructivo

- Se trata de obtener muestras de tejido del alimento cortando una fina lámina de la superficie.
- Las muestras se obtienen con un instrumento estéril (pinza y bisturí).
- Las muestras se colocan asépticamente en una bolsa con líquido de dilución y así se transportan en refrigeración al laboratorio donde se hacen diluciones decimales y siembra en placa.

Temperatura y tiempo

Las condiciones de transporte para la mayor parte de los alimentos que se mantienen a temperatura ambiente, refrigerados o congelados son las mismas que las empleadas para su almacenamiento [48].

- Productos congelados: ≤ -20 °C
- Productos refrigerados: ≤ 5 °C
- Productos a temperatura ambiente: 20 – 30 °C

Si transcurre un tiempo entre la toma de muestra y el análisis, se mantendrá la muestra en refrigeración hasta su análisis, que debe realizarse dentro de las 24 horas después de tomada la muestra. Pero si no es posible, se mantienen las muestras a 2 y 6 °C. La FAO permite el retraso de un análisis hasta un máximo de 36 horas cuando las muestras han sido refrigeradas entre 0 - 4 °C.

2.3.2. Manipulación del alimento

En análisis microbiológico de alimentos, deben aplicarse las siguientes directrices en la manipulación del alimento.

- Debe inspeccionarse el envase visualmente, leer la etiqueta (anotar los datos importantes). Si la muestra es recogida del local de procesamiento, deben usarse técnicas asépticas.
- Los alimentos deben mantenerse en el frigorífico del laboratorio hasta su análisis.
- El responsable del laboratorio debe transferir asépticamente el contenido de los envases al detalle de alimentos a bolsas plásticas estériles y mezclarlo con una espátula estéril. En algunos alimentos es necesario triturarlos o desmenuzarlos antes de tomar la muestra.
- Las muestras deben pesarse en bolsas estériles de stomacher o en una placa de Petri cuando se usa un homogeneizador de cuchillas.

2.3.3. Muestreo: dilución madre y seriada

La carga microbiana de los distintos alimentos es muy variable, antes de que una muestra de un alimento se analice microbiológicamente debe diluirse para el recuento pueda realizarse con una razonable precisión. Consiste en realizar diluciones sucesivas

de la muestra en condiciones de esterilidad con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en placas de Petri.

i. Preparación de agua de peptona

Agua de peptona

Se utiliza frecuentemente como diluyente, contiene 0,1% de peptona y un 0,5% de NaCl. Pero algunos microorganismos prefieren utilizar el agua de peptona en vez de solución salina fisiológica [48].

Como explica en el apartado Preparación de medios 4.4.2., se pesa la peptona y añadir agua destilada (usar matraces Erlenmeyer o matraces aforadas), según las informaciones que viene en la envase. Llevar a esterilizar en autoclave, a 121°C durante 15 min. Dejar enfriar a temperatura ambiente, en un medio estéril. La esterilización puede ser hecha directamente en los tubos de ensayo, en que después de rehidratada la peptona, se llena en los tubos de ensayo 9ml (en una gradilla), y se lleva a esterilizar.

ii. Homogenización

El muestreo y homogenización antes del análisis son más simples en muestras líquidas que en alimentos sólidos. Mientras las muestras líquidas se mezclan manualmente, los sólidos requieren una homogenización en un diluyente apropiado para dispersar los grumos y liberar los microorganismos de la matriz alimentaria. Los homogeneizadores de cuchillas o el stomacher son los más utilizados, siendo que estos divide el alimento en pequeñas partículas que se mezcla con el diluyente.



iii. Diluciones seriadas

Las diluciones decimales de un alimento se preparan mezclando una parte de la muestra con nueve partes del diluyente que habitualmente es disolución salina fisiológica o agua de peptona [47; 48]. Trabajando en condiciones asépticas (campana microbiológica), coloque el material enfrente de forma alcanzarlo fácilmente.

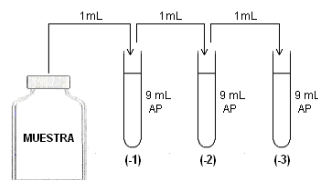
Prepare una gradilla con tubos de ensayo necesarios, marque los tubos con el factor de dilución ($10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, \dots, 10^{-n}$), considerando el macerado inicial como 10^{-1} . Con el

agua de peptona 0,1%, previamente esterilizada, se prepara la muestra madre, en que esta debe ser triturada y homogenizada utilizando un stomacher. Se tratando de un sólido, se siguen los siguientes pasos:

1. Se toma 10g del alimento para 90 ml de diluyente estéril (*se posible, mejor pesar 25g del alimento para 225 ml de diluyente estéril*).



2. Utilizando una bolsa de plástico, se homogeniza durante 2 minutos (*el tiempo varía según tipo de alimento*) en stomacher (*macerado 1:10/10⁻¹*).
3. Usando técnicas de asepsia, en los tubos de ensayo estériles se llena 9ml de diluyente estéril usando pipetas o puntas estériles para cada dilución (*este paso puede pasarlo, cuando el agua de peptona fue esterilizada directamente en los tubos*).
4. A partir del macerado 10⁻¹ (*dilución inicial*), se retira 1 ml da misma, y se añade al primero tubo de ensayo con 9 ml de diluyente (*se considera dilución 10⁻²*), y de esto tubo se retira 1 ml y se añade al según tubo de ensayo (*se considera 10⁻³*), y se repite la misma operación para las siguientes diluciones (*10⁻⁴, 10⁻⁵,10⁻ⁿ*), el número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar,



5. Estos tubos deben ser homogenizados en un agitador de tubos / vortex o manualmente, durante algunos segundos.



2.4. Técnicas de siembra

Siembra es la incorporación a un medio de cultivo de una muestra (inóculo), con propósitos cuantitativos o cualitativos [49]. En este apartado se distinguen los diferentes medios/técnicas que se pueden realizar para análisis de microorganismos los métodos de siembra más empleados se describen a continuación.

2.4.1. Métodos de Recuento en Placa

Consiste en realizar diluciones sucesivas de la muestra en condiciones de esterilidad con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en placas de Petri [48]. Evidentemente, alguna de las diluciones será tal que al distribuir una parte de ella en la placa originará colonias separadas.

De igual manera, conocidos el número de colonias, la cantidad sembrada y la dilución correspondiente, esta técnica permite calcular el número de microorganismos viables en la muestra original. La muestra homogenizada, diluida o sin diluir, se mezcla con el medio de agar tanto en la técnica de siembra en profundidad o en superficie.

i. Siembra en superficie

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 [19, 47, 48]. La siembra en superficie es diluir sobre la superficie del agar para lograr realizar recuento de UFC (unidades formadoras de colonias), se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en la superficie del agar.

- Se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo solidificado, 0.1 ml de cada dilución seriada.
- Luego realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando un asa de Drigalski estéril (*aplicado técnicas de asepsia*).
- Se llevan las placas a incubar (la temperatura y el tiempo de incubación elegidos varía según el tipo de microorganismos) y pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido sobre la superficie del agar.

ii. Siembra en masa o en profundidad

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 [19, 47, 48]. El método resulta aplicable para productos alimentarios y muestras ambientales, como en la siembra en superficie. La siembra en profundidad es mezclar el inóculo con el agar para lograr realizar recuento de UFC, se caracteriza porque durante la incubación las colonias crecen en el interior de la masa del agar.

- Se deposita 1 ml de cada dilución en placas estériles, vacías.
- Posteriormente, se agrega a cada placa 15 a 20 ml del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y mantenido a unos 45 - 50°C.
- Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimientos circulares y de vaivén (siempre sin levantar la placa de la mesa). Con esto se consigue mezclar el inóculo con el agar.
- Se deja solidificar y se llevan las placas a incubar (la temperatura y el tiempo de incubación elegidos varía según el tipo de microorganismos). Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar).

En este método de siembra también se puede realizar en *Siembra en doble capa*, se procede de la misma manera descrita anteriormente, vertido un una cantidad de medio en la placa (generalmente 10 ml aproximado). Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior. Este método se utiliza para microorganismos anaerobios facultativos y microaerofílicos [47].

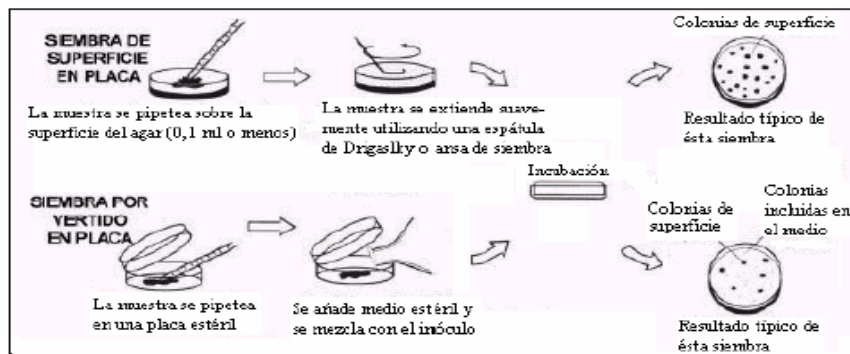


Fig. 3. Métodos de siembra en placa Fuente: Ahmed y Carlostrom (2006)^[48]

Nota:

- *Se recomienda sembrar al menos dos placas por cada dilución.*
- *En la transferencia de las diluciones a las placas es posible emplear tan sólo una pipeta si se comienza por la dilución del factor de dilución más alto (la más diluida). En caso contrario, habrá que emplear una pipeta para cada dilución.*

2.4.2. Siembra en tubos

Métodos de recuento por número más probable (NMP)

Se utiliza habitualmente cuando se sospecha que el recuento de los microorganismos que estamos buscando va a ser bajo. Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio o no), en diferentes cantidades de muestra [47, 48].

Se analizan en forma paralela por triplicado (3 series) o quintuplicado (5 series) porciones de la muestra cada vez menores que se dejan crecer en medio líquido. Luego de la incubación, se observan y cuenta el número de tubos positivos. Cada tubo positivo, significa que en la cantidad de muestra en él sembrada había por lo menos 1 microorganismo de los que se está contando.

La interpretación de los resultados, se hace en base a una distribución de tipo Poisson, y en general se emplean tablas preparadas de acuerdo a la cantidad de muestra que se siembra en cada serie de tubos.

- Preparar diluciones seriadas de la muestra en agua de peptona (tomando en cuenta el número de series)
- Identificar cada uno de los tubos (número de serie, factor de dilución)
- Se tienen preparado tres series de tres tubos cada una conteniendo cada tubo unos 10 ml de caldo de cultivo adecuado (según el tipo de microorganismos de los que queremos hacer el recuento).
 - En cada uno de los tubos de la primera serie, se siembra 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10 (dilución 10^{-1}).
 - En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100 (dilución 10^{-2}).
 - En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1.000 (dilución 10^{-3}).
- Incubar las tres series de tubos a la temperatura adecuada y durante el tiempo adecuado según el tipo de microorganismos de los que queremos hacer el recuento.

- Pasado el tiempo de incubación se examinan cada uno de los tubos para comprobar si es positivo o negativo:
 - Se consideran positivos los tubos que presentan turbidez o sedimento blanco en el fondo del tubo.
 - La turbidez indica crecimiento del microorganismo y ese tubo es considerado positivo. El mismo significado tiene el sedimento blanco.
 - La ausencia de turbidez y sedimento indica que no ha existido crecimiento y la prueba se considera negativa para ese tubo

Todos los tubos considerados positivos (turbidez y/o sedimento) en cada serie se utilizan para el cálculo del NMP.



2.4.3. Métodos rápidos aplicados en microbiología de alimentos

Tradicionalmente, el método estándar de recuento en placa ha sido ampliamente utilizado en los últimos años en microbiología de los alimentos. Sin embargo, aunque sencillo, resulta laborioso, requiere de un volumen considerable de tubos de ensayo, pipetas, preparación de grandes volúmenes de medio para las diluciones, así como de espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Como consecuencia de estas limitaciones, se han registrado distintos avances entre los que se incluyen los sistemas de siembra en espiral, Petrifilm, entre otros, que permiten simplificar el proceso.

i. Siembra en espiral

Permite de forma rápida obtener el recuento de células viables mediante el uso de una aguja de siembra que distribuye en forma de espiral una muestra líquida en la superficie de una placa con agar (los medios de cultivo utilizados pueden ser o no selectivos) [48, 51].

Es una técnica de siembra ampliamente aceptada desde los años 70 que permite reducir el número de placas a sembrar. Una sola siembra en espiral equivale a 3 placas de

diluciones seriadas decimales. La técnica se basa en la siembra formando una espiral de Arquímedes. Esta espiral de Arquímedes produce un gradiente de concentración que va decreciendo desde el centro hasta la periferia de la placa a medida que rota sobre sí misma [51].

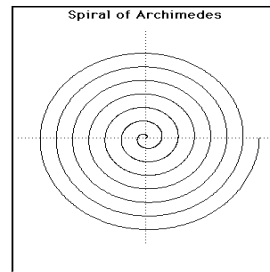


Fig. 4. Espiral de Arquímedes

El volumen de muestra que se deposita en cada zona de la placa es conocido y el tiempo requerido en realizar esta operación es de segundos, lo que contrasta con el elevado tiempo empleado en un sistema de siembra manual (siembra en superficie y en profundidad).

Una vez que se ha depositado la muestra, como en los otros métodos la placa se incubaba a la temperatura adecuada para permitir el crecimiento de los microorganismos diana. Entre las ventajas de esta técnica, destacan los costes relativamente bajos del material requerido, sencillez en su realización, ahorro de tiempo, así como minimización de errores debido a la automatización del método de recuento [51]. El principal inconveniente descrito está relacionado con la posible obstrucción de la aguja de siembra con partículas pertenecientes a la matriz del alimento.



Fig. 5. Equipo de sembrado automático en espiral para placas de 100-150 mm Ø

ii. Siembra en Petri filme

Es un ingenioso desarrollo que utiliza medios de cultivo deshidratados sobre películas plásticas de tamaño y grosor muy reducidos [51]. **Petrifilm** es una película plástica que

contiene el medio deshidratado, en que las bacterias procedentes de bacterias aerobias contadas se visualizan como machitas rojas en el área de inoculación [48].

- Se deposita 1 ml de cada dilución en la superficie del petrifilm marcado
- Deslice cuidadosamente hacia abajo la película con el fin de evitar que queden burbujas atrapadas
- Coloque el difusor encima del inoculo con la varilla elevada sobre la parte superior de la película.
- Aplique suavemente presión sobre el difusor para distribuir el inoculo sobre la totalidad de la área circular
- Abandone el difusor y espere 1 minuto para que el gel solidifique.
- Se llevan las placas a incubar (la temperatura y el tiempo de incubación elegidos varía según el tipo de microorganismos). Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar.

iii. Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos

Transferencia de inoculo

Existen muchos métodos de siembra o de transferencia de microorganismos o de inocular medios de cultivo [47]. Generalmente se realiza en 3 etapas:

- 1) Esterilizar el asa, hilo o pipeta de siembra;
 - 2) Obtener o extraer el inóculo y
 - 3) Transferirlo al medio estéril
- **Siembra de medio líquido a medio líquido:** El procedimiento se puede realizar con asa en anillo, aguja o pipeta y en tubos de ensayo, matraces o frascos.
 - **Siembra de medio sólido a medio líquido:** El procedimiento se puede realizar con asa en anillo o aguja y en tubo de ensayo, matraces o frascos.
 - **Siembra de medio sólido a medio sólido:** El procedimiento se puede realizar con asa o aguja y en tubo de ensayo, ya sea en superficie en placa Petri.

- **Siembra de medio líquido a medio sólido:** El procedimiento se puede realizar con asa en anillo, aguja o pipeta y en tubo de ensayo, ya sea en superficie en profundidad o en placa Petri, ya sea en superficie o por homogenización.

1. Técnica de transferencia en tubos de ensayo

a. En medio líquido con asa

Transferir asépticamente, con el asa de siembra, una pequeña muestra de los microorganismos, desde el tubo que contiene el material problema al tubo con medio de cultivo estéril. Sumergir el asa en el líquido y agitar para desprender y diluir la muestra. Incubar el tubo recién sembrado en estufa, durante 24-48 horas a la temperatura óptima de crecimiento.

b. En medio líquido con pipeta

Introducir asépticamente la pipeta Pasteur o la *pipeta graduada* en el medio líquido que contiene los microorganismos y, aspirando de forma adecuada, sacar una cantidad establecida de material que se transfiere al tubo con medio de cultivo estéril. Incubar en estufa a la temperatura y tiempo adecuados.

c. En medio sólido (agar inclinado)

Con el asa de siembra estéril tomar los microorganismos de la muestra e inocular el tubo realizando un movimiento de zig-zag en la superficie. El proceso se inicia en el fondo y se va avanzando hacia arriba por el área inclinada. Incubar en estufa a la temperatura y tiempo adecuados.

En ocasiones los medios sólidos en agar inclinado deben sembrarse "en picadura y en estría". En este caso debe sembrarse con hilo de siembra y consiste en introducir primero el hilo en la parte no inclinada del agar (fondo del tubo) haciendo un alineamiento recto y posteriormente sembrar en zig-zag sobre la superficie inclinada.

d. En medio semisólido

La siembra en este tipo de medio, que contiene una proporción menor de agar que los medios sólidos y que se introduce en tubos, se lleva a cabo con un hilo de siembra esterilizado, con el cual se toma la muestra. El medio queda inoculado al introducir el

hilo en profundidad hasta el fondo del tubo, retirándolo posteriormente por la misma trayectoria utilizada al realizar la picadura.

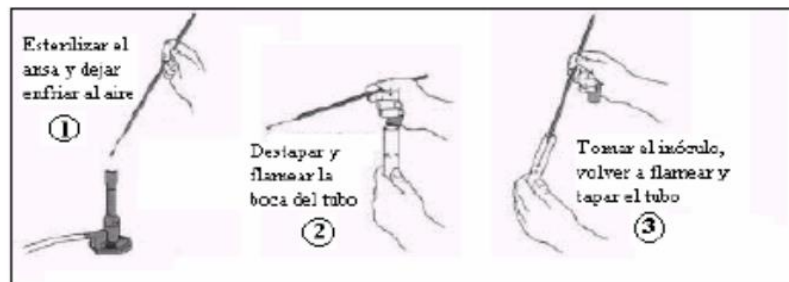


Fig. 6. Transferencia e inoculación de microorganismos. Fuente: Ahmed y Carlostrom (2006)^[48]

2. En placa de Petri

a. Estría múltiple en superficie

Con un asa de siembra, previamente esterilizada, se toma una muestra del cultivo de microorganismos y se extiende sobre un área pequeña de la superficie de la placa con agar nutritivo, en forma de estrías muy juntas, pero sin hacer presión para no dañar el agar [48].

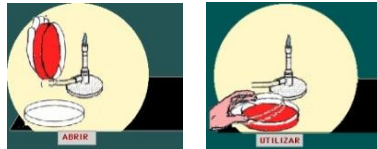
Se flamea el asa, se enfría y después de rozar la siembra realizada previamente, se extiende de nuevo por otra zona de la placa haciendo nuevas estrías. Este proceso se repite sucesivamente, flameando y enfriando el asa al comienzo de las sucesivas siembras en estría. Se lleva la placa a incubar, a la temperatura adecuada, siempre en posición invertida. Mediante esta técnica se obtienen colonias aisladas a partir de un cultivo que contenga un elevado número de bacterias.

2.5. Manipulación de material en condiciones asépticas

Existen diversas técnicas de inoculación, ya sea en tubo de ensayo, placa de Petri, matraz, etc., siendo necesario en cualquiera de ellas, hacerlo en condiciones asépticas, a continuación se describen algunos pasos para manipulación de algunos materiales (en machero). Para evitar la contaminación de los medios y materiales de cultivo por microorganismos no deseados se emplean las siguientes **técnicas asépticas**:

i. Manipulación en condiciones asépticas de las Placas petri

- Siempre hay que colocar la placa invertida dentro de la zona aséptica que origina el mechero (o cabina microbiológica)
- Abrir la placa en condiciones asépticas. La abertura de la placa siempre orientada hacia la llama del mechero. La tapa de la placa debe colocarse boca arriba dentro de la zona aséptica que origina el mechero.

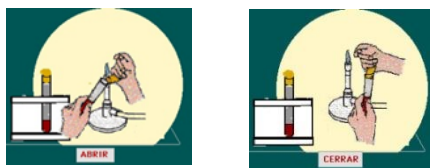
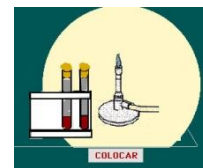


- Si en algún momento durante la utilización y/o manipulación ponemos la placa petri abierta (base y/o tapa) fuera de la zona aséptica se contaminará con los microorganismos del ambiente. En este caso debe mantenerlas siempre cerco del machero (o cabina microbiológica). Se cierra la placa después de utilizarla dentro de la zona aséptica y al final siempre tiene que quedar invertida.



ii. Manipulación en condiciones asépticas de recipientes de vidrio: tubos, matraces, etc.

- Colocar los tubos o matraces en el puesto de trabajo. Siempre que contengan algún producto en su interior (medio de cultivo, suspensión de microorganismos...) o estén estériles, deben estar tapados con una torunda de algodón o con un tapón. Los tubos o matraces a utilizar se colocan en una gradilla (*a la izquierda en el puesto de trabajo, esta colocación facilita la manipulación del material de vidrio en condiciones asépticas*).
- Abrir los tubos o matraces en condiciones asépticas. La posición del tubo o recipiente de vidrio será oblicua, dirigiendo la apertura hacia la llama del mechero.



- Flamear la boca de los tubos o matraces, después de abrir el tubo o matraz en condiciones asépticas, durante unos segundos mediante un movimiento de rotación. Después de su utilización y antes de cerrarlo hay que volver a flamear. Después de flamear cerrar el tubo o matraz y colocarlo.

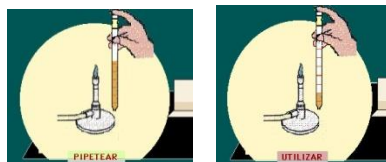


iii. Manipulación en condiciones asépticas de pipetas de vidrio estériles

- Colocar las pipetas estériles en el puesto de trabajo. Cubiertas con papel aluminio y cerco del machero.
- Abrir las pipetas en condiciones estériles. *Se agarra con la mano izquierda la pipeta estéril por la punta y se desenvuelve con la derecha por la parte de atrás.* Flamear las pipetas después de abiertas con movimientos de vaivén.



- Pipetear en condiciones estériles, procurar mantener la pipeta lo más horizontal posible (*nunca pipeta con la boca*), procurando que no se vierta muestra en el puesto de trabajo

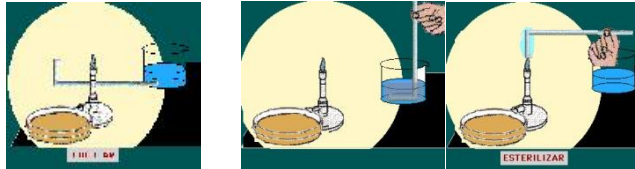


- Después de su utilización colocar las pipetas dentro de un recipiente. Si la muestra que se ha pipeteado contiene microorganismos el recipiente debe de tener un desinfectante (normalmente lejía).



iv. Manipulación en condiciones asépticas de asa de Drigalski o asa acodada de vidrio

- Colocar en el puesto de trabajo, y siempre hay que esterilizar el asa antes de utilizarla. Para lo que primero se introduce en alcohol y posteriormente se flamea.



- Después de la esterilización se deja enfriar, durante unos segundos en la zona aséptica o apoyándola sobre el interior de la tapa de la placa que se va a sembrar.



- Después de esteril y fría se utiliza para extender una muestra líquida en una placa, una vez añadida la muestra, en condiciones estériles en la placa, los movimientos para extender ésta de forma homogénea por toda la superficie de la placa deben ser circulares y de vaivén.



- Después de la utilización siempre hay que volver a esterilizar el asa antes de dejarla en el puesto de trabajo para evitar contaminar el ambiente. Esto se aplica también cuando se está sembrando varias placas.



2.6. Gestión de residuos

En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, son pocos los materiales contaminados que es preciso retirar del laboratorio o destruir.

Los materiales de desecho deben transportarse en contenedores resistentes a prueba de escapes. La basura debe esterilizarse en autoclave, incinerarse o descontaminarse de algún otro modo antes de su evacuación [19, 63]. El material reutilizable debe descontaminarse por medios adecuados. Nunca se eliminará material infeccioso por las pilas o fregaderos de laboratorio ni ningún otro tipo de drenaje similar

2.6.1. Procedimientos de manipulación y eliminación de material

Deberá adoptarse un sistema de identificación y separación del material infeccioso y sus recipientes. El personal del laboratorio de microbiología de alimentos debe descartar el material de acuerdo a los siguientes lineamientos [49, 63]:

i. Desechos biológicos

- Ningún producto biológico se debe eliminar como basura común.
- Todo material que se use en el análisis de una muestra será considerado como contaminado, aun cuando los cultivos hayan resultado negativos; por lo tanto, el proceso de descontaminación se debe aplicar previo al lavado o descarte del mismo.
- El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos de descontaminación. El material destinado a la descontaminación y eliminación debe introducirse en recipientes (por ejemplo en bolsas de plástico resistentes al tratamiento en autoclave).
- Se tratando de material desechable, como placas de Petri y puntas de pipetas plásticas, estos después de esterilizados pueden ir a la basura. Se el material utilizado fuer de vidrio, estos después de esterilizados, pueden ser reutilizados.
- En cada laboratorio, se debe disponer de recipientes con tapa (baldes) debidamente rotulados, para depositar el material contaminado y todos los desechos generados en el laboratorio que implican riesgo biológico y que deben ser descontaminados lo más rápido posible,
- Por seguridad los bolsas de seguridad se deben llenar hasta 2/3 partes de su capacidad, para evitar derrames al momento del traslado.
- Los desechos punzo cortantes: agujas hipodérmicas, hojas de bisturí, o materiales de vidrio quebrados, entre otros, se deben colocar en recipientes de poliuretano rígidos.



ii. Manejo de material contaminado en el área de trabajo

Sobre las mesas de trabajo, los analistas deben disponer de pequeños recipientes autoclavables. Cada uno de ellos debe tener bolsas de bioseguridad desechables para descartar:

- Material reutilizable (ej. pipetas Pasteur, pipetas de vidrio, etc).
- Material desechable (pipetas plásticas desechables, puntas de micropipeta, entre otros).

iii. Descarte de muestras de alimentos y cepas

- Los alimentos que se reciben para análisis (involucrados en brotes, para control de regulación y control o denuncias, etc), se deben colocar en bolsas de bioseguridad dentro de recipientes con tapas y se deben descontaminar por autoclavado antes de ser desechados
- Las cepas de patógenos aisladas en el laboratorio o enviadas para confirmación, por los laboratorios de la red, o por clientes externos, se deberán descartar como mínimo una semana después de que se haya generado el reporte final. La operación se deberá anotar en Registro de descarte de muestras del laboratorio. El Laboratorio podrá almacenar copia de dichas cepas en congelación, si así lo requiriese.

iv. Descarte de desechos generales no contaminados

Desechos generales son todos aquellos residuos como papelería, envolturas, etc. Estos serán descartados en los basureros para basura común, que están ubicados en cada una de las áreas. Material reutilizable no contaminado como erlenmeyers, probetas de vidrio, balones, etc., utilizados en la preparación de reactivos y medios de cultivo se pueden lavar sin descontaminación previa.

2.7. Incubación y Recuento

i. Incubación

La temperatura de incubación varía para cada microorganismo, temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido. De acuerdo con el rango de temperatura a la que crecen, los microorganismos se dividen en [48]:

- **Psicrófilos:** Microorganismos capaces de crecer a bajas temperaturas, es decir, temperaturas de refrigeración (1-10 °C).
- **Mesófilos:** Microorganismos cuya temperatura óptima de crecimiento se encuentra dentro de un rango de 32 – 37 °C.
- **Termófilos:** Microorganismos cuya temperaturas óptima son más elevadas, en el rango de 50 - 60 °C.

En microbiología de alimentos se utilizan normalmente diversas temperaturas de incubación. Para microorganismos patógenos como *Salmonella* spp., la temperatura de incubación es similar al de los mesofilos, o sea, temperatura del cuerpo humano 37°C. la mayoría de los métodos de detección y recuento establecen la temperatura de incubación de mesofilos 35°C, temperaturas más bajas (30°C) son satisfactorias para mohos y levaduras [47].

Las temperaturas de refrigeración (4°C), se utilizan para el enriquecimiento en frío de microorganismos psicrotrofos, como *Listeria monocytogenes*, puede crecer también en temperaturas de 22, 30 y 35°C

Las placas inoculadas en un medio de cultivo se invierten antes de someterlas a incubación. Se las placas se incuban con las tapas hacia arriba, el agua que se condensa cae a la superficie del agar ocasionando una difusión de las colonias.

ii. Recuentos

Como las colonias pueden originarse tanto de una célula como de un grupo de células, el recuento en microbiología de los alimentos se refiere a la enumeración del número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), o células microbianas viables, presentes en una unidad de volumen o peso de la muestra.

a. En placas

La enumeración del número de colonias en placas de agar puede también denominarse recuento, el recuento en placa determina el número de células o agregados celulares que pueden formar colonias en las placas de agar. La población final enumerada por este método se expresa en términos de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen o peso (UFC/ml o UFC/g).

Para realizar el contaje, se utiliza un cuenta-colonias; se pone la placa de Petri con la base hacia arriba y, si es preciso, se divide en sectores marcando mediante un lápiz grueso a lo largo de los diámetros. El analista debe marcar las colonias contadas en el fondo de la placa con un lápiz marcador con el fin de asegurarse que las mismas colonias no se enumeran de nuevo.



Dependiendo de la técnica usada para sembrar, o sea, siembra en superficie, siembra en profundidad o en espiral, la expresión para cálculos de microorganismos en alimentos, puede cambiar, siendo:

Siembra en superficie:

$$N = C * D * 10$$

Donde:

N= Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra.

C= Número de colonias.

D= Factor de dilución.

Tener en cuenta, que Número de colonias(*C*) es la media del número de colonias contadas en cada una de las placas de la dilución elegidos. El *Factor dilución* (*D*) es el inverso de la dilución elegida

Siembra en profundidad:

$$N = C * D$$

Donde:

N= Unidades formadoras de colonia por gramo de muestra.

C= Número de colonias.

D= Factor de dilución

Tener en cuenta, que Número de colonias(*C*) es la media del número de colonias contadas en cada una de las placas de la dilución elegidos. El Factor dilución (*D*) es el inverso de la dilución elegida

Reglas para el recuento

Además, a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de recuento se dan cuando se desarrollan entre 30 y 300 colonias por placa o menos si se trata de hongos (cuyas colonias son mayores que las de las bacterias). Cuando esto no se cumple se considera el valor obtenido como una estimación del recuento, y si es posible se repiten las diluciones para conseguir una de ellas que al sembrar en placa produzca un número de colonias de entre 30 a 300 [48].

- 1- Otras referencias aconsejan intervalos ente 20 y 200 como apropiados un recuento en placa.
 - Se el experimento proporciona solo una placa con un numero de colonias entre 20 y 200, calcule las UFC por gramo o ml de la muestra original usando el número de colonias de la placa y no de la media.
 - Se placas de dos diluciones consecutivas proporcionan 20 -200 colonias, calcule de acuerdo con el resultado de las dos diluciones, u se el numero obtenido en las ambas placas no son muy diferentes se hace la media y si el número de ambas es muy diferente considere el UFC más bajo como resultado final.
- 2- Si el recuento proporciona placas con menos de 20 colonias, registre el número real de colonias de las placas que procedan de la dilución más baja.
- 3- Cuando en las placas no presentan colonias, el recuento que se estima es como el más pequeño del límite de detección del procedimiento utilizado. El límite de detección es el número que resultaría de la presencia de una colonia en la placa en que se depositó la más baja dilución de la muestra.
- 4- Se la placas contienen un numero de colonias superior a 200 (o a 300), se hace un recuento estimado, es decir, se cuenta porciones representativas de la placa en la que se depositó la dilución más elevada o se considera como incontables.

Se las placas contienen colonias esparcidas, se cuenta una cadena de colonias que no están muy separadas como se fuese una sola colonia. Si las colonias pueden distinguirse no considere que están esparcidas. Si la zona esparcida es superior a 25% de la placa, anote el resultado como *colonias esparcidas* y no como un recuento cardinal.

Siembra en espiral

El recuento de las colonias crecidas en las placas de sembrado en espiral se realiza teniendo en cuenta un plantilla específica (Figura 5). Se utiliza la misma plantilla para placas de 100-150 mm Ø. La plantilla está dividida en 8 sectoreiguales, cada uno de estos sectores se dividen en 4 arcos marcados (1, 2, 3, 4) de fuera adentro de la plantilla. Un segmento es el área que hay entre 2 líneas del arco contenido en cada sector. Se recomienda contar de fuera hacia dentro de la plantilla, es decir de mayor dilución a menor dilución (de 10⁻³ a 10⁻¹ por ejemplo). Se contarán la colonias en cada una de los arcos de cada sector (3c por ejemplo). Se cuenta hasta 20 colonias, si eso supone pasar a otro de los arcos del sector (3b) contaremos hasta contar todas las colonias que observemos en ese arco.

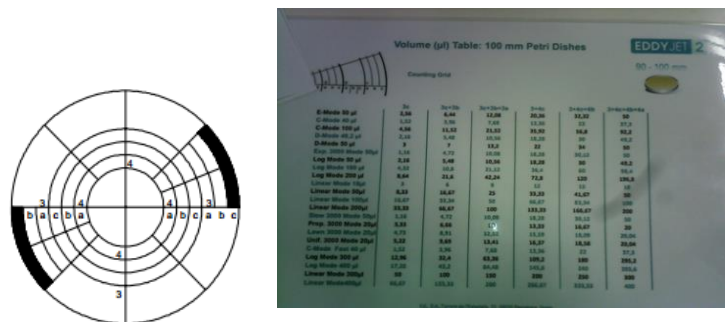


Fig. 7. Metodo y plantilla de recuento para placas de 100 mm Ø

Fórmula para el cálculo del número de colonias.

$$C = \frac{(N' + N'')}{(V_{3c+3b} / 4)}$$

Donde:

N' y N'' - es el número de unidades formadoras de colonias

V - es el volumen

b. En tubos

Todos los tubos considerados positivos (turbidez y/o sedimento) en cada serie se utilizan para el cálculo del NMP. Los resultados de los tubos positivos para cada serie se llevan a la Tabla del NMP para conocer la interpretación de los resultados, en base a una distribución de tipo Poisson y se expresan como: ***NMP de microorganismos por g o ml de alimento***

Cálculo del NMP (Número Más Probable) y expresión de los resultados

Para conocer el resultado debe consultarse la tabla del número más probable adecuada a la serie de tubos que se haya sembrado (de tres o cinco tubos)

Tabla 23. Número Más Probable por g/ml utilizando tres series de tubos

Tubos confirmados en cada dilución			NMP de gérmenes por g o ml
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	40
3	1	0	40
3	1	1	70
3	2	0	90
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	200
3	3	1	500
3	3	2	1100
3	3	3	>2400

3. Protocolos

Antes de realizarse cualquier análisis de microorganismos, se empieza con la limpieza del área de trabajo, ver apartado 2.

3.1. Análisis de microorganismos indicadores

3.1.1. *Aerobios mesofilos*

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30° C en las condiciones establecidas. Refleja la calidad sanitaria de un alimento, las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima. Un recuento bajo de *aerobios mesófilos* no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena [48]. El recuento de mesófilos nos indica las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

Un recuento elevado puede significar [60]:

- 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

1. Objetivo

- Determinar los recuentos de bacterias formadoras de esporas en alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra para recuentos de *aerobios mesofilos*.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías

- Pipetas de 10 y 1ml
- Probetas
- Pinza y/o Bisturí

Medio

- Medio de cultivo PCA

Equipos

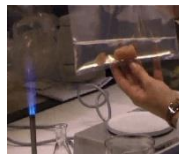
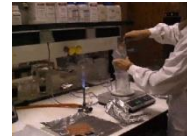
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 30°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona previamente esterilizada.



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas tipo batidora a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*
- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: Recuento en placa por siembra en profundidad

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agitar.*
- Agregar a cada una de las placas unos 20 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 47-50°C.



- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Sellar las placas con parafilm (se es necesario)



7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 30°C durante 48 h.



8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Anote y analice los resultados. (**Ver apartado 2.7 ii**).

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (**Ver apartado 2.6**).

3.1.2. *Enterobacterias*

El recuento total de *enterobacterias* se utiliza como indicador de contaminación fecal, y como uno de los indicadores de Buenas Prácticas de Fabricación. Se utiliza como indicador de la calidad microbiológica de alimentos procesados, y recuentos elevados señalan una elaboración inadecuada o una contaminación posterior, o ambas cosas a la vez; siempre implica un riesgo higiénico-sanitario [61].

1. **Objetivos**

- Determinar los recuentos de enterobacterias en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa para recuentos de enterobacterias.

2. **Material, medios y equipos**

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Agua destilada
- Aguja de siembra
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Agar biliado cristal violeta glucosa (VRBG)

Reactivos

- Clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina
- Ácido ascórbico

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 37°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación del medio

(Ver Apartado de preparación de medio 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher.
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona previamente esterilizada.
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas tipo batidora una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.

**5. Preparación de diluciones decimales**

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*
- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: Recuento en placa por siembra en profundidad por doble capa

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agita*
- Agregar a cada una de las placas unos 10 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 47-50°C.



- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Una vez que el agar de las placas ha solidificado completamente añadir una segunda capa de agar para recuento en placa de unos 15 ml y asegurarse de que queda bien extendida sobre la superficie de la capa anterior (*esta segunda capa de agar no debe homogenizarse, por lo tanto no aplicar movimientos circulares y de vaivén.*)
- Sellar las placas con parafilm (se es necesario)



7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 37°C durante 24 h.



8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Para realizar el contaje, se utiliza un cuenta-colonias; se pone la placa de Petri con la base hacia arriba y, si es preciso, se divide en sectores marcando mediante un lápiz grasoso a lo largo de los diámetros. (**Ver apartado 2.7 ii**)

En agar VRBG, la colonia típicas de enterobacterias son de color rojo-amorado y rodeado de un halo de precipitación del mismo color.

9. Pruebas de confirmación

Confirmación de las colonias (Prueba de la Citocromo-Oxidasa):

Para asegurarnos de que estas colonias son de Enterobacterias es necesario comprobar que son Oxidasa negativas (es decir que dan un resultado negativo en la prueba de la Citocromo-Oxidasa). Esta prueba se hace sobre un número representativo de colonias (el 10% de las colonias de la placa que hemos elegido para contar).

- Se impregna un papel de filtro con el siguiente reactivo:
 - 1 g de Clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina
 - 0,1 g de Ácido ascórbico
 - 100 ml de Agua destilada
- Inmediatamente con una aguja de siembra se toma, usando técnicas de asepsia, una colonia del agar VRBG y se extiende sobre el papel de filtro.
- *Si aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es positiva y Si no aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es negativa.*

10. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (**Ver apartado 2.6.**)

3.1.3. *Psicrotrofos totales*

Los alimentos son alterados por diferentes géneros bacterianos y a su vez, pueden servir como vehículo de patógenos o sus toxinas. Las psicrotrofas crecen en ambientes donde la temperatura fluctúa, producen deterioro en los alimentos refrigerados [62].

1. **Objetivo**

- Determinar los recuentos de *bacterias psicrotrofos totales* en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa para detección de este grupo de microorganismos.

2. **Material, medios y equipos**

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayos con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Bisturí y / o Pinza
- Probetas

Medio

- Medio de cultivo PCA

Equipos

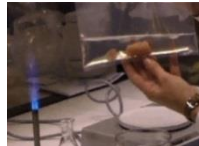
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 37°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación del medio

(Ver apartado de Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona previamente esterilizada



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas tipo batidora a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



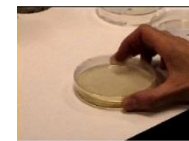
5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*
- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: *Recuento en placa por siembra en profundidad*

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agitar.*
- Agregar a cada una de las placas unos 20 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 47-50°C.
- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa.
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Sellar las placas con parafilm (se es necesario)



7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 4 °C durante 7h.



8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Anote y analice los resultados. (Ver apartado 2.7 ii)

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6.)

3.1.4. *Enterococcus*

La enumeración de *enterococcus* es utilizada para valorar la calidad sanitaria de alimentos, sedimentos y aguas destinadas al consumo humano, la agricultura, la industria y la recreación.

Se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues por su amplia distribución pueden encontrarse en estos productos, especialmente en los de origen animal [66]. En los productos semi conservados, procesados por calor pero no estériles, *Enterococcus*, junto con microorganismos esporulados, son con frecuencia los únicos microorganismos sobrevivientes. Los productos mantenidos en el rango de temperatura entre 10-45 °C pueden contener cifras muy altas de estos microorganismos.

1. Objetivo

- Determinar y comparar los recuentos de mohos y levaduras en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa para el recuento.

2. Material, medios y equipo

Material

- 10 g de muestra de alimento
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Pipetas estériles de 10 y 1 ml.
- Asa de siembra
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medios de cultivo

- Caldo Azida de Rothe (glucosa-fosfato-azida)
- Caldo E.V.A. (Etil-Violeta-Azida)

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Estufa incubadora a 37°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medios

(Ver apartado *Preparación de medios 2.2.2.*)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas tipo batidora a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.

**5. Preparación de diluciones decimales**

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos.



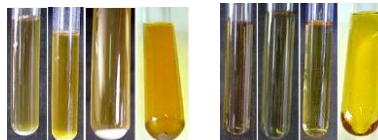
6. Pruebas presuntivas

- Se tienen preparados tres series de tres tubos cada una conteniendo cada tubo unos 10 ml de caldo de cultivo Azida de Rothe.
- Se inoculan 3 series de 3 tubos a partir de las diluciones de la siguiente forma:
 - En cada uno de los tubos de la primera serie, se siembra 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10 (dilución 10^{-1}).
 - En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100 (dilución 10^{-2}).
 - En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1.000 (dilución 10^{-3}).
- Los tubos inoculados se incuban a 37°C durante 48 horas con lectura a las 24 horas



Lectura de Pruebas Presuntivas

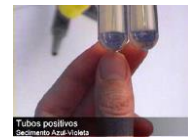
- Se consideran positivos los tubos que presentan turbidez y, normalmente, sedimento blanco en el fondo del tubo. La turbidez indica crecimiento de *enterococcus* y ese tubo es considerado positivo. El mismo significado tiene el sedimento blanco.
- La ausencia de turbidez y sedimento indica que no ha existido crecimiento y la prueba se considera negativa para ese tubo.



7. Prueba Confirmativa

Se utiliza en esta prueba Caldo E.V.A. (Etil-Violeta-Azida) de Listky que contiene violeta de etilo. La presencia de violeta de etilo hace este medio más selectivo que el utilizado en la prueba presuntiva.

- Re sembrar tantos tubos de caldo EVA como tubos positivos hayan aparecido en el medio de Rothe. Para sembrar del tubo positivo de Caldo Rothe al de Caldo Liskty, utilizamos una pipeta paster, de manera que cogemos parte del precipitado blanco y lo inoculamos en el tubo de Liskty estéril.
- Incubar a 37°C durante 48 horas
- Tubos positivos. *Los enterococcus tienden a crecer en el fondo del tubo formando un sedimento de color azul-violeta.*

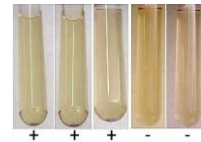


Lectura de Prueba Confirmativa

- Tubos positivos. *El sedimento azul-violeta indica crecimiento de enterococcus.*

8. Recuento

Todos los tubos confirmados como positivos (sediemto azul-violeta) de *enterococcus* en cada serie se utilizan para el cálculo del NMP. (Ver apartado 2.7 ii)



9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.1.5. *Clostridium sulfito reductor*

Clostridium sulfito reductor son bacterias pertenecientes al género *Clostridium*, que tienen la capacidad de reducir el sulfito a sulfuro y de producir esporas. Son deteriorantes, ya que producen malos olores y, con mucha frecuencia, ennegrecimiento del producto cuando éste tiene hierro, formando un precipitado oscuro de sulfuro de hierro [73]. El origen de los anaerobios sulfito-reductores no es exclusivamente fecal, ya que pueden proceder de otras fuentes ambientales como suelo, sedimentos marinos, vegetación en descomposición, heridas infectadas de hombre y animales, aguas superficiales, como también en los alimentos, especialmente cuando las condiciones de higiene en la elaboración son deficientes.

1. Objetivo

- Determinar los recuentos de bacterias formadoras de sulfitos en alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra para recuentos de sulfitos reductores.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Probetas
- Pinza y/o Bisturí

Medio

- Medio de cultivo Iron Agar (IA)

Equipos

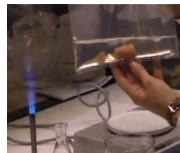
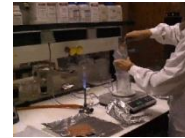
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 30°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona previamente esterilizada.



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*

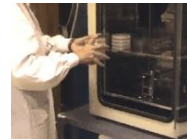


- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: *Recuento en placa por siembra en superficie*

- A partir de la serie de diluciones decimales, sembrar en las placas (duplicado) de Iron Agar por cada dilución, depositando 0,1ml en cada placa
- Extender cuidadosamente el inóculo con asa de Drigalsky y esperar a que se seque
- Sellar las placas con parafilm (se es necesario)



7. Incubación

Invertir las placas de Petri e incubar a 30°C durante 48 h.

8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Anote y analice los resultados. **Ver apartado 2.7 ii.**

9. Esterilización de residuo

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **Ver apartado 2.6.**

3.1.6. *Coliformes totales*

Los coliformes no son muy buenos como indicadores, pero se utilizan como indicadores de contaminación fecal y son buenos indicadores de un proceso o de un estado sanitario poco satisfactorio [47]. Hay que destacar que el recuento de coliformes tiene sus limitaciones como indicador en ciertos alimentos [48]:

- Productos lácteos: reflejan el estado higiénico del establo y de la planta industrial, no es indicador de contaminación fecal
- Hortalizas congeladas blanqueadas: la presencia de *E. coli* puede ser indicativo de que en el proceso existe algún problema. Los coliformes están habitualmente asociados con la vegetación
- Derivados de aves de corral: los coliformes no son indicadores higiénicos apropiados, las aves pueden tener salmonella antes del sacrificio.

A pesar de todo lo anterior, los coliformes tienen un valor acreditado como indicadores de inocuidad. Su principal aplicación como integrantes de un programa para la determinación de la inocuidad de los alimentos la tienen dentro del sistema APPCC.

A continuación paso a describir las técnicas usadas para determinación de *coliformes totales*.

i. Número más probable (NMP)

1. Objetivo

- Determinar el recuento de *coliformes totales* en alimentos.
- Familiarizarse con la técnica del número más probable

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Pipetas de 10 y 1ml
- Gradillas

- Aguja de siembra
- Campana de Durham
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Agar CLS (Caldo Lauril Sulfato)
- Caldo lactosado biliado verde brillante (Brilliant Green Bile Lactose: BGBL)

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 35°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación del medio

(Ver apartado de preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona

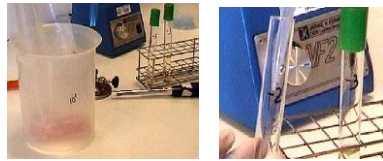


- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Prueba Presuntiva

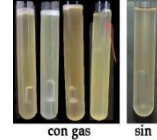
- En un medio aséptico (campana microbiológica o cerco de un machero de Bunse), se preparan en una gradilla tres series de tres tubos cada una. Cada tubo contendrá 10 ml de caldo CLS.
- Sembrar tubos de caldo a partir de las diluciones decimales (-3, -2, -1):
 - En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10
 - En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100
 - En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1.000
- Los tubos de CLS llevan campana de Durham para observar la producción de gas.
- Incubar las tres series a 37 °C, haciendo lecturas a las 48 horas.



Lectura de Prueba Presuntiva

La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham

- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono
- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura de 37 °C.

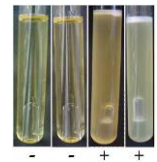


Seleccionar los tubos positivos (turbidez + gas) y desechar los demás.

7. Prueba Confirmativa

Se trata de confirmar que los tubos seleccionados en la prueba presuntiva (que utilizan la lactosa y producen gas sin inhibidores), también utilizan la lactosa y producen gas a 37 °C en presencia de sales biliares y verde brillante. Para ello se utiliza el medio Caldo Biliado al Verde Brillante (BGBL) que es caldo con lactosa y sales biliares.

- Se utilizan únicamente los tubos positivos (turbidez y gas) en CLS y seleccionados en la prueba presuntiva
- En condiciones estériles y con asa se toma la muestra del correspondiente tubo de CLS positivo
- Con dicha asa se siembra inmediatamente un tubo de Caldo Biliado al Verde Brillante. *Lo mismo se realiza con todos los tubos positivos en la presuntiva.*
- Incubar todos los tubos inoculados a 37 °C durante 18-24 h.

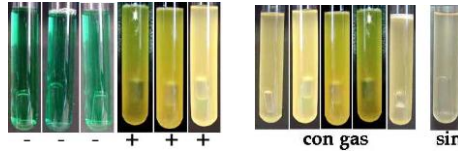


Lectura de la Prueba Confirmativa

La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham en el medio BGBL con sales biliares.

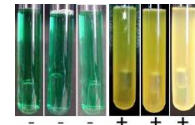
- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono en esas condiciones

- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas en presencia de sales biliares y verde brillante. La fermentación de la lactosa provoca acidez y como consecuencia cambio de color del verde brillante a amarillo.



8. Recuentos

Anotar el número de tubos confirmados como positivos (turbidez + gas) de organismos coliformes en cada dilución. Hacer cálculos de número más probable. (Ver apartado 2.7 ii)



9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

ii. *Coliformes totales*: siembra en profundidad

Los coliformes totales, además de la técnica de número más probable (NMP), se puede determinar a partir del método de rutina para la enumeración mediante el recuento de colonias a 30° C [62].

1. Objetivos

- Determinar los recuentos de coliformes totales en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa para recuentos de *coliformes totales*.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Agua destilada
- Aguja de siembra
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Agar biliado cristal violeta lactosa

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 37°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación del medio

(Ver Apartado de preparación de medio 2.2.2)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher.
- Se diluyen en 90 ml de agua peptonada
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.

5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*
- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos

6. Preparación y siembra de placas: *Recuento en placa por siembra en profundidad por doble capa*

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agitar.*
- Agregar a cada una de las placas unos 10 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 47-50°C.
- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Una vez que el agar de las placas ha solidificado completamente añadir una segunda capa de agar para recuento en placa de unos 15 ml y asegurarse de que queda bien extendida sobre la superficie de la capa anterior (*esta segunda capa de agar no debe homogenizarse, por lo tanto no aplicar movimientos circulares y de vaivén*).
- Sellar las placas con parafilm (se es necesario).

7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 30 °C durante 24 h.

8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Para realizar el contaje, se utiliza un cuenta-colonias; se pone la placa de Petri con la base hacia arriba y, si es preciso, se divide en sectores marcando mediante un lápiz graso a lo largo de los diámetros. **(Ver apartado 2.7. ii)**

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.1.7. *Coliformes fecales*

Dentro del grupo de los coliformes totales existe un subgrupo que son los *Coliformes fecales*. Su origen es principalmente fecal y por esos se consideran índices de contaminación fecal. Se encuentran en el intestino del hombre y de los animales, pero también en otros ambientes: suelo, plantas, cáscara de huevo, etc [48].

1. **Objetivo**

- Determinar el recuento de coliformes fecales en alimentos.
- Familiarizarse con la técnica del número más probable.

2. **Material, medios y equipos**

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Pipetas de 10 y 1ml
- Agua destilada
- Gradillas
- Aguja de siembra
- Campana de Durham
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Agar CLS (Caldo Lauril Sulfato)
- Caldo E.C

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 35°C

- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*

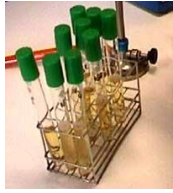
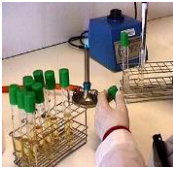




- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Recuento por número más probable (NMP)

6.1. Prueba Presuntiva

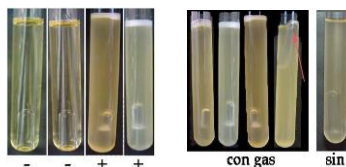
- En un medio aséptico (campana microbiológica o cerco de un machero de Bunse), se preparan en una gradilla tres series de tres tubos cada una. Cada tubo contendrá 10 ml de caldo CLS. 
- Sembrar tubos de caldo a partir de las diluciones decimales (-3, -2, -1):
 - En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10
 - En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100 
 - En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1.000
- Los tubos de CLS llevan campana de Durham para observar la producción de gas 
- Incubar las tres series a 37 °C, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas 

Lectura de Prueba Presuntiva

La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham

- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono
- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura de 37 °C.

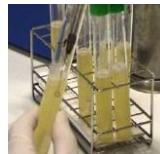
Seleccionar los tubos positivos (turbidez + gas) y desechar los demás.



6.2. Prueba Confirmativa

Se trata de confirmar que los tubos seleccionados en la prueba presuntiva (que utilizan la lactosa y producen gas a 37°C), también utilizan la lactosa y producen gas a 44 °C en presencia de sales biliares. Para ello se utiliza el medio Caldo E.C. que es caldo con lactosa y sales biliares. La incubación se realiza a 44 °C. En estas condiciones se inhibe el desarrollo de la flora acompañante de los coliformes y permite el crecimiento de *Escherichia coli*.

- Se utilizan únicamente los tubos positivos (turbidez y gas) en CLS y seleccionados en la prueba presuntiva
- En condiciones estériles y con asa se toma la muestra del correspondiente tubo de CLS positivo



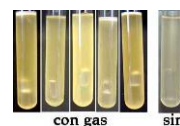
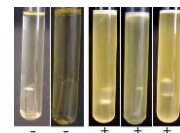
- Con dicha asa se siembra inmediatamente un tubo de Caldo E. C. *Lo mismo se realiza con todos los tubos positivos en la presuntiva.*
- Incubar todos los tubos inoculados a 44 °C durante 18-24 h



Lectura de la Prueba Confirmativa

La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham en el medio Caldo E.C. con sales biliares a una temperatura de 44 °C

- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono en esas condiciones (sales biliares y 44 °C)
- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura y en presencia de sales biliares.



7. Recuentos

Anotar el número de tubos confirmados como positivos (turbidez + gas) de organismos coliformes en cada dilución. Hacer cálculos de número más probable. (**Ver apartado 2.7. ii**)

8. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (**Ver apartado 2.6**)

3.1.8. *Escherichia coli*

Escherichia coli es un coliforme fecal. Es muy resistente en suelo y agua. Vive en el tracto intestinal del hombre y animales, por eso su presencia en un alimento indica contaminación directa o indirecta de origen fecal [48]. Es indicador de posibles patógenos entéricos en el agua, moluscos, productos lácteos, etc.

A continuación paso a describir las técnicas usadas para determinación de *Escherichia coli*

i. Número más probable (NMP)

1. Objetivo

- Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en muestra de alimento, por investigación de *coliformes fecales*, comprobación bioquímica y recuento.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Gradillas
- Aguja de siembra
- Campana de Durham
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Medio de cultivo TBX (**Agar Triptona, bilis, X-glucurónido**)
- Caldo E.C.
- Agar Levine o Agar EMB
- Agua de triptona (Tryptone Water: TW)

- Reactivo de Kovacs

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 44°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Prueba Presuntiva

- En un medio aséptico (campana microbiológica o cerco de un machero de Bunse), se preparan en una gradilla tres series de tres tubos cada una. Cada tubo contendrá 10 ml de caldo CLS.
- Sembrar tubos de caldo a partir de las diluciones decimales (-3, -2, -1):
 - En cada uno de los tubos de la primera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1: 10
 - En cada uno de los tubos de la segunda serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:100
 - En cada uno de los tubos de la tercera serie, se vierte 1 ml de la dilución de la muestra al 1:1.000
- Los tubos de CLS llevan campana de Durham para observar la producción de gas.
- Incubar las tres series a 37 °C, haciendo lecturas a las 24 y 48 horas



Lectura de Prueba Presuntiva

La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham

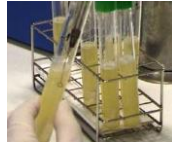
- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono
- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura de 37 °C.

Seleccionar los tubos positivos (turbidez + gas) y desechar los demás.

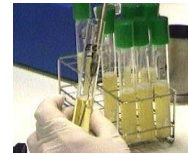
7. Prueba Confirmativa

Se trata de confirmar que los tubos seleccionados en la prueba presuntiva (que utilizan la lactosa y producen gas a 37°C), también utilizan la lactosa y producen gas a 44 °C en presencia de sales biliares. Para ello se utiliza el medio Caldo E.C. que es caldo con lactosa y sales biliares. La incubación se realiza a 44 °C. En estas condiciones se inhibe el desarrollo de la flora acompañante de los coliformes y permite el crecimiento de *Escherichia coli*.

- Se utilizan únicamente los tubos positivos (turbidez y gas) en CLS y seleccionados en la prueba presuntiva
- En condiciones estériles y con asa se toma la muestra del correspondiente tubo de CLS positivo.



- Con dicha asa se siembra inmediatamente un tubo de Caldo E. C. *Lo mismo se realiza con todos los tubos positivos en la presuntiva.*
- Incubar todos los tubos inoculados a 44 °C durante 18-24 h



Lectura de la Prueba Confirmativa

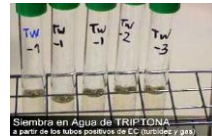
La reacción es positiva cuando se produce crecimiento (turbidez en el tubo) y desprendimiento de gas en la campana Durham en el medio Caldo E.C. con sales biliares a una temperatura de 44 °C

- La turbidez indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono en esas condiciones (sales biliares y 44 °C)
- El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura y en presencia de sales biliares.

Todos los tubos confirmados como positivos (turbidez + gas) de organismos coliformes fecales en cada dilución se utilizan para el aislamiento en agar Levine y comprobación bioquímica de la producción de indol.

8. Aislamiento sobre agar Levine, comprobación bioquímica de la producción de indol y cálculo del NMP

Para la investigación y recuento de *E. coli* se parte de los tubos confirmados como positivos (crecimiento y formación de gas en caldo E.C. a 44,5°C) para coliformes fecales en el medio E.C. , de acuerdo con los siguientes pasos:



- Siembra en agua triptona (TW) a partir de los tubos positivos de EC. Estos tubos se incuban en estufa o en baño maria a 44 °C durante 24 horas para posteriormente hacer re-siembra en agar Levine y realizar en ellos la confirmación bioquímica de producción de indol.
- Siembra en agar Levine (EMB) para aislamiento de las colonias y observar la morfología y coloración típica de Escherichia coli. A partir de los tubos de agua triptona (TW) o de los que han dado positivo a la prueba de coliformes fecales se hacen siembras sobre agar Levine, con el fin de obtener colonias aisladas fácilmente identificables.
- Incubar a 44 °C con las placas invertidas durante 24 horas.

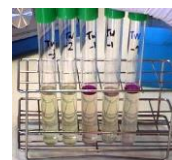


Observar el brillo metálico de las colonias de Escherichia coli en agar Levine o agar EMB. Las colonias de E. coli sobre agar Levine son planas o ligeramente cóncavas, con centros azul oscuros, casi negros. Con luz reflejada, se observa un brillo metálico verdoso; a veces, este brillo metálico no se manifiesta.

- Realizar la prueba de indol en los tubos de agua triptona (TW). Para investigar la producción de indol se utilizan los tubos de agua triptona sembrados el día anterior o se siembran 1-2 colonias de cada placa en tubos con TW para incubar a 44 °C durante 24 horas. La prueba de indol se realiza añadiendo 0,5 ml del reactivo de Kovacs a cada tubo.



La reacción positiva se manifiesta por la formación de un anillo rojo bermellón en la superficie del medio. La reacción negativa muestra anillo amarillento.



9. Recuento

Con aquellos casos en que se comprueba la presencia de *Escherichia coli* por la producción de indol y el crecimiento característico sobre agar Levine, se hace la lectura en la tabla del NMP para obtener el número de *E. coli* por gramo o mililitro de muestra. Ver tabla de NMP. (Ver apartado 2.7. ii)

8. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

ii. *Escherichia coli*: siembra en profundidad

Escherichia coli, además de la técnica de número más probable (NMP), se puede determinar a partir del método de rutina para la enumeración mediante el recuento en siembra en profundidad.

1. Objetivo

- Determinación de *Escherichia coli* en muestra de alimento, por siembra en profundidad.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medio

- Agar Triptona, bilis, X-glucurónido (TBX)

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 35°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua peptonada
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos

5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*
- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos

6. Preparación y siembra de placas : *Recuento en placa por siembra en profundidad*

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agitar.*
- Agregar a cada una de las placas unos 15 ml de Agar Triptona, bilis, X-glucuronido (TBX) fundido mantenido a 47-50°C. No deberá transcurrir un tiempo mayor de 15 minutos entre la dilución de la muestra y la adición de agar a las placas.
- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Una vez que el agar de las placas ha solidificado completamente añadir una segunda capa de agar para recuento en placa de unos 10 ml y asegurarse de que queda bien extendida sobre la superficie de la capa anterior (*esta segunda capa de agar no debe homogenizarse, por lo tanto no aplicar movimientos circulares y de vaivén*)

7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 44°C durante 24 h.

8. Recuento

Las colonias características de *Escherichia coli* en agar TBX son de color azul-verdoso, ya que poseen dicha enzima (b-D-glucuronidasa positivas). Así, se puede diferenciar a *E. coli* del resto de coliformes que no poseen esta coloración. Para realizar el recuento, se escogen las placas que presenten entre 30 y 300 colonias características, (**Ver apartado 2.7. ii**)

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.1.9. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es un microorganismo de distribución en el medio ambiente muy amplia, se encuentra de forma natural en el hombre, los animales de granja, el polvo y diversos alimentos y otros productos en los que la contaminación se debe principalmente a los manipuladores [48]. El principal problema a nivel de la microbiología de los alimentos es que *S. aureus* puede producir una enterotoxina termoestable, y otras toxinas. *Staphylococcus auerus* se multiplica en alimentos proteicos, soporta concentraciones normales de azúcar e incluso elevadas de sal y el tratamiento con nitritos. En resumen, la presencia de un número elevado de *Staphylococcus aureus* en un alimento refleja higiene defectuosa por mala manipulación. Si, además, el *S. aureus* aislado son cepas enterotoxigénicas, suponen un riesgo para la salud.

1. Objetivo

- Detección de *Staphylococcus aureus* en un alimento
- Practicar la técnica de aislamiento utilizando medios selectivos y diferenciales.

2. Material, medios y equipos

Material

- Pipetas de 1ml estériles
- Asa de vidrio estéril
- Asa de cultivo
- Placas de Petri
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medios de cultivo y reactivos

- Medio sólido selectivo Baird Parker (B P)
- Caldo cerebro corazón (Brain Heart Infusión: BHI)
- Plasma de conejo con ácido Etilen diamino tetraacético (EDTA)

Plasma de conejo, desecado y titulado, que evita reacciones falsas en la prueba de la coagulasa. Este producto se adquiere en casas comerciales.

Equipos

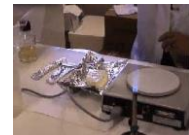
- Balanza
- Estufa de cultivo
- Baño de agua a 50 °C
- Stomacher

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua peptonada



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: *Recuento en placa por siembra en superficie*

- A partir de la serie de diluciones decimales, y por duplicado, se siembra 0,1 ml de cada dilución sobre la superficie bien seca de agar Baird-Parker contenido en placas de Petri.
- Diseminar con asa de vidrio estéril (asa de Drigalsky).



7. Incubación

Invertir las placas de Petri e incubarlas en estufa a 37 °C durante 48 horas, con lectura a las 24 horas.



8. Recuento de colonias sospechosas

Seleccionar para el recuento aquellas placas que contengan entre 20 y 200 colonias típicas. Una vez contadas estas colonias en las placas elegidas se deben hacer pruebas confirmativas, en particular la prueba de la coagulasa. Si las colonias contadas son coagulasa positivas entonces expresaremos el recuento como ufc/g de *S.aureus* coagulasa positivo.

Para ello la cifra obtenida en las placas se multiplica por el factor de dilución de la placa, lo que da como resultado el recuento total de *S. aureus* coagulasa positivo en 0,1 gramo del producto analizado. Esta cifra, multiplicada por 10, expresa el recuento total de *S. aureus* por gramo o mililitro de muestra

9. Confirmación con la prueba de la coagulasa

- Se seleccionan, como mínimo, dos colonias típicas para su confirmación. Con este fin, se investiga la capacidad de la cepa en estudio para producir coagulasa.
- Siembra en BHI para realizar la prueba de la coagulasa



Las colonias típicas seleccionadas se siembran en caldo infusión cerebro-corazón (B.H.I. Brain Heart Infusion) contenido en tubos.

- Incubar a 37 °C durante 18-24 horas
- Añadir 0,1 ml del cultivo sobre Plasma de Conejo

En un tubo se vierten 0,3 ml de plasma de conejo EDTA reconstituido. Se añade 0,1 ml del cultivo obtenido en caldo BHI.

- Incubar a 37°C y examinar a las 6 horas de incubación
- Coagulosa positiva - La reacción es positiva cuando el coágulo formado es firme.
- Coagulosa negativa - La reacción es negativa cuando no se coagula el plasma.

10. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.7. ii)

Además de la determinación por medios selectivos y de confirmación, se puede determinar Staphylococcus aureus por siembra en superficie, incubando las placas a 25 °C durante 5 días, no siendo necesario la confirmación posterior.

3.2. Análisis de microorganismos patógenos

3.2.1. *Salmonella*

Todos los microorganismos del género *Salmonella* son potencialmente patógenos para el hombre, pudiendo afectar a diversos animales. La salmonela normalmente se encuentra en productos alimenticios crudos provenientes de animales, como huevos, productos elaborados a partir del huevo, la carne, productos cárnicos, leche no pasteurizada, o productos lácteos a partir de leche no pasteurizada [48].

1. Objetivo

- Aislamiento e identificación de *Salmonella* por métodos convencionales en muestra de alimentos.
- Aplicar métodos de detección rápidos, alternativos, mediante técnicas serológicas.

2. Material, medios y equipos

Material

- 25 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer.
- Pipetas estériles de 10 ml y 1 ml
- Gradillas y Tubos de ensayo
- Asa de cultivo
- Placas de Petri
- Pinza y / o Bisturí
- Probetas

Medios de cultivo y reactivos

- Agua de peptona tamponada (BPW)
- Caldo Müller-Kauffmann (Tetracionato)
- Caldo Selenito Cistina
- Agar Verde Brillante Rojo Fenol (Brilliant Green Agar: BGA)
- Agar Bismuto Sulfito (BS)
- Agar lisina hierro (Lysine Iron Agar: LIA)

- Agar TSI ó Kligler
- Agar Citrato de Simmons

Equipos

- Balanza
- Estufa Incubadora
- Stomacher
- Baño de agua a 50°C

3. Preparación de medios

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Fases del aislamiento e identificación:

i. Pre enriquecimiento en medio líquido no selectivo

Esta etapa de pre enriquecimiento no selectivo sirve para que si en el alimento existen Salmonelas, éstas se multipliquen y se puedan aislar posteriormente, también tiene por objeto reparar las células que pudieran haber sufrido lesiones subletales. Este último objetivo se logra siempre sembrando en medios de cultivo líquidos no selectivos (como es el caso del agua de peptona tamponada a temperaturas óptimas para el microorganismo que se quiere reparar, en este caso *Salmonella*).

- Asépticamente se pesan 25 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 225 ml de agua de peptona tamponada (BPW)
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento).
- Incubar a 37°C durante 18 a 20 horas



ii. Enriquecimiento en medios líquidos selectivos

En esta fase se pretende restringir el crecimiento de la flora competitiva. Para ello se utilizan medios que contienen agentes selectivos. Sin embargo no existe ningún medio de cultivo que sea totalmente selectivo para *Salmonella* de modo que lo que conseguimos en realidad es evitar el crecimiento de "parte" de la flora competitiva.

- Agitar el cultivo de preenriquecimiento y sembrar, con pipeta estéril, en los siguientes medios líquidos selectivos:
 - 1 ml de cultivo sobre 10 ml de caldo Müller Kauffmann (MK). Incubar a 43 °C durante 18-24 horas
 - 1 ml de cultivo sobre 10 ml de caldo Selenito-Cistina (SC). Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.

**iii. Aislamiento diferencial sobre medios sólidos selectivos**

En esta etapa se utilizan medios de cultivo diferenciales que por su composición permiten que las colonias de *Salmonella* crezcan con un aspecto característico en cada uno de ellos (colonias típicas)

A partir de los cultivos obtenidos en los distintos medios líquidos selectivos, sembrar, por duplicado sobre:

- Agar Verde brillante-Rojo fenol (BGA)
- Agar Bismuto Sulfito (BS)



Marcar las placas con agar BS y BGA, divide cada placa en dos mitades una para siembra del enriquecimiento en MK y otra parte la del enriquecimiento en SC. Siembre por agotamiento en estrías en dos fases de la muestra enriquecida en MK y SC.

- Incubar en estufa a 37 °C todas las placas sembradas, durante 24-48 horas.
 - BGA 24 horas
 - BS 48 horas

iv. Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas

Esta comprobación se suele realizar en 2 subfases:

- 1- **Subfase 4A:** Comprobación bioquímica inicial con unas pruebas determinadas: Generalmente, fermentación de glucosa y lactosa (Kliger o TSI), descarboxilación de la lisina (LIA), utilización del citrato.
- 2- **Subfase 4B:** Comprobación bioquímica final con un sistema multipuebas: Generalmente con las 20 pruebas del API20E. Esta subfase sólo se realiza con las cepas seleccionadas en la subfase anterior.

Subfase 4A

Aislar, como mínimo, dos colonias con aspecto típico de *Salmonella* de cada uno de los medios de aislamiento selectivo utilizados.

- Sembrar cada colonia en agar hierro triple azúcar (TSI), con asa de cultivo, primero en el fondo por picadura y luego, en la superficie inclinada, por diseminación.
- Sembrar, por picadura en el fondo y por diseminación en la superficie inclinada del medio agar lisina hierro (LIA)
- Incubar los tubos de TSI a 37 °C durante 24 horas y los de agar LIA a 37 °C durante 24-48 horas.



Las *Salmonella* dan la siguiente reacción sobre TSI:

- ✚ Alcalina (rojo) en la superficie inclinada.
- ✚ Ácida (amarillo) en el fondo.
- ✚ Con producción de SH₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo).

Las *Salmonella* dan la siguiente reacción sobre LIA:

- ✚ Alcalina (morado) en el fondo del tubo.
- ✚ Producción de SH₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo).

Las Salmonella presentes en alimentos, son capaces de utilizar el citrato como única fuente de carbono alcalinizando el medio. El medio citrato de Simmons contienen citrato como única fuente de carbono y contiene un indicador de pH que vira del color verde a azul al alcalinizarse el medio

5. Recuento

Seleccionar todos los cultivos que muestren crecimiento característico de *Salmonella* sobre agar TSI, se correspondan o no con la reacción de dichos cultivos en agar LIA.

No desechar los cultivos atípicos sobre agar TSI cuando la reacción sobre agar LIA es típica. Desechar los cultivos que no se correspondan con el crecimiento típico de las *Salmonella* sobre agar TSI ni con el de agar LIA. Desechar todos los cultivos que den citrato negativo.

Subfase 4B

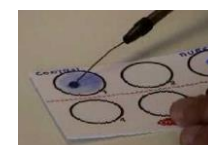
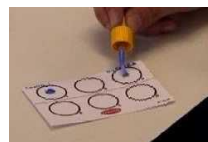
Con las colonias seleccionadas en la comprobación bioquímica inicial se efectúa lo siguiente:

- Sembrar las colonias sospechosas sobre agar nutritivo contenido en placas de Petri. Incubar a 37 °C durante 18-24 horas. Comprobar la pureza del cultivo, que servirá para efectuar las pruebas confirmativas bioquímicas y serológicas.
- Sembrar una galería de identificación bioquímica partiendo de los cultivos seleccionados:
 - Habitualmente se hace una galería API 20E que consiste en 20 pruebas bioquímicas y que permite identificar el microorganismo al menos a nivel de Género y en muchos casos también a nivel de Especie.



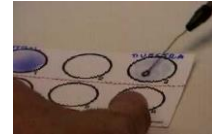
i. Confirmación serológica de las colonias sospechosas

- Dejar caer una gota del reactivo Control (sin anticuerpos) sobre una de las áreas de reacción de la tarjeta para la reacción. También se puede realizar sobre un portaobjetos bien limpio señalando las áreas.
- Dejar caer una gota del reactivo con anticuerpos sobre otra de las áreas de reacción.
- Introducir verticalmente un asa estéril en el tubo con la cepa seleccionada recoger una porción de cultivo y mezclar con la gota del reactivo control (sin anticuerpos). Continuar



mezclando con el asa durante 10-15 segundos extendiendo bien la mezcla por la superficie del área de reacción.

- Flamear y enfriar el asa (ó utilizar una nueva) y retirar una segunda porción de cultivo problema. Mezclarlo con la gota de reactivo con anticuerpos. Continuar mezclando con el asa durante 10-15 segundos extendiendo bien por la superficie del área de reacción.
- Rotar suavemente la tarjeta con movimiento circular durante 2 minutos y observar la aglutinación (*no rotar la tarjeta más de 2 minutos*).



6. Lectura e Interpretación de Resultados

- Resultado positivo: Se considera resultado positivo si se da aglutinación de las partículas en un máximo de 2 minutos. *Esto indica la presencia de Salmonella.*
- Resultado negativo: Se considera resultado negativo si no se da aglutinación y permanece una suspensión azul ligera en las áreas de reacción en un máximo de 2 minutos. Esto indica que el aislamiento no es Salmonella. *Las reacciones que acontezcan tras 2 minutos deben ignorarse.*

Si la serología ha resultado positiva para alguna de las cepas, se expresan los resultados como: Presencia de Salmonella en 25 g. En caso contrario, expresan los resultados como: Ausencia de Salmonella en 25 g de alimento

7. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.2.2. *Shigella*

Shigella es un género de bacterias patógenas que produce en el ser humano la enfermedad conocida como shigelosis por consumo de alimentos contaminados. Los alimentos más afectados a la contaminación por *Shigella* son las frutas y vegetales consumidos crudos en ensaladas, sándwiches [64, 67]. También la bacteria *Shigella* puede encontrarse en agua de consumo contaminada y en alimentos envasados al vacío y en atmósfera modificadas. En menor medida, alimentos como leche cruda y sus derivados (quesos) y pollo se han visto implicados en casos de shigelosis.

1. Objetivo

- Aislamiento, identificación y detección de *Shigella*, por métodos convencionales en muestras de alimentos.

2. Material, medios y equipos

Material

- 25 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer.
- Pipetas estériles de 10 ml y 1 ml.
- Gradillas y Tubos de ensayo
- Asa de cultivo
- Placas de Petri

Medios de cultivo

- Caldo para gram negativos (GN)
- Caldo EE de Mossel.
- Caldo *Shigella*.
- Agar Salmonella-Shigella (S-S)
- Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Xylose Lysine Desoxycholate: XLD)
- Agar MacConkey
- Agar lisina hierro (Lysine Iron Agar: LIA)
- Agar TSI ó Kligler
- Caldo Urea

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Estufa Incubadora
- Baño de agua a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Fases del aislamiento e identificación:

i. Preparación de la muestra y enriquecimiento en medios líquidos selectivos.

Esta fase, se limita la proliferación de la flora competitiva y se estimula el crecimiento de *Shigella*.

- Asépticamente se pesan 25 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Mezclar con 225 ml de cada uno de los siguientes caldos de cultivo:
 - - Caldo para gram negativos (GN)
 - - Caldo EE de Mossel.
 - - Caldo Shigella
- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento).
- Incubar a 37°C durante 16-18 horas



ii. Aislamiento diferencial sobre medios solidos selectivos

En esta etapa se utilizan medios de cultivo diferenciales que por su composición permiten que las colonias de *Shigella* crezcan con un aspecto característico en cada uno de ellos (colonias típicas). A partir del cultivo obtenido en el enriquecimiento de cada uno de los medios líquidos selectivos, sembrar en estría, por duplicado, con asa de cultivo sobre:

- Agar *Salmonella-Shigella* (S-S)
- Agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (Xylose Lysine Desoxycholate: XLD)
- Agar MacConkey
- Incubar todas las placas de agares selectivos a 37°C durante 16-18 horas.



iii. Confirmación bioquímica de las colonias sospechosas

Esta comprobación se suele realizar en 2 subfases:

- 3- Subfase 4A: Identificación bioquímica inicial con unas pruebas determinadas: Generalmente, fermentación de glucosa y lactosa (TSI), descarboxilación de la lisina (LIA) y utilización de la urea.
- 4- Subfase 4B: Identificación bioquímica final con un sistema multipuebas: Generalmente con las 20 pruebas de la galería API20E. Esta subfase sólo se realiza con las cepas seleccionadas en la subfase anterior.

Subfase 4A

Aislar, como mínimo, dos colonias con aspecto típico de *Shigella* de cada uno de los medios de aislamiento selectivo utilizados.

- Sembrar cada colonia en Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), con aguja de cultivo, primero en el fondo por picadura y luego, en la superficie inclinada por estría.
- Sembrar, por picadura en el fondo y por estría en la superficie inclinada del medio Agar Lisina Hierro (LIA).
- Sembrar, con asa de siembra en Caldo Urea.
- Incubar los tubos de TSI y Urea a 37 °C durante 24 horas y los de agar LIA a 37 °C durante 24-48 horas.



Shigella da la siguiente reacción sobre **TSI**:

- Alcalina (rojo) en la superficie inclinada
- Ácida (amarillo) en el fondo.
- Sin producción de SH₂ (sin ennegrecimiento del fondo del tubo).

Shigella da la siguiente reacción sobre **LIA**:

- Alcalina (color púrpura) en la superficie inclinada.
- Ácida (amarillo) en el fondo.
- Sin Producción de SH₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo).

Las *Shigella* no son capaces de utilizar urea.

- El medio **urea** contiene un indicador de pH que vira a color rosa fuerte cuando la reacción es positiva.
- La reacción debe ser negativa: urea (-). Permanece el mismo color que antes de la incubación

iv. Recuento

Seleccionar todos los cultivos que muestren crecimiento característico de *Shigella* sobre agar TSI, se correspondan o no con la reacción de dichos cultivos en agar LIA. No desechar los cultivos atípicos sobre agar TSI cuando la reacción sobre agar LIA es típica. Desechar los cultivos que no se correspondan con el crecimiento típico de las *Shigella* sobre agar TSI ni con el de agar LIA. Desechar todos los cultivos que den urea positiva.

Subfase 4B

Con cada una de las colonias seleccionadas en la identificación bioquímica inicial se efectúa lo siguiente:

- A partir del tubo de TSI o LIA, sembrar una galería de identificación bioquímica
- Habitualmente se hace una galería API 20E que consiste en 20 pruebas bioquímicas y que permite identificar el microorganismo al menos a nivel de Género y en muchos casos también a nivel de Especie.



5. Lectura e Interpretación de Resultados

Si la confirmación bioquímica ha resultado positiva para alguna de las cepas:

- Expresar los resultados como Presencia de *Shigella* en 25 gramos de alimento
- En caso contrario, expresar los resultados como: Ausencia de *Shigella* en 25 gramos de alimento

6. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.2.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno humano que se transmite a través de los alimentos y que causa infecciones graves, con una alta tasa de mortalidad. *L.monocytogenes* ha sido aislada de una gran variedad de fuentes, como agua dulce, agua salada, alimentos crudos de origen animal, incluidos aves frescas y congeladas, carnes rojas y productos cárnicos; pescado, productos lácteos crudos como leche, quesos y helados; frutas y vegetales crudos; y a partir de heces de seres humanos sanos y sintomáticos como también de otros animales [48].

1. Objetivo

- Aislamiento, identificación y recuento de *Listeria monocytogenes*, por métodos convencionales en muestras de alimentos.
- Familiarizarse en la técnica de identificación además de las técnicas de cultivo y los métodos bioquímicos habituales.

2. Material, medios y equipos

Material

- 25 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer.
- Pipetas estériles de 10 ml y 1 ml
- Gradillas y Tubos de ensayo
- Asa de cultivo
- Bisturí y / o Pinza
- Placas de Petri
- Probetas

Medios de cultivo

- Caldo Fraser
- Agar PCA
- Solución salina
- Placas Oxford modificado (MOX) / Agar ALOA
- *Listeria* monoconfirm test

Equipos

- Balanza
- Estufa Incubadora
- Stomacher
- Baño de agua a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado *Preparación de medios 2.2.2*)

4. Fases del aislamiento e identificación:**i. Preparación de la muestra y enriquecimiento en medios líquidos selectivos.**

Esta fase, se limita la proliferación de la flora competitiva y se estimula el crecimiento de *Shigella*.

- En condiciones asépticas, se pesan 25 gramos del alimento que queremos analizar en una bolsa de Stomacher.
- Se añaden 225 ml de Caldo Fraser a concentración 1/2.



- Se homogeniza la mezcla en el Stomacher durante 1 a 4 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) (defectivamente realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos).
- Incubar a 30°C, durante 24 horas.

**ii. Aislamiento diferencial sobre medios solidos selectivos**

En esta etapa se utilizan placas MOX / ALOA este medio de cultivo es diferencial y por su composición permiten que las colonias de *Listeria monocytogenes* crezcan con un aspecto característico (colonias típicas).

- Se deposita, por duplicado, 0,1 ml del caldo de enriquecimiento Fraser en la superficie bien seca de las placas MOX / ALOA

- Diseminar el inóculo con asa de vidrio estéril (asa de Drigalsk), procurando no romper el medio. Desechar el asa y utilizar otra nueva para extender cada duplicado.
- Dejar las placas durante 15 minutos sobre la mesa de trabajo para que se absorba el inóculo. Incubar en estufa a 30 °C durante 24 horas
- Las colonias típicas aisladas se transfieren a agar nutritivo para su confirmación. Incubar a 31 °C durante 24 horas.



iii. Identificación Bioquímica mediante *Listeria* monoconfirm test

Esta identificación se basa en 4 pruebas bioquímicas para la identificación de *Listeria spp.* y la diferenciación entre *Listeria monocytogenes* de otras especies de *Listeria*. Los sustratos de las reacciones están desecados dentro de unos micropocillos:

- A, E: Producción de Ácido de arabitol
- B,F: Producción de Ácido de α -metil-D-glucósido
- C, G: b-glucosidasa
- D, H: D-aminopeptidasa



Aislar, como mínimo, dos colonias con aspecto típico de *Listeria monocytogenes*.

- A partir de las placas de agar nutritivo se resuspenden 6-8 colonias para obtener una suspensión equivalente a una turbidez de McFarland N°2 en solución salina
- A partir de la solución salina se inoculan los pocillos.



- Se echan 3 gotas en cada pocillo con una pipeta estéril.
- Incubar a 37°C, durante 24 horas

5. Resultados e interpretación

Las tres primeras reacciones tienen resultados inmediatos siendo positivas o negativas según el color.

- Cuando las 3 primeras reacciones son positivas: Género *Listeria*

Para leer la 4ª prueba hay que añadir 1 gota de dimetilaminobenzaldehído al 5%.

- Cuando esta prueba es negativa: *Listeria monocytogenes*

Test	Reacción Positiva	Reacción Negativa
Producción de Ácido de arabitol	Crema / Amarillo pálido	Azul / Azul verdoso
Producción de Ácido de α-metil-D-glucósido	Crema / Amarillo pálido	Azul / Azul verdoso
β-glucosidasa	Azul / Azul claro	Sin color
D-aminopeptidasa	Amarillo	Azul verdoso / Sin color

6. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.2.4. *Campylobacter jejuni*

Dentro del género *Campylobacter*, se encuentra la especie enteropatógena *C. jejuni*, la más frecuentemente detectadas en enfermedades humanas. Tienen prevalencia en los animales destinados al consumo como aves de corral, vacunos, porcinos, ovinos, avestruces y mariscos [5, 47]. Por lo general, se cree que la vía principal de transmisión son los alimentos, a través de la carne y los productos cárnicos poco cocidos, así como la leche cruda o contaminada.

1. Objetivo

- Aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni* en muestras de alimentos.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 o 25 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer.
- Pipetas estériles de 10 ml y 1 ml
- Tubos de ensayos
- Asa de cultivo
- Placas de Petri
- Alcohol
- Agua destilada
- Probetas
- Bisturí y/ o Pinza

Medios de cultivo y reactivos

- Caldo Preston
- Agar Preston
- Cristal violeta
- Lugol
- Fucsina

- Clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina
- Ácido ascórbico
- Hipurato sódico
- Tampón fostato
- Solución de ninhidrina

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Estufa Incubadora
- Baño de agua a 50°C
- Microscopio

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Aislamiento e identificación de *Campylobacter jejuni*

i. Enriquecimiento en medio líquido

- Pesar 10 (o 25) gramos de alimentos y mezclar con 90 (o 225) ml de caldo Preston.
- Incubar en atmósfera microaerófila a 37 °C durante 24 horas.

Una atmósfera microaerófila que contenga un 5-10% de oxígeno, un 10% de dióxido de carbono y con nitrógeno de compensación (preferentemente que incluya aproximadamente un 7% de hidrógeno).

En ocasiones el enriquecimiento puede ser realizado directamente, éste es el caso de algunas muestras de alimentos, como pollo envasado al vacío. El líquido que rezuma del alimento suele ser el ambiente donde las células tienen más posibilidades de

sobrevivir. La muestra se recoge con un hisopo estéril y se inocula directamente en el caldo selectivo Preston o previamente en medio de transporte Cary-Blair.

ii. Aislamiento diferencial en medio sólido selectivo

En esta etapa se utilizan un medio de cultivo diferencial que por su composición permiten que las colonias de *Campylobacter jejuni* crezcan con un aspecto característico (colonias típicas).

- A partir del cultivo obtenido en el enriquecimiento sembrar, por duplicado, con asa de cultivo **Agar Preston**
- Incubar a 42°C, durante 48 horas en atmosfera microaerófila.



Las **colonias sospechosas** de *Campylobacter jejuni*, son blanquecinas, pequeñas, redondas y opacas.

iii. Identificación microscópica y bioquímica

- Observación microscópica: Tinción de Gram
- Pruebas bioquímicas
 - Oxidasa
 - Hidrolisis de Hipurato

Aislar, como mínimo, dos colonias con aspecto típico de *Campylobacter jejuni* del medio de aislamiento selectivo utilizado.

Tinción de gram

A partir de las colonias sospechosas se realiza una tinción de Gram.

- Colocar una porción de la colonia sobre un porta, extender y fijar a la llama, una vez fijada la muestra añadir los distintos colorantes:
 - Cristal violeta durante 2 minutos. Retirar
 - Lugol durante 1 minuto.
 - Lavar con alcohol

- Fucsina durante 30 segundos-1 minuto (este colorante de contraste mejora la observación)
- Lavar y dejar secar la preparación

Cuando se realiza una tición de gram a partir de un cultivo de Campylobacter jejuni se observan bacilos de morfología cuvada y gram negativos

Pruebas bioquímicas

- **Prueba de la oxidasa**

Diferenciase *Campylobacter* de otros géneros comprobando que las colonias seleccionadas son Oxidasa positivas (es decir que dan un resultado positivo en la prueba de la Citocromo-Oxidasa).

Se impregna un papel de filtro con el siguiente reactivo:

- 1g de Clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina
- 0,1g de Ácido ascórbico
- 100ml de Agua destilada

Extender cuidadosamente la colonia seleccionada con un asa de cultivo sobre el papel impregnado. Esperar unos segundos.



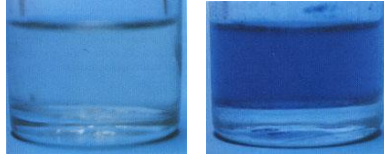
Si aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es positiva. Si no aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es negativa.

- **Hidrólisis de Hipurato**

Se utiliza esta prueba para diferenciar *C. jejuni*, que hidroliza el hipurato, de otras especies de *Campylobacter* (como *C. coli* y *C. laridis*) que no son capaces de hidrolizarlo.

- Colocar una porción de la colonia en Hipurato sodico en tampón fostato
- Incubar durante 2 horas a 37°C.

Los microorganismos que hidrolizan el hipurato producen glicina, la cual puede ser detectada adicionando una solución de ninhidrina que da un color azul en caso de que la reacción sea positiva.



Reaccion negativa y positiva

5. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.2.5. *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens es patógeno para los animales y el hombre (toxiinfecciones alimentarias: *Cl. perfringens* tipo A, y enteritis necrótica, *Cl. perfringens* tipo C). Para que sea causa de toxiinfección alimentaria, debe estar presente en el alimento en cifras elevadas, superiores a 10^5 *Cl. perfringens* por gramo [47]. Los alimentos que pueden estar contaminados son carnes vacuna, suina, pollo, salsas cocinadas y no refrigeradas.

1. Objetivo

- Investigación y recuento de colonias de *Clostridium perfringens* en alimentos.
- Detección por técnica de número más probable.

2. Material, medios y equipo

Material

- 10 g de muestra de alimento
- Tubos de ensayo
- Pipetas de 10 y 1 ml.
- Gradillas.
- Jarra para anaerobiosis
- Probetas
- Bisturí y / o Pinza

Medio y reactivo

- Agar sulfito-polimixina-sulfadiazina (SPS)
- Parafina estéril

Equipos

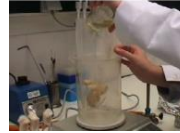
- Balanza
- Baño María a 50 °C
- Estufa Incubadora
- Stomacher

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Siembra en tubos de agar fundido

- Sembrar 1ml (por duplicado) de las distintas diluciones en cada uno de los tubos con agar fundido. Utilizar pipetas estériles para la siembra.
- Agitar suavemente los tubos para homogeneizar la muestra en el medio de cultivo.



- Una vez solidificado, se vierten unos 3 ml de parafina líquida estéril, para crear una atmósfera exenta de oxígeno.



7. Incubación

Incubar a **46 °C** durante 24 horas. Esta temperatura es selectiva para el aislamiento de *Clostridium perfringens*.

8. Recuento

Las colonias de *Clostridium perfringens* aparecerán de color negro debido a la formación de sulfuro ferroso por reducción del sulfito y con forma de esfera. Contar el número de colonias negras crecidas en el tubo y multiplicarlo por su factor de dilución. **(Ver apartado 2.7. ii)**

Aparición de coloración negra difuminada en el tubo:

Algunas bacterias (enterobacterias entre otras) sintetizan una exo-enzima sulfito-reductora que eliminan al medio de cultivo. Si la muestra contiene bacterias de este tipo que no se han destruido con el calentamiento previo, puede producirse sulfuro de hierro en el medio de cultivo provocando un ennegrecimiento de todo el tubo. La enzima sulfito-reductora de las especies del género *Clostridium* son endo-enzimas, que nunca se liberan al medio de cultivo, provocando la formación de sulfuro de hierro únicamente sobre las colonias.

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.2.6. *Vibrio cholera*

V. cholerae son las principales especies de vibrios causantes de las infecciones relacionadas a los pescados y mariscos. Los mariscos obtenidos de las aguas costeras frecuentemente contienen la bacteria *V. cholerae* serogrupo no O1. Además, el consumo de los mariscos crudos, semicrudos (inadecuadamente cocidos) o recontaminados puede causar la enfermedad cólera [74].

La misma técnica que se presenta a continuación se puede aplicar para Vibrio parahaemolytica (-).

1. Objetivo

- Determinar y comparar los recuentos de *Vibrio cholera* en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa por agotamiento en estría.

2. Material, medios y equipos

Material

- 25 g muestra del alimento
- Una matraz 225 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 0,1 ml
- Asa de Driglasky
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medios

- Agar TCBS (que contiene tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa).
- Agar lisina hierro (LIA)
- Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)
- Caldo trptona

- Reactivo Kovács

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 30°C
- Incubadora ajustada a 37°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado *Preparación de medios 2.2.2*)

4. Preparación de muestra

- En condiciones asépticas, pesar 25 gramos de muestra, cortándola en trozos pequeños
- Añadir 225 ml de agua de peptona alcalina y mezclar en un homogeneizador.
- Se incuba el matraz a 37°C durante 6-8 horas.



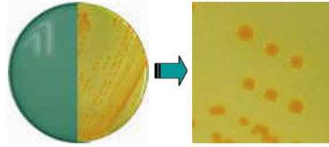
5. Aislamiento diferencial en medios solidos selectivos

En esta etapa se utilizan un medio de cultivo diferencial que por su composición permiten que las colonias de *Vibrio cholerae* crezcan con un aspecto característico (colonias típicas).

- A partir del cultivo obtenido en el enriquecimiento sembrar, por duplicado, con asa de cultivo sobre:
 - Agar Tiosulfato citrato sales biliares sacarosa (TCBS)



Las colonias sospechosas de *Vibrio cholerae* son de tamaño medio, color amarillo y halo en el centro. El resto de especies de *Vibrio* son más pequeñas y con un color azul verdoso (*Vibrio parahaemolyticus*).



6. Identificación Bioquímica

Para confirmar las colonias, todas aquellas que sean oxidasa negativa se desechan.

Prueba de la oxidasa

Reacción negativa desechar (la colonia sospechosa no es *Vibrio cholerae*)

Reacción positiva seleccionar (continuar la identificación bioquímica de la colonia).

- Aislar las colonias con aspecto típico de *Vibrio cholerae* del medio de aislamiento selectivo utilizado.



Para asegurar las colonias son de *Vibrio cholerae* es necesario comprobar que son Oxidasa positivas (es decir que dan un resultado positivo en la prueba de la Citocromo-Oxidasa). Esta prueba se hace sobre un número representativo de colonias. Esta prueba diferencia los miembros de la familia Enterobacteriaceae de *Vibrio cholerae*. Los miembros de la familia Enterobacteriaceae son negativos a esta prueba, en tanto que *V. cholerae* es positivo, aunque también lo son las pseudomonas.

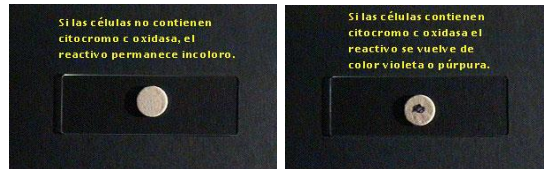
Prueba de la Citocromo-Oxidasa:

Se impregna un papel de filtro con el siguiente reactivo

- 1g de Clorhidrato de tetrametil-para-fenilen-diamina
- 0,1g de Ácido ascórbico
- 100 ml de Agua destilada

Extender cuidadosamente la colonia seleccionada con un asa de cultivo sobre el papel impregnado. Esperar unos segundos.

- Si aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es positiva
- Si no aparece rápidamente una coloración violeta la prueba es negativa.



Pruebas bioquímicas que se realizan a las colonias que han dado la reacción de la oxidasa positiva:

- Fermentación de glucosa y lactosa (Kliger o TSI),
- Descarboxilación de la lisina (LIA)
- Prueba del indol



Desechar todas las colonias que sean oxidasa negativas, y pasar a la comprobación bioquímica de las colonias que han crecido en Agar TCBS y han dado positivo en la prueba de la oxidasa.

- **Fermentación de glucosa y lactosa**

Sembrar cada colonia en Agar Hierro Triple Azúcar (TSI), con asa de cultivo, primero en el fondo por picadura y luego, en la superficie inclinada, por diseminación. Incubar los tubos de TSI a 37 °C durante 24 horas



- **Descarboxilación de la lisina**

Sembrar, por picadura en el fondo y por diseminación en la superficie inclinada del medio Agar Lisina Hierro (LIA). Incubar los tubos de agar LIA a 37 °C durante 24-48 h



- **Prueba del Indol**

Sembrar, en Caldo de Triptona e incubar los tubos a 37°C durante 24 horas

Reacciones positivas de la prueba bioquímica

***Vibrio cholerae* da la siguiente reacción sobre TSI:**

- Alcalina (rojo) en la superficie inclinada.
- Ácida (amarillo) en el fondo.
- Sin producción de SH₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo).



Lactosa (-), Glucosa (+), SH₂ (-) y sin gas

***Vibrio cholerae* da la siguiente reacción sobre LIA:**

- Alcalina (color púrpura) en la superficie inclinada.
- Alcalina (color púrpura) en el fondo.
- Sin Producción de SH₂ (ennegrecimiento del fondo del tubo).

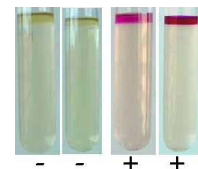


LCD (+), SH₂ (-)

En prueba de indol:

Esta prueba requiere un revalado, transcurrido el período de incubación se añade a cada tubo 0,2-0,3 ml del reactivo para el indol (reactivo de Kovacs).

Vibrio cholerae da positivo a esta reacción, si aparece un color rojo oscuro en la superficie de la capa de alcohol amílico, la prueba es positiva.



7. Recuento

Si la confirmación bioquímica ha resultado positiva para alguna de las cepas:

- Expresar los resultados como:

Cepas identificadas bioquímicamente como *Vibrio Cholerae* en 25 gramos de muestra procesada. Enviar a un laboratorio de referencia.

- En casi contrario, expresar los resultados como:

Ausencia de *Vibrio Cholerae* en 25 gramos de muestra procesada.

8. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.2.7. *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica se encuentra dentro de los patógenos entéricos, capaces de crecer a temperaturas desde los 4°C a 37°C y hasta 41°C, sujeta a variación en tiempo y requerimientos nutricionales. Esta característica constituye una gran desventaja para la industria de alimentos, ya que el microorganismo puede proliferar libremente a temperaturas de refrigeración [75].

Las fuentes de infección más frecuentes son la carne de cerdo y de ovino insuficientemente cocinados, la leche y derivados lácteos (helados, batidos, etc) no pasteurizados, huevos crudos y derivados (mayonesa, salsas, cremas de pastelería, etc.) Las verduras refrigeradas durante largos periodos de tiempo también se asocian, entre los platos preparados, este microorganismo puede crecer a temperatura de refrigeración en la carne envasada al vacío, en los mariscos refrigerados, en el pescado hervido, los huevos hervidos y pasteurizados líquidos, la leche pasteurizada entera, salsas, etc. si estos alimentos se mantienen durante largos periodos de tiempo [76].

1. Objetivo

- Aislamiento e identificación de *Yersinia enterocolitica* en muestras de alimentos.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 o 25 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas estériles de 10 ml y 1 ml
- Tubos de ensayos
- Asa de cultivo
- Placas de Petri
- Alcohol
- Agua destilada
- Probetas

- Bisturí y/ o Pinza

Medios de cultivo y reactivos

- Caldo peptona, sorbitol y sales biliares (PSB)
- Caldo irgasan, ticarcilina y clorato potásico (ITS)
- Agar con cefsulodina, irgasan y novobiosina (CIN)
- Agar Salmonella/Shigella con desoxicolato y cloruro calcio (SSDC)
- Agar nutritivo
- Medio urea indol
- Reactivo para la detección de indol
- Agar de Kligler
- Reactivo para la detección de oxidasa
- Medio de descarboxilación de lisina
- Medio de descarboxilación de ornitina
- Medios para fermentación de sacarosa, ramnosa, trealosa y xilosa
- Medio de citrato de Simmons
- Hidróxido de potasio

Equipos

- Balanza
- Estufa Incubadora
- Stomacher
- Baño de agua a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Aislamiento e identificación de *Yersinia enterocolitica*

i. Enriquecimiento en medio líquido

- Pesar 10 (o 25) gramos de alimentos y mezclar con 90 (o 225) ml de caldo PSB.
- Se homogeniza la suspensión utilizando un mezclador (stomacher) durante 2 minutos (dilución 1/10)
- Se prepara de la misma manera una segunda suspensión inicial con caldo ITC, para obtención de la dilución 1/100
- Incubar :
 - Caldo PBS a 25 °C durante 5 días sin agitación
 - Caldo ITC a 25 °C durante 48 h.

ii. Aislamiento diferencial en medio sólido selectivo

En esta etapa se utilizan un medio de cultivo diferencial que por su composición permiten que las colonias de *Yersinia enterocolitica* crezcan con un aspecto característico (colonias típicas).

- A partir del cultivo PSB obtenido en el enriquecimiento, se transfieren 0,5 ml del cultivo a 4,5 ml de hidróxido de potasio y se mezclan.
- Pasado 20 s, se siembra por duplicado con asa, la superficie de la placa de agar CIN, para obtener colonias bien aisladas.
- Del cultivo ITC, se siembra con un asa la superficie de la placa de agar SSDC.
- Se invierten las placas e incubar a 30 °C:
 - Después de 24 h se examinan las placas para detectar la presencia de las colonias características de *Yersinia enterocolitica*.

En el agar CIN las colonias se presentan pequeñas y lisas con un centro rojo y un borde translucido. En agar SSDC las colonias son pequeñas y grises con un borde poco definido. *Si el desarrollo de las colonias es lento y la coloración es débil o si todavía no hay colonias características, se continúa la incubación de las placas hasta 48 h.*

iii. Confirmación

Para confirmación, se toman cinco colonias consideradas típicas de cada placa de medio selectivo (si en una placa hay menos que cinco colonias se toman todas que hay y que sean típicas)

- Se siembra las colonias seleccionadas en la superficie de placas Agar nutritivo
- Incubar a 30 °C durante 24 h
- Se examinan las placas para comprobar la pureza del cultivo, si hay cultivo mixto, se sub cultiva cada tipo de colonias individuales en otras placas de agar nutritivo y se incuba a 30 °C durante 24 h.

iv. Pruebas presuntivas

Se inocula con un filamento recto en:

- Detección de la ureasa: se emplea un inóculo para sembrar el caldo justo por debajo de la superficie del medio ureasa/ indol. Se incuba a 30 °C durante 24h
 - Un color rosa violáceo o rojo rosado indican una reacción positiva a la ureasa (reacción positiva entre 1 a 5 min)
 - Un color amarillo anaranjado indica una reacción negativa a la ureasa.
- Detección del indol: se añade de 0,1 ml a 0,2 ml de reactivo de detección indol a los tubos de la detección de ureasa. La aparición de un anillo rojo en la superficie del cultivo a los 15 min indica reacción positiva.
- Agar de Kigler: se siembra por punción profunda la parte inferior del agar y por estriado en la parte inclinada (en tubos)
 - Se incuba a 30 °C durante 24 a 48 h
 - Se en la parte profunda la color es
 - Amarilla – glucosa positiva(fermentación de la glucosa)
 - Rojo o sin cambio - glucosa negativo (no fermentación)
 - Negro – formación de sulfuro de hidrogeno
 - Burbujas - formación de gas
 - Se la parte inclinada la color es:
 - Amarillo – lactosa positivo (formación de lactosa)
 - Rojo o sin cambio – lactosa negativa

- Detección de la oxidasa: con un asa de platino, se toma una colonia típica seleccionada y se deposita en estría en un papel de filtro humedecido ligeramente con el reactivo de la oxidasa.

v. Prueba bioquímica

Se continúa la identificación de colonias se:

- La detección de ureasa es positiva
- La detección de indol es negativa o positiva
- Fermentación de la glucosa es positiva
- Formación de gas de la glucosa es negativa
- Fermentación de lactosa es negativa
- Formación de H₂S es negativa
- Detección de la oxidasa es negativa

Siendo así:

- Con una asa se siembra el medio para la descarboxilación de la lisina, por debajo de la superficie del medio líquido. Se incuba a 30 °C durante 24h
- Con una asa en el medio para la descarboxilación de la ornitina, se siembra por debajo de la superficie del medio líquido. Se incuba a 30 °C durante 24 h
 - Un color violeta indica reacción positiva, un color amarillo indica reacción negativa.
- Se siembra por debajo de la superficie del medio líquido: Medio para la fermentación de la sacarosa, ramnosa, trealosa y xilosa. Se incuba a 30 °C durante 24 h.
 - Un color amarillo indica reacción positiva y un color rojo indica una reacción negativa
- Medio Simmons para la hidrólisis del citrato, se siembra en estría la superficie inclinada del agar (mantenga los tubos abiertos, de modo que pueda entrar el aire y tenga condiciones aeróbicas). Se incuba a 30 °C durante 24 h, la reacción es positiva se el color del medio vira a azul.

4. Resultados

Si la confirmación bioquímica ha resultado positiva para alguna de las cepas:

- Expresar los resultados como:

Cepas identificadas bioquímicamente como *Yersinia enterocolitica* en 25 gramos de muestra procesada. Enviar a un laboratorio de referencia.

- En caso contrario, expresar los resultados como:

Ausencia de *Yersinia enterocolitica* en 25 gramos de muestra procesada

5. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.2.8. *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria perteneciente a la familia *Bacillaceae*. Es Voges Proskauer-positivo. Fermenta la glucosa, la sacarosa, la salicina y el glicerol. No fermenta el manitol ni la arabinosa. Produce lecitinasa. Es un microorganismo ubicuitario, abundante en la naturaleza. Se encuentra frecuentemente en el suelo, polvo, vegetales, cereales, harinas, especias, plantas medicinales y en algunos alimentos crudos o procesados [48]. Es capaz de producir enfermedad en el hombre si concurren ciertas condiciones:

- Cuando el alimento está muy contaminado (cifras cercanas a 10^6 y superiores).
- Cuando el tratamiento térmico al que se ha sometido el alimento para su preparación ha sido insuficiente para destruir las esporas.

1. Objetivo

- Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus* en muestras de alimentos.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra de alimento
- Matraces Erlenmeyer
- Pipetas estériles de 1 ml
- Tubos de ensayos con 9 ml de agua peptonada
- Asa de cultivo
- Asa de Driglaski
- Placas de Petri
- Alcohol
- Probetas
- Bisturí y/ o Pinza

- Portaobjetos

Medios de cultivo y reactivos

- Agar manitol yema de huevo (Mannitol-Egg Yolk. Agar MYA)
- Agar manitol yema de huevo con polimixina (Mannitol-Egg Yolk-Polymixin Agar MYPA) de MOSSEL
- Medio movilidad
- Agar sangre

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Estufa Incubadora
- Baño de agua a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2)

4. Aislamiento e identificación de *Bacillus cereus*

Técnica: Método de recuento en placa

Los distintos métodos de aislamiento de *B. cereus* utilizados se basan en proporcionar al microorganismo ciertas condiciones para que manifieste su propiedad lecitinásica y su falta de acción sobre algunos azúcares (manitol). El medio más efectivo es el de Mossel, con el que se demuestra la existencia de lecitinasa en presencia de polimixina (inhibidor de la flora competitiva) y la no fermentación del manitol. Se utiliza cuando se sospecha que el alimento contiene >10 *B. cereus* por gramo de alimento

Fases del método de recuento en placa:

- Preparación de la muestra y diluciones decimales.
- Aislamiento en medio selectivo agar MYP de Mossel a partir de la serie de diluciones seriadas.
- Confirmación de las colonias sospechosas mediante diferentes pruebas:
 - Prueba de la hemólisis
 - Prueba de la movilidad

5. Preparación de la muestra

- Preparar, asépticamente, una suspensión madre de la muestra 1/10. Pesar 10 g del producto en condiciones asépticas.
- Añade 90ml del diluyente (agua de triptona).



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos.

**6. Preparación de diluciones decimales**

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos.



7. Aislamiento en medio selectivo agar MYP de Mossel

- A partir de la serie de diluciones decimales y por duplicado, se deposita 0,1 ml de cada dilución en la superficie de agar MYPA de Mossel solidificada.
- Diseminar el inóculo con asa de Driglaski.
- Incubar las placas de forma invertida a 32 °C durante 24 horas.



Las colonias de *B. cereus* aparecen sobre un sustrato rosado. Están rodeadas de un halo de precipitación blanco denso y una gama de tonos rojo violeta. A las 24 horas de incubación, las colonias son circulares y lisas, y miden 2-3 mm de diámetro. Pasadas las 24 horas, las colonias son más grandes, rugosas, rizoides, con diferenciación en forma de estrías.

Para el recuento, se seleccionan las placas que contengan entre 15-150 colonias típicas. Se seleccionan al azar 3 colonias de presuntos *Bacillus cereus* de cada placa seleccionada para proceder a su confirmación.

8. Pruebas confirmativas

Partiendo del crecimiento obtenido en agar nutritivo, se realizan las pruebas siguientes:

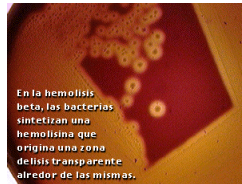
i. Prueba de la hemólisis

A partir de las colonias seleccionadas, sembrar haciendo varias estrías paralelas en agar sangre. Este medio de cultivo está enriquecido con la adición de sangre.

Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes. Las bacterias que producen estas enzimas presentan un halo transparente alrededor de las colonias a consecuencia de la lisis de los hematíes. Hay tres categorías de hemólisis:

- α Hemolisis, parcial destrucción de los hematíes.
- β Hemolisis, completa destrucción de los hematíes.
- γ Hemolisis, ausencia de hemolisis.

B. cereus produce una hemolisis beta, origina una zona de lisis alrededor de las colonias.

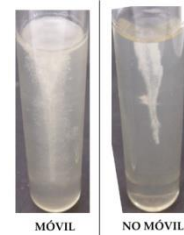


ii. Prueba de la movilidad

A partir de las colonias seleccionadas, sembrar por picadura en la media movilidad. Incubar a 32 °C durante 24 horas. Los microorganismos móviles producen un crecimiento difuso; los inmóviles crecen exclusivamente a lo largo de la picadura.



La mayoría de los *B. cereus* son móviles, mediante flagelos peritricos.



9. Expresión de los Resultados

Si las colonias crecidas en Agar Mossel resultan confirmadas el número de colonias contadas se multiplica por el factor de dilución de la placa, y se obtiene así el número de colonias de *B. cereus* en 0,1 g de muestra. Esta cifra, multiplicada por 10, da el número de colonias por gramo o mililitro. (Ver apartado 2.7. ii)

10. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.3. Microorganismos alterantes

3.3.1. *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son el grupo de bacterias más frecuente en los alimentos frescos. Debido a su gran potencial metabólico, las bacterias de estos grupos son agentes importantes en la alteración de alimentos [65]. Sin considerar los aspectos de deterioro de vegetales, responsables de la alteración de productos cárnicos almacenados incorrectamente en condiciones de aerobiosis, tiene lugar durante la conserva en refrigeración. Cuando piezas de alimentos cárnicos son conservadas en refrigeración en ambientes impermeables al gas o en vacío, las *Pseudomonas* pueden producir H₂S que reacciona con la hemoglobina dando lugar a la aparición de manchas verdes.

1. Objetivo

- Determinación y recuento de pseudomonas por siembra en superficie en muestra de alimentos
- Familiarizarse con la técnica de recuento en placa

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Frasco con alcohol
- Asa de Driglasky
- Machero de Bunsen
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medios

- Agar pseudomonas

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 30 °C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado *Preparación de medios 2.2.2.*)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona.



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos

**5. Preparación de diluciones decimales**

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: Recuento en placa por siembra en superficie

- A partir de la serie de diluciones decimales, sembrar en placas (duplicado) de Agar *Pseudomonas* por cada dilución, depositando 0,1ml en cada placa
- Extender cuidadosamente el inóculo con asa de Driglasky y esperar a que se seque



7. Incubación

Incubar las placas de Petri en estufa a 30 °C durante 48 horas



8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Anote y analice los resultados. (Ver apartado 2.7. ii)

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. (Ver apartado 2.6)

3.3.2. *Bacterias ácido lácticas*

Las *bacterias ácido lácticas* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son bien conocidas en la industria láctea, cárnica y de los vegetales. El análisis de *bacterias ácido lácticas* en la industria láctea es útil por varias razones. Incluye la determinación de causas de alteración ácida en productos tales como leche fluida y queso; evaluación de cultivos lácticos iniciadores; y control de la calidad de quesos madurados, leches fermentadas y productos no fermentados adicionados de cultivos [39, 48].

1. Objetivo

- Recuento de bacterias lácticas en muestra de alimentos, por siembra en profundidad en doble capa.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g de muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 1ml
- Bisturí y / o Pinza
- Probetas

Medio

- Medio de cultivo MRS

Equipos

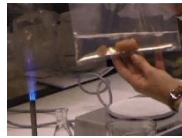
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 30°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua de peptona



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos



5. Preparación de diluciones decimales

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: *Recuento en placa por siembra en profundidad por doble capa*

- Asépticamente pipetear 1 ml de cada dilución y sembrar por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas. *Volver a mezclar la dilución a usar, si ésta ha permanecido más de 3 minutos sin agitar.*
- Agregar a cada una de las placas unos 10 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 47-50°C.
- Inmediatamente mezclar la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un lapso igual o superior a un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Dejar solidificar manteniéndolo a temperatura ambiente sobre una superficie plana y horizontal.
- Una vez que el agar de las placas ha solidificado completamente añadir una segunda capa de agar para recuento en placa de unos 15 ml y asegurarse de que queda bien extendida sobre la superficie de la capa anterior (*esta segunda capa de agar no debe homogenizarse, por lo tanto no aplicar movimientos circulares y de vaivén*).



7. Incubación

Una vez solidificada la segunda capa de agar, invertir las placas de Petri e incubar a 30°C durante 72 h.



8. Recuento

Pasado el tiempo de incubación las colonias habrán crecido dentro del agar (en la masa del agar). Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 30 y 300 colonias /placa. Anote y analice los resultados. **(Ver apartado 2.7. ii)**

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 2.6)**

3.3.3. Mohos y levaduras

Los *mohos y levaduras* son microorganismos alterantes en la mayoría de los alimentos. El significado de la contaminación fúngica de los alimentos viene determinado por su capacidad para deteriorar los alimentos, produciendo defectos en el aspecto modificaciones químicas, alterando el valor nutricional, variando sus características organolépticas y dificultando su conservación [48].

Sin embargo el Recuento de Hongos y Levaduras se utiliza simplemente como parámetro indicador de alteración incipiente sin que pueda en absoluto considerarse relacionado con la presencia de micotoxinas, es un índice de las condiciones higiénicas de una materia prima y de las condiciones de manipulación. Su significado es similar al de los aerobios mesófilos [47].

1. Objetivo

- Determinar y comparar los recuentos de *mohos y levaduras* en muestras de alimentos.
- Familiarizarse con la técnica básica de siembra en placa para el recuento.

2. Material, medios y equipos

Material

- 10 g muestra del alimento
- Una matraz 90 ml de agua de peptona
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua de peptona
- Placas de Petri vacías
- Pipetas de 10 y 0,1 ml
- Asa de Driglasky
- Probetas
- Pinza y / o Bisturí

Medios

- Agar Sabouraud

Equipos

- Balanza
- Stomacher
- Incubadora ajustada a 25°C
- Baño de agua ajustado a 50°C

3. Preparación de medio

(Ver apartado Preparación de medios 2.2.2.)

4. Preparación de muestra

- Asépticamente se pesan 10 g de muestra en una bolsa Stomacher
- Se diluyen en 90 ml de agua peptonada



- Homogenizar la mezcla en el Stomacher durante 2 minutos (el tiempo varía según el tipo de alimento) o realizarlo por trituración en un vaso esterilizado de una trituradora de cuchillas -tipo batidora- a una velocidad aproximada de 14.000 rpm y en un tiempo medio de 60-90 segundos

**5. Preparación de diluciones decimales**

- Preparar diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml. (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada, y evitando que se forme espuma. *El número de diluciones a realizar depende del número de microorganismos que se espera encontrar, cuanto mayor sea el número de microorganismos esperado más diluciones decimales deben hacerse del alimento.*



- Mezclar mecánica o manualmente cada dilución agitándola durante algunos segundos



6. Preparación y siembra de placas: Recuento en placa por siembra en superficie

- A partir de la serie de diluciones decimales, sembrar en las placas (duplicado) de Agar Sabouraud Oxitetraciclina por cada dilución, depositando 0,1ml en cada placa
- Extender cuidadosamente el inóculo con asa de Driglasky y esperar a que se seque



7. Incubación

Incubar las placas de Petri en estufa a 25 °C durante 5 días.



8. Recuento

- Contar por una parte las colonias de mohos y por otra las colonias de levaduras (*Colonias típicas de mohos tienen un aspecto algodonoso, varía en el tamaño y color; y las levaduras son colonias convexas suelen ser brillantes, de color crema o rosa pálido*).
- Elegir de entre todas las placas las dos correspondientes a aquella dilución que presenten un número de entre 0 y 200 colonias /placa para levaduras (*se solo presentan levaduras*) y entre 0 y 30 colonias se solo presentan mohos o se presentan los mohos y levaduras en simultaneo. Para realizar el conteo, se utiliza un cuenta-colonias; se pone la placa de Petri con la base hacia arriba y, si

es preciso, se divide en sectores marcando mediante un lápiz graso a lo largo de los diámetros. **(Ver apartado 2.7. ii)**

9. Esterilización de residuos

Al final de los análisis (siembra y recuento), los materiales usados (tubos, puntas de pipetas, etc) debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio. **(Ver apartado 8.6)**

4. Legislaciones y normas: recopilación de Normas

La industria alimentaria, como productora de alimentos de consumo, juega un papel muy importante en la salud humana. Por esta razón se trata de una industria regida por numerosas normas y directrices que abarcan cada uno de los distintos ámbitos de la industria, desde la cría de animales hasta el muestreo que ha de realizarse para el control de calidad de los productos, incluyendo los límites establecidos para cada parámetro medido. Este control normativo no solo se aplica a los centros productores sino también los laboratorios, pertenecientes o no al centro productor, en los que se llevan a cabo, entre otros, los controles de los productos terminados, materias primas y/o análisis de ambiente y superficies. En el presente apartado se recogen las principales legislaciones de aplicación en laboratorio de análisis microbiológico de alimentos, para los distintos grupos de alimentos. El cumplimiento de legislaciones es obligatorio.

1. Reglamento (CE) N° 2073/2005, Relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
2. Reglamento (CE) N° 1441/2007 que modifica el Reglamento n° 2073/2005.
3. Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados, otros parámetros físico-químicos de interés sanitario, Enero 2014 (ANEXO I).
4. Criterios y límites para los exámenes y testes en el ámbito de controles oficiales aplicables a los productos alimentarios de origen acuático: INIP/2011 – Mozambique.
5. Reglamento sobre calidad del agua para consumo humano, n° 189/2004 – Aprobado por el ministerio de la salud de Mozambique.

Todos los reglamentos establecen los límites microbiológicos en función del tipo de alimento (como los recogidos en el Anexo I) y las norma de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias.

PARTE II

En este apartado se describirá el entrenamiento práctico que se llevó a cabo en el Laboratorio de microbiología de la UPNA, con el objetivo de adquirir habilidades en la área de control microbiológico de alimento referentes a los métodos microbiológicos convencionales que a prior se aplicaran en Laboratorio de microbiología de alimentos de la Universidad Católica de Mozambique. Para llevar a cabo el entrenamiento se decidió realizar los siguientes análisis: análisis microbiológico de bacterias *aerobias mesofilas* y *aerobias psicrotrofas*, en muestras de carne picada de vacuno y filetes de lomo de cerdo, aplicando los métodos de siembra convencionales (siembras en profundidad y en superficie).

El entrenamiento consistió en realizar los análisis dos veces por semana, durante todo el mes de Marzo, considerando dos primeras semanas de análisis para la carne picada recogiendo las muestras al día 0 (t_0), 2 (t_1), 7 (t_2) y 9 (t_3) y dos semanas siguientes para los filetes de lomo de cerdo recogiendo las muestras al día 0 (t_0), 2 (t_1), 7 (t_2). A continuación paso a describir los materiales y métodos puestos en práctica.

1. Materiales, medios y equipos

Materiales

- Pipetas estériles de 0,1ml, 1 ml y 9 ml
- Pinzas esterilizadas
- Placas de petri
- Asa de Drigalsk plásticas estériles
- Tubos de ensayo
- Probetas esterilizadas
- Bisturí
- Bolsas de stomacher

Medios de cultura

- Plant count agar (PCA)
- Solución salina peptonada

Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora a 30 °C
- Nevera a 4 °C
- Autoclave a 121 °C
- Estufa a 50 °C

Muestras

Las muestras de carne picada de vacuno y lomo de cerdo, adquiridas en el supermercado de Pamplona, se encontraban envasadas y conservadas a temperaturas de refrigeración. La carne picada estaba envasada en atmosfera modificada. Todas ellas se mantuvieron en Laboratorio a temperaturas de refrigeración.

2. Metodología

2.1.Preparación de medios y materiales

El medio de cultura y el diluyente, fueran preparados de acuerdo a las recomendaciones indicadas por los fabricantes y la metodología descrita anteriormente (apartado 2.2. de la Parte I), fueron esterilizados en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.



Las placas de Petri y las asas de Drigalsk eran plásticas ya esterilizadas por radiación. Las placas de Petri fueran identificadas/anotadas en el fondo, con las diluciones decimales, el tipo de microorganismo y la muestra.

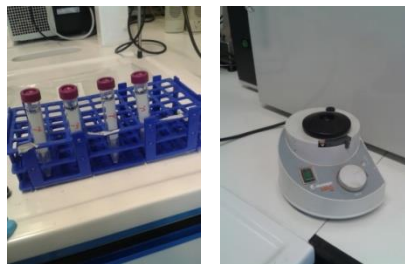


2.2.Preparación de muestras y diluciones seriadas

Partiendo inicialmente de limpieza de la área de trabajo (Cabina de flujo laminar), se pesaran en el medio aséptico 10 g de las muestras en bolsas de stomacher (muestra de carne picada y lomo de cerdo), en separado y se añadirán 90 ml de agua peptonada esterilizada. Se homogenizaran las muestras en stomacher durante 2 minutos y de esta forma se obtuve la suspensión madre (10^{-1}).



Se preparó diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 10^n sobre la base de la dilución inicial de 10 g en 90 ml (dilución 10^{-1}), usando pipetas o puntas estériles para cada dilución, tomando 1 ml. de la solución anterior en 9 ml de agua peptonada. El número de diluciones a realizar vario por día, pues dependía del número de microorganismos que se estimaba encontrar en muestras, cuanto mayor era el número de microorganismos esperado más diluciones decimales se hicieran, en cada día de análisis. Se mezclaran los tubos en un vortex (mezclador) durante algunos segundos.



2.2.1. Siembra en profundidad

- Asépticamente se pipeteo 1 ml de cada dilución y se sembró por duplicado en placas de Petri vacías y estériles previamente rotuladas.
- Se agregó a cada una de las placas unos 20 ml de agar de recuento en placa fundido mantenido a 50°C en estufa.
- Inmediatamente se mezcló la muestra diluida y el agar mediante agitación manual suave (movimientos circulares y de vaivén), durante un minuto, evitando mojar los bordes de la placa;
- Se dejaron solidificar manteniendo las placas en la cabina de flujo laminar
- Se sellaron las placas con parafilm

2.2.2. Siembra en superficie

- A partir de la serie de diluciones decimales, se siembra en las placas de PCA ya solidificado (duplicado) de por cada dilución, depositando 0,1mL en cada placa
- Cuidadosamente se extendió el inóculo con asa de Driglasky y se deja que se seque



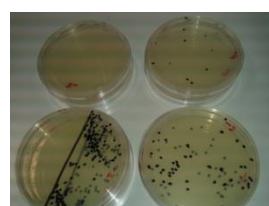
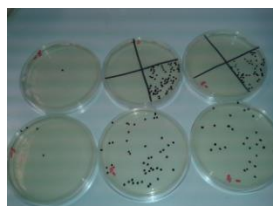
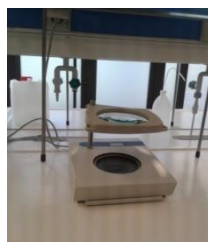
2.3. Incubación y lectura

Las placas inoculadas se llevaran a la incubadora / nevera, en posición invertida, a temperaturas de:

- *Bacterias aerobias mesofilas*: 30 °C durante 48h
- *Bacterias psicrotrofas totales*: 4 °C durante 7 días



Pasado el tiempo de incubación, se realizaban las lecturas de cada uno de los microorganismos, con el auxilio de una cuenta colonias



3. Resultados

Se observa en las gráficas (a y b) en la figura 8, que hubo un crecimiento microbiano con el tiempo de almacenamiento, hasta el t₃ (la segunda semana de análisis) los recuento se encontraban entre 7,89 y 7,02 Log ufc/g para los aerobios mesofilos, y 7,96 y 70,2 Log ufc/g para los aerobios psicrotrofos, en los dos métodos de siembra aplicados. Se obtuvo recuentos menores en la siembra en profundidad en comparación con la siembra en superficie.

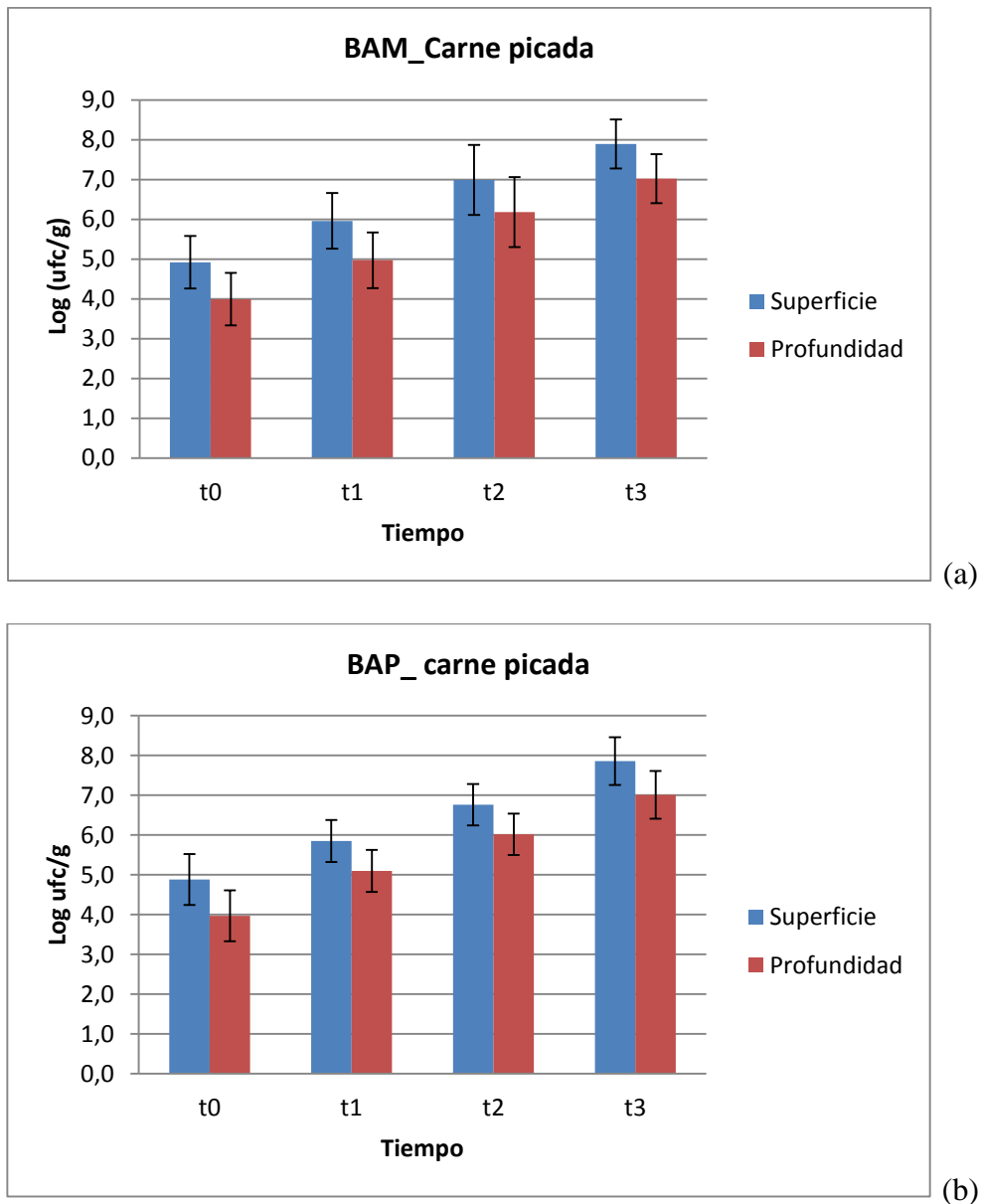


Fig. 8. Grafico (a) y (b) los recuentos (Log ufc/g) obtenidos en carne picada. BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

En los filetes de lomo de cerdo se ha observado recuentos menores al t_0 , alcanzando recuento entre 5, 29 y 4,37 Log ufc/g para los aerobios mesofilos, y 5,59 y 4,61 Log ufc/g para los aerobios psicrotrofos en la segunda semana de análisis (figura 9), se observado un crecimiento microbiano pasado el tiempo de almacenamiento. Como en la carne picada, en los filetes de lomo de cerdo también se observó los bajos recuentos obtenidos en la siembra en profundidad.

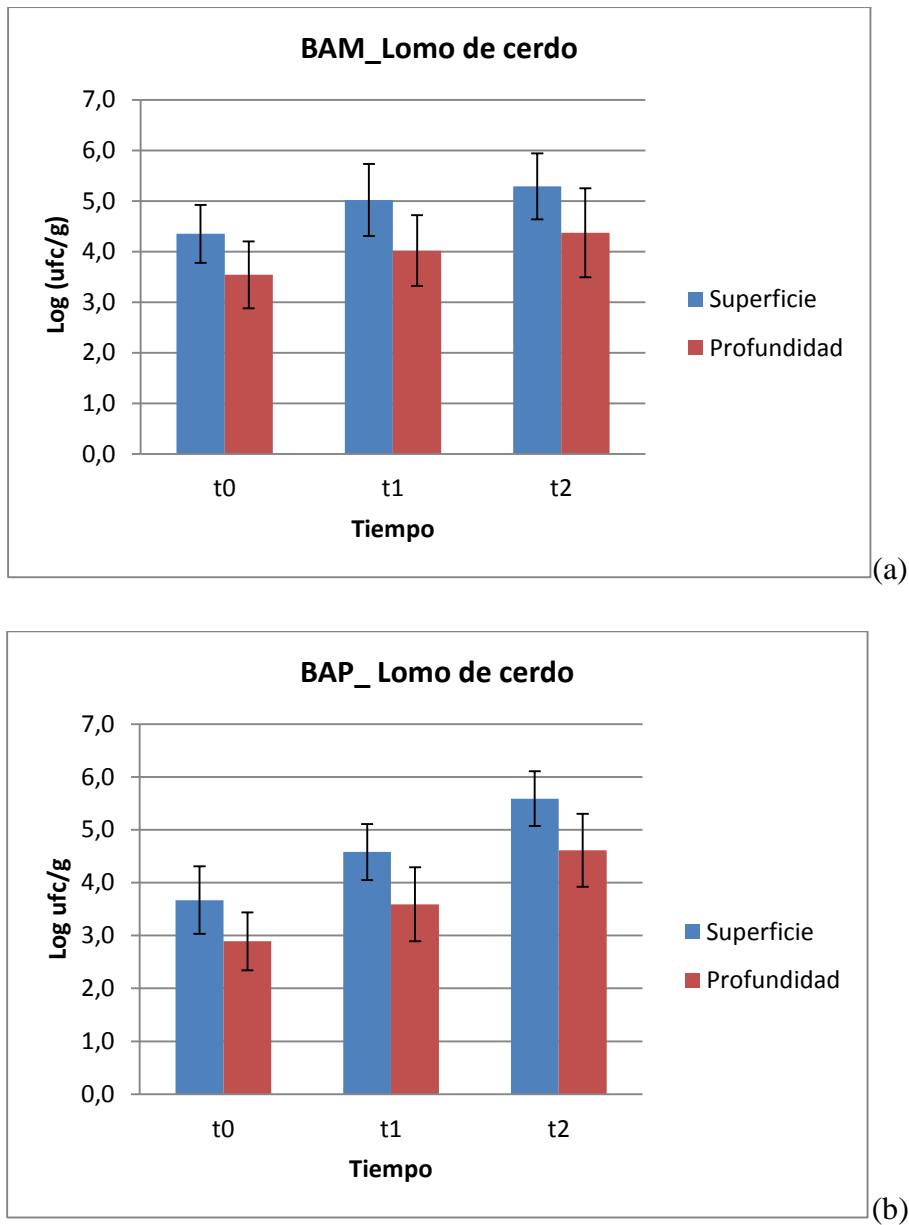


Fig. 9. Grafico (a) y (b) los recuentos (Log ufc/g) obtenidos en lomo de cerdo. BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

Comparando los recuentos de las dos muestras, se puede observar que hubo mayor crecimiento microbiano en carne picada desde la primera semana de análisis, en relación a los filetes de lomo de cerdo. Se observó que hasta la segunda semana los recuentos para los filetes continuaran bajos. La legislación microbiológica española impone una carga máxima de 5×10^6 g para los *aerobios mesofilos* en carne picada con más de 24h. En este trabajo los recuentos de *aerobios mesofilos* al t_0 fueran de 4,92 Log ufc/g, se encontraban por debajo de los límites de acuerdo a la legislación, alcanzado valores por encima del límite en la segunda semana (t_2 y t_3).

En relación a la carne de cerdo la legislación impone un límite máximo de *aerobios mesofilos* de 5,0 log ufc/cm² para canales antes del enfriamiento y 5×10^6 g para las carnes separadas mecánicamente, en este trabajo los recuentos de filetes de lomo de cerdo se encontraban por debajo de estos límites en la primera semana de análisis. Los resultados demuestran que el lomo de cerdo tiene vida útil para su comercialización de una semana, en comparación con la carne picada.

PARTE III

El objetivo de esta parte es comparar tres técnicas de siembra, por una parte se describe la repetibilidad de los resultados de los análisis para cada uno de los tres métodos de siembra aplicado. Además se realiza, una comparación entre los métodos de siembra y su efecto sobre los análisis microbianos, y una discusión de los recuentos microbianos en relación a las muestras y el tiempo de almacenamiento. Además de los métodos descritos en la Parte II (siembra en profundidad y siembra en superficie), en esta parte también se realizó una siembra automática en espiral. A continuación paso a describir los resultados obtenidos.

1. Introducción

La mayor parte de los estudios microbiológicos es crítico conocer con exactitud el número de microorganismos presentes en una muestra. Así, en el campo de alimentos, superficies y del aire de las industrias alimentarias, es un parámetro importante. Para estos propósitos existen diversos métodos, como los directos que son los recuentos por observación al microscopio en placa de hemocitómetro, e indirectos que son los más utilizados como la medida de la turbidez o el recuento de células viables por diluciones sucesivas [47]. Este último método el objeto de este estudio.

Los métodos de análisis deben proporcionar las bases necesarias para poder emitir resultados sobre la calidad y seguridad microbiológica de los alimentos. Es por ello que antes de seleccionar un método para la detección de microorganismos, se debe conocer la sensibilidad y reproducibilidad. El método de siembra a emplear dependerá de los objetivos que se pretendan alcanzar con el cultivo, ya que en ocasiones se requiere que el desarrollo del microorganismo se produzca de forma masiva, mientras que en otras resulta indispensable que las colonias queden aisladas o que las manifestaciones del metabolismo tengan lugar con tensiones reducidas o privadas de oxígeno [48]. Los métodos microbiológicos “convencionales”, empleados actualmente en numerosos laboratorios y establecidos en muchos casos como métodos estándares de análisis microbiológico de los alimentos, se caracterizan por ser laboriosos, emplear grandes

volúmenes de medios de cultivo y requerir un tiempo considerable para la obtención y el análisis de los resultados [48, 49].

Por el contrario, los métodos rápidos requieren un tiempo reducido para la obtención de los resultados y/o permiten procesar un número elevado de muestras por unidad de tiempo, y son en general fáciles de usar, precisos (sensibilidad y especificidad adecuadas y límites de detección bajos) y económicamente rentables.

Tradicionalmente, el recuento de células viables se ha realizado mediante el método estándar de recuento en placa, que aunque sencillo, es laborioso, requiere un volumen considerable de tubos de ensayo y medio de dilución, y espacio para el almacenamiento y la incubación de las placas de cultivo. Cada tipo de recuentos viables es potencialmente útil para fines específicos, se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas de agar que han sido previamente inoculadas con cantidades conocidas de alimento diluido e incubadas en condiciones ambientales predeterminadas [48]. En cuanto a los métodos de siembra existen las siembras tradicionales (en superficie y en profundidad), siendo caracterizadas fundamentalmente por la recuperación de células bacterianas para llevar a cabo un recuento de este tipo determinando en número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido [51]. Existen sembradores automáticos en espiral que reducen o eliminan la necesidad de realizar diluciones seriadas de la muestra y que facilitan el recuento mediante el empleo de contadores automáticos de colonias (**Ver apartado 2.4**).

2. Objetivos

General:

- Realizar una comparación de tres técnicas de siembra en el análisis microbiológico.

Específicos:

- Analizar los microorganismos aerobios (*mesofilos* y *psicrotrofos*) en muestras de merluza, mediante el uso de tres métodos de siembra, dos tradicionales y uno automatizado: i) siembra en superficie, ii) siembra en profundidad y iii) siembra en espiral.
- Analizar la repetibilidad para cada uno de los tres métodos de siembra.
- Comparar los resultados del análisis microbiano entre los tres tipos de siembra.

3. Materiales y Métodos

3.1. Materiales

i. Materia prima

La materia prima utilizada fueron trozos de merluza fresca obtenidas en una pescadería local de Pamplona. Después de la compra (300 g), la merluza fresca se mantuvo en refrigeración, hasta el momento de sus análisis.

ii. Materiales, medios y equipos

Materiales

- Pipetas estériles de 0,1ml, 1 ml y 9 ml
- Pinzas esterilizadas
- Placas de petri
- Asa de Drigalsk plásticas estériles
- Tubos de ensayo
- Probetas esterilizadas
- Bisturí
- Cuchillo
- Bolsas de stomacher

Envasado de las muestras

- Envasadora de barquetas ILPRA TERMOSALDATRICI
- Barquetas de PP Blanco 10/10
- Film de polipropileno Tecnopack PP-EVOH-PP P12-6070BXSTNP

Para conservar las muestras

- Cámara de refrigeración (T^a)

Medios de cultivo

- Plant count agar (PCA)
- Solución salina peptonada

Equipos

- Cabina de flujo laminar
- Balanza
- Stomacher
- Incubadora a 30 °C
- Nevera a 4 °C
- Autoclave a 121 °C
- Estufa a 50 °C

3.2. Metodología**i. Preparación de muestras**

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios del Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPNA. Una vez teniendo la materia prima, se preparó todo el material necesario de cortado en el interior de una cámara de flujo laminar. Se utilizaron cuchillos y tabla de cortar y bandejas. El cortado de las muestras se realizó a mano en el interior de la cámara previamente esterilizada. Posteriormente, se dividieron en tres partes: una de ellas fue subdividida en dos y fueron envasadas 40 g en dos bandejas de polipropileno, con film impermeable a oxígeno y refrigeradas a 8 °C (figura 7), para los dos siguientes días de análisis. El resto del pescado fue sometido a los análisis bacteriológicos. Las condiciones de todos los análisis serán detalladas posteriormente en la parte de Diseño Experimental.



Fig. 10. Materia prima - merluza

ii. Análisis realizados

Se realizaron siembras en superficie y en profundidad basado en los materiales y métodos descritos en la Parte II del trabajo (pag. 161). Además, se realizó siembra en espiral usando una sembradora espiral (Figura 8).



Fig. 11. Sembradora espiral

Para la realización de los análisis, se partió de 10 g de muestra que siempre se diluyeron en 90 ml del medio PCA para cada análisis, obteniendo así una dilución 1:10 de la muestra. Partiendo de la dilución madre, se realizaron diluciones sucesivas, y se sembraron en placas de Petri, en duplicado. Se determinó la presencia y número de *aerobios mesófilos* y *aerobios psicrotrofos*.

iii. Análisis estadísticos

Para el análisis estadístico y procesamiento de los datos se utilizó el programa estadístico Statgraphics (Centurion X64). Se calcularon los estadísticos descriptivos (media y desviación estándar), se realizó un análisis de la varianza y las medias se compararon

mediante un test de Tukey. Los parámetros analizados se realizaron con un nivel de confianza del 95%.

3.3. Diseño experimental

La metodología de este trabajo consistió en analizar en primer lugar trozos de merluza fresca al día 0 (t_0) y, en segundo lugar, analizar trozos de merluza con diferentes días de conservación a temperaturas de refrigeración, día 1 y 2 (t_1 y t_2). Para alcanzar los objetivos presentados anteriormente, de cada muestra se realizaran tres replicas por muestra y se aplicarían los tres métodos de siembra, para cada una de las réplicas.

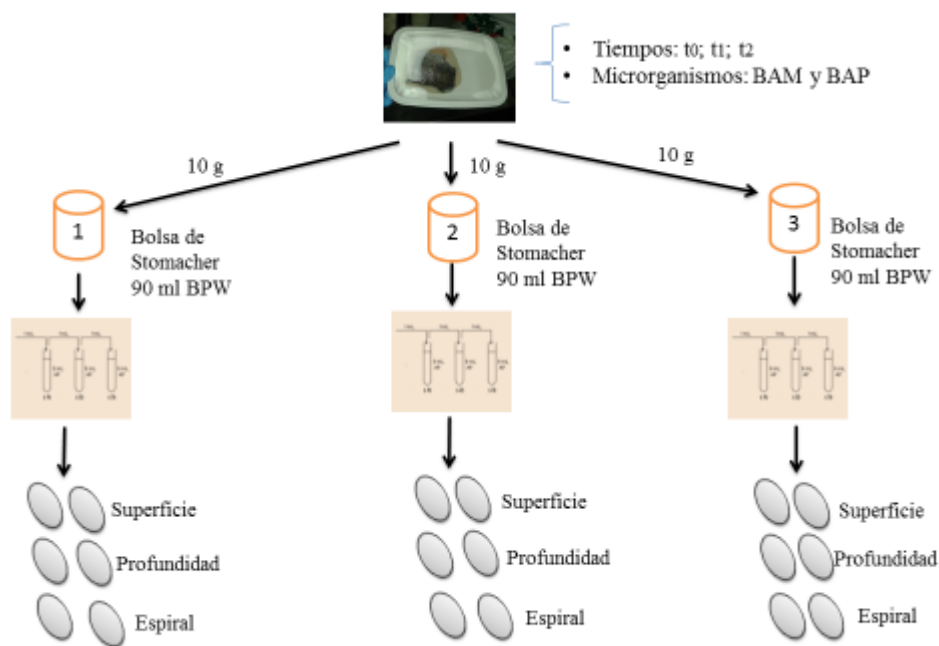


Fig. 12. Diseño experimental

Tabla 24. Condiciones aplicadas

Condiciones	Pescado	Tiempo
Refrigeración (8°C)	Merluza fresca	t_0 (inicial)
Refrigeración (8°C)	Merluza Envasada	t_1 (24h)
Refrigeración (8°C)	Merluza Envasada	t_2 (48h)

4. Resultados y Discusión

4.1. Repetibilidad de los análisis (dentro de cada metodos de siembra)

Los análisis estadísticas, muestran que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) de recuentos de bacterias *aerobias mesofilas* y *psicrotrofos* entre las réplicas de las muestras analizadas, tanto en siembra en superficie, siembra en profundidad y siembra en espiral. Se puede observar en las gráficas (Figura 12, 13 y 14), que hubo repetibilidad durante los análisis entre los tres métodos aplicados, en esto caso se consideraron la media de las placas de todas diluciones sembradas. Los promedios y las desviación estándar de los resultados obtenidos entre la réplica aplicando las tres diferentes técnicas de recuento se presentan en las tablas 25 y 26.

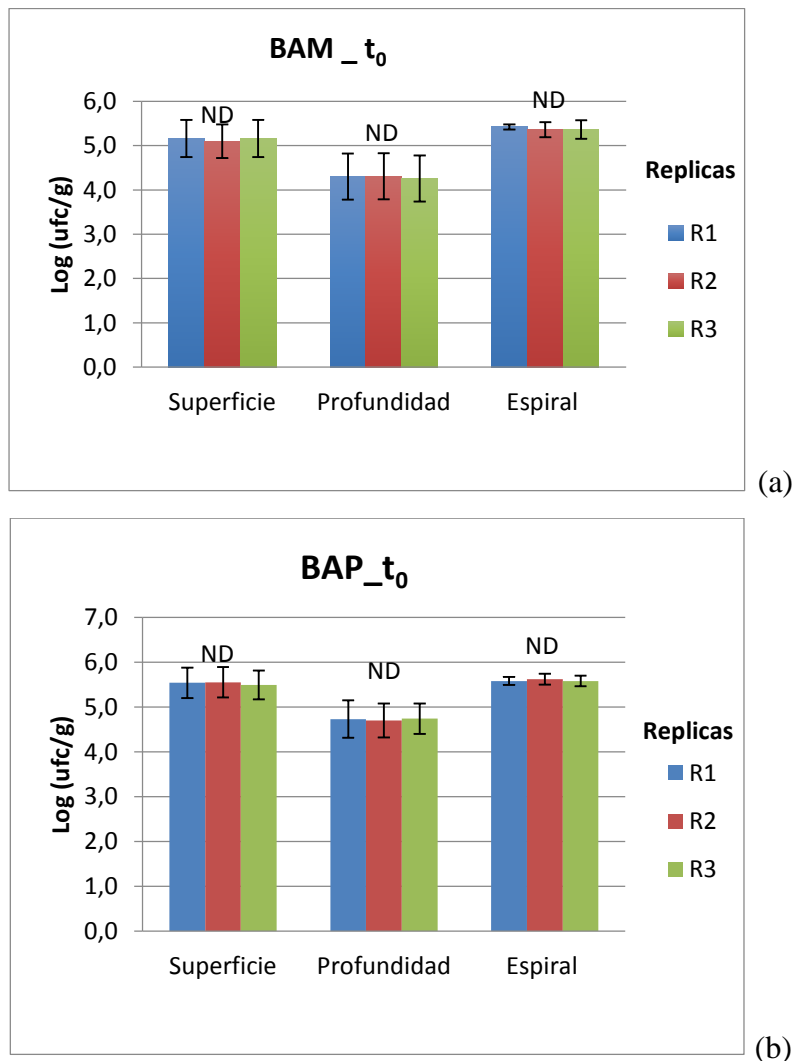


Fig 13. Grafico (a) y (b) muestra que no hay diferencias significativas (ND) entre las réplicas analizadas al día 0 (t_0). BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

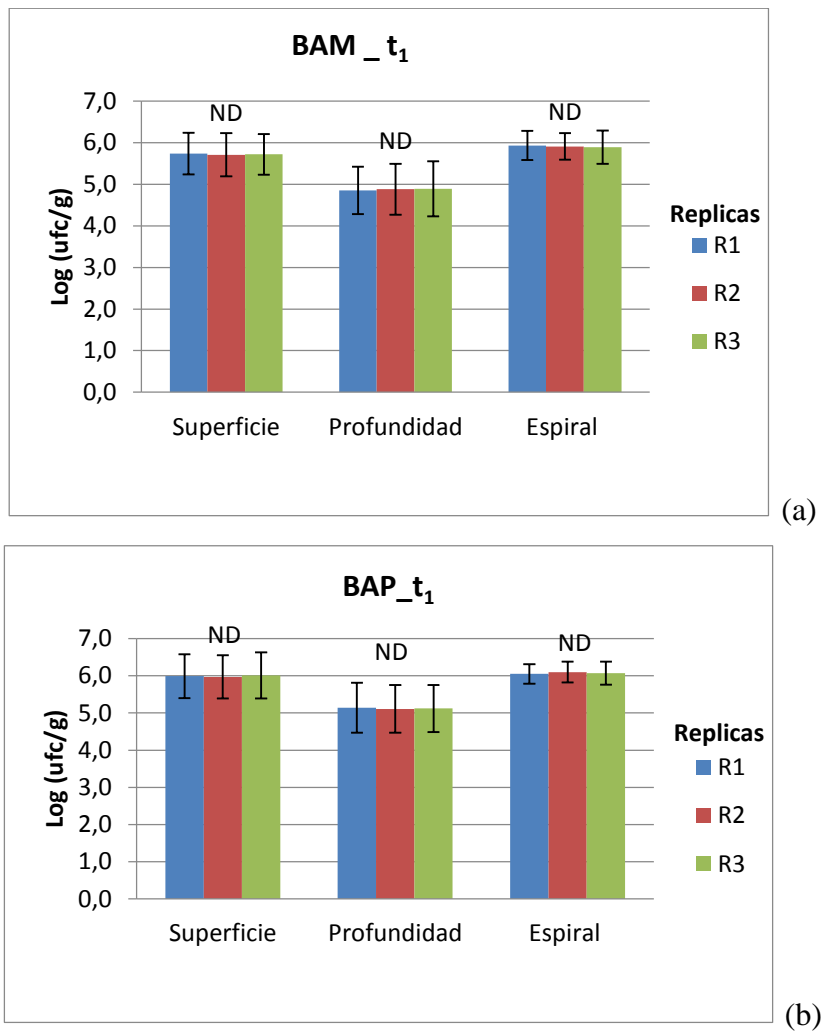


Fig 14. Grafico (a) y (b) muestra que no hay diferencias significativas (ND) entre las réplicas analizadas al día 1 (t₁). BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

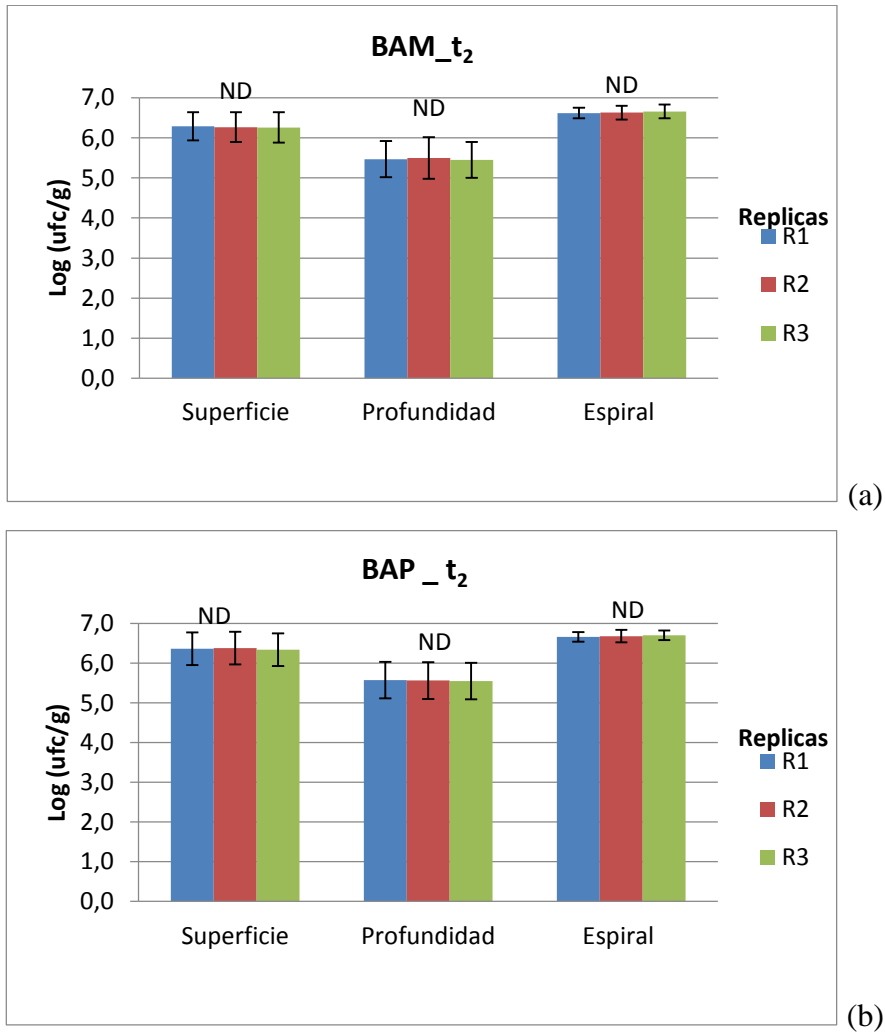


Fig 15. Grafico (a) y (b) muestra que no hay diferencias significativas (ND) entre las réplicas analizadas al día 2 (t₂). BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

4.2.Comparación de técnicas de siembra

En Figura 16, se puede observar que hubo bajos recuentos de la carga microbiana para la siembra en profundidad, mientras que las siembras en superficie los recuentos fueran mayores para los tres días de análisis. Se realizó una comparación entre las técnicas para los tres recuentos por la prueba de ANOVA, calculando el valor p, a partir de la cual se concluyó que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las técnicas para cada muestra. La siembra en superficie y siembra en espiral originaban resultados homogéneos entre sí, la siembra en profundidad originaba resultados significativamente menores. Se puede decir que la técnica de siembra tiene efecto sobre los recuentos tanto de *aerobios mesofilos* como de *aerobios psicrotrofos*.

Esto se puede atribuir a la anaerobiosis parcial que posiblemente sucede en la siembra en profundidad, y considerando que muestra podía contener bacterias aerobias estrictas que pondría representar una proporción significativa de la flora total, como por ejemplo *Pseudomonas*.

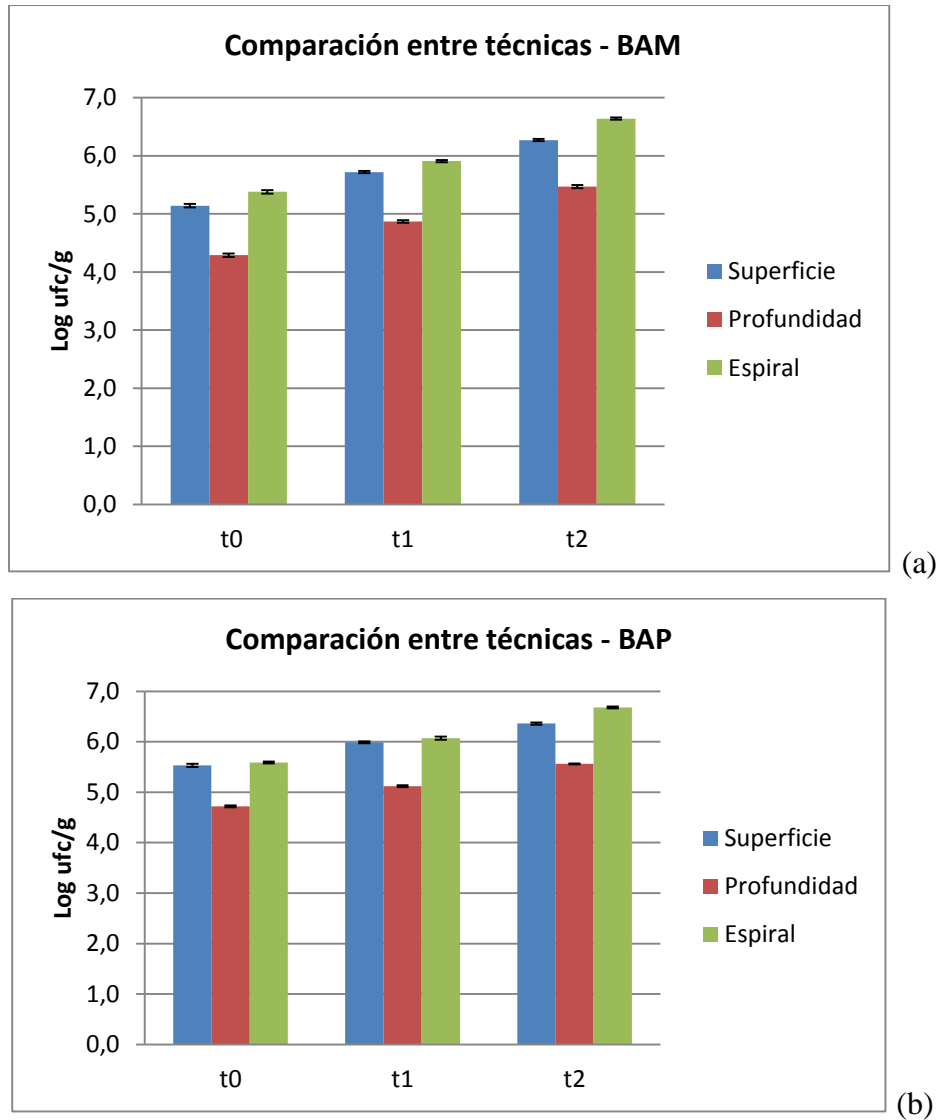


Fig 16. Gráficos a y b muestran las diferencias significativas entre los métodos de siembra. BAM: bacterias aerobias mesofilas. BAP: bacterias aerobias psicrotrofas

Como cabe esperar, el aumento en el tiempo de almacenamiento produjo proliferaciones significativas ($p < 0,05$) entre los tres días de análisis atribuyendo esto a la diferencia entre los días de conservación de la merluza, como se puede observar en las graficas (Figura 17 y 18).

i. Bacterias aerobias mesófilas

La evaluación del recuento superficial de microorganismos, se observa en las muestras, un aumento a medida que el tiempo de almacenamiento progresó (día 3). Los valores de aerobios mesófilos oscilaron entre 4,29 a 6,64 log₁₀ ufc/g considerando el intervalo entre las tres técnicas usados en los análisis.

Tabla 25 .Recuentos* de *aerobios mesófilos* en muestras de merluza

Métodos	BAM		
	t ₀	t ₁	t ₂
Superficie	5,14±0,03 ^{Aa}	5,72±0,02 ^{Ab}	6,27±0,02 ^{Ac}
Profundidad	4,29±0,03 ^{Ba}	4,87±0,02 ^{Bb}	5,47±0,03 ^{Bc}
Espiral	5,38±0,03 ^{Aa}	5,91±0,02 ^{Ab}	6,64±0,02 ^{Ac}

*Expresado en Log₁₀ ufc/g. BAM: Bacterias aerobias mesófilas. a, b, c: Letras minúsculas en la misma fila y mayúsculas en la misma columna representan diferencias significativas (p <0,05) entre las muestras y los métodos de acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de Tukey

La muestra al tercer día de análisis excedió el límite recomendado 5 log₁₀ ufc / cm² para BAM y BAP en el pescado (ICMSF, 2002)^[77]. La recopilación de normas microbiológicas españolas especifica límites máximos de aerobios mesófilos 10⁶ ufc/g. Aunque los recuentos de BAM no alcanzaron niveles de 10⁸ ufc / g, que se considera que se requiere para el deterioro del pescado almacenado aeróbicamente (Gram y Huss, 1996)^[78].

Los datos obtenidos están por encima de los encontrados por Sinde, et al. (1998)^[79], siendo que ellos analizaran palitos de merluza fresca mantenidos en congelación a -20 °C y obtuvieran < 1 x 10⁴ ufc /g, y la muestras en este presente trabajo se mantuvieron a temperaturas de refrigeración (8 °C). Fernandez-Saiz et al., (2013)^[80], obtuvieron recuentos de bacterias *aerobias mesófilas* iniciales de merluza indetectables, pero los recuentos excedieron 7 log ufc / g en el día 10 en merluza envasada en aire mantenidos a 5 °C. En este presente trabajo los recuentos de *aerobios mesófilos* ya se encontraban próximos a los reportados por Fernandez-Saiz et al., solo con tres días de conservación. Rodríguez et al., (2004)^[81] encontraron valores bajos de *aerobios mesófilos* en merluza refrigerada y almacenada en suspensión de hielo, 1.13 log ufc/g con día 12 de conservación, consideran el almacenamiento de la merluza en la suspensión provocó una reducción significativa.

ii. Bacterias aerobias psicotrofas

Las bacterias aerobias psicotrofas también han aumentado significativamente con el tiempo de almacenamiento, los valores oscilaron entre 4,72 a 6,68 log₁₀ ufc/g entre las muestras, considerando el intervalo entre las tres técnicas usados en los análisis, esto podría estar asociado a la clase de manipulación durante el proceso de recuperación de materia prima.

Tabla 26 .Recuentos* de *aerobios psicotrofos* en muestras de merluza

Métodos	BAP		
	t ₀	t ₁	t ₂
Superficie	5,53±0,03 ^{Aa}	5,99±0,02 ^{Aab}	6,36±0,02 ^{Ab}
Profundidad	4,72±0,02 ^{Ba}	5,12±0,02 ^{Bab}	5,56±0,01 ^{Bb}
Espiral	5,59±0,02 ^{Aa}	6,07±0,03 ^{Ab}	6,68±0,02 ^{Ac}

*Expresado en Log₁₀ ufc/g. BAM: Bacterias aerobias mesofilas. BAP: Bacterias aerobias psicotrofas. a, b, c: Letras minúsculas en la misma fila y letras mayúsculas en la misma columna representan diferencias significativas (p <0,05) entre las muestras y los métodos de acuerdo a un análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de comparación múltiple de Tukey

Los valores fueran similares a los encontrados por Baixas-Nogueras, et al., (2006)^[82] en muestras de merluza refrigeradas y muestras descongeladas - congeladas, estos aumentaron gradualmente hasta un valor medio de 6,71 a 7,36 log ufc/g con 3 días de almacenamiento. Estos autores encuentran valores similares de bacterias mesófilas totales en el día 0, en merluza fresca y en la merluza descongelada congelada, estos obtuvieran 7,08 a 7,11 log ufc g⁻¹. Mello et al., (2012)^[83] obtuvieron resultados de BAM y BAP relativamente altos para muestras de tilapia congelado desde 2,3 hasta 9,99 Log₁₀ UFC / g.

Kirschnik y Macedo-Viegas (2009)^[84] observaron un recuento bajo de BAP en carne separada mecánicamente de pescado que fue sometido a un lavado, lo que sugiere que el proceso de lavado puede tener un efecto beneficioso en la reducción de los microorganismos. Zambuchini et al., (2007)^[85] refieren que las BAP en pescado tendía a aumentar a medida que el tiempo de almacenamiento aumenta. Estos autores estudiaran el almacenamiento refrigerado (0 ° C) de pecado, las BAP en muestras superficiales de pescado osciló se muestrearon relativamente altas.

5. Conclusión

Sobre la base de los resultados obtenidos en este trabajo, puede concluir que:

1. La técnica de siembra en espiral proporciona resultados equivalentes a los obtenidos por el método tradicional – siembra en superficie, los datos obtenidos en siembra en profundidad son significativamente inferiores. Por tanto consideramos que las técnicas de análisis tienen un efecto sobre la cuantificación de los microorganismos aerobios en los alimentos, visto que hubo mayor crecimiento microbiano en las siembras en superficie y significativamente menor crecimiento microbiano en la siembra en profundidad, creemos que hubo menos disponibilidad de oxígeno en la siembra en profundidad lo que dificultó en el desarrollo de los microorganismos.
2. Dado que no hubo diferencias significativas entre las réplicas analizadas en cada uno de los métodos de siembra aplicados, se demuestra una buena aplicación de la metodología.
3. El tiempo de almacenamiento de la merluza bajo temperaturas de refrigeración influyó en la calidad microbiológica de la merluza, visto que hubo cambios significativos en la carga microbiana hasta el tercer día de análisis, obteniendo valores altos de recuentos en todos los métodos de siembra aplicados. Tomado como referencias límites máximos de aerobios mesofilos 10^6 ufc/g especificados por la recopilación de normas microbiológicas españolas para productos de pesca frescos, refrigerados o congelados, los resultados obtenidos permiten deducir la calidad microbiológica se podría considerar aceptable hasta el día 3.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Codex Alimentarios, 1994, Carne y productos cárnicos: Códigos de prácticas y directrices para productos cárnicos elaborados, CAC/RCP 13 – 1976, Rev 1, FAO/OMS, v 10. Roma, p. 33.
- [2] Fornias, O. Venegas; D., Valladares C., 1999, Clasificación de los productos cárnicos, Rev Cubana Aliment Nytr, v 13, n 1, Cuba, p. 65
- [3] Jay J. M., 2005. Modern Food Microbiology. 7^a ed. Springer, New York, p 63.
- [4] Gallina, S. ; Manila, B. D. ; Ru, G. ; Maurella, C. ; Barzanti, P. ; Baioni; E. ; Virgilio, S. ; Mioni, R. ; Lanni, L. ; Migliazzo, A. ; Losio, M. N. ; Bove, D. , Scuota, S. , Goffredo, E. ; Decastelli, L.; 2014, Microbiological recovery from bovine, swine, equine and ovine carcasses: Comparison of excision, sponge and swab sampling methods, Food Control, Italy, p. 922.
- [5] Hyun-Joo, K.; Jung, S. ; Yong, H. ; Sik Bae, Y. ; Kang, S. N.; Kim Il. S. ; Jo, C.; 2014, Improvement of microbiological safety and sensorial quality of pork jerk by electron beam irradiation, by addition of onion peel extract, and barbecue flavor, Rev Elsevier: Radiation Physics and Chemistry, Republic of Koren, p 22 – 23.
- [6] Rojas – Herrera, R. A.; Gonzalez – Flores, T, 2006, Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, Artículo de revisión biológica molecular, vol 31, n° 2, México, p.71
- [7] Yonairo, B. H.; Leonel, J., Leonel R., 2015, Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenicidad muy particular, Revista electrónica de veterinaria, v 16, n 1, pp. 38 – 55.
- [8] Tirado, J., Paredes D., Velazquez G.; J. Torres A.; 2005, Microbial growth in refrigerated meat products, Ciencia y Tecnología Alimentaria, v 5, n 1, México, pp. 67 – 69.

- [9] Penteado, F. R., Esmerino, L. A., 2011, Evaluation of microbiological quality of chicken sold in the city Ponta Grossa – Parana, *Revista Publ Biologicas*, col 17, n° 1, Ponta Grossa, pp. 38 – 40
- [10] Adriana, G. B.; Adriana, R. G.; Juan D. V., 2011, Comparative study on the microorganisms present in ground meat in supermarkets and local markets in Ecatepec. *Rev. Nacameh*, v 5, n 1, México, pp. 2 – 3.
- [11] Esmer, O. K., Irkin, R., Degirmencioglu, N., Degirmencioglu, A.; 2010, The effects of modified atmosphere gas composition on microbiological criteria, color and oxidation values of minced beef meat, *Meat Science – Elsevier*, v 88, Turkey, pp. 221 – 222
- [12] Andritsos, N. D., Mataragas, M., Mavrou, E. , Stamatiou, A. , Eleftherios, H. ; 2012, The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece, *Meat Science – Elsevier*, v 91, Greece, pp. 486 – 487
- [13] Ramirez, J. A., Orozco I., 2013, Calidad microbiológica de productos cárnicos analizados en Laboratorio de Microbiología de alimentos de la Fundacion CIEPE, Vnuzuela: periodo 2008-2012, *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, v 4, n 1, Venezuela, pp.136 – 137
- [14] Mead, G.C. 2007, *Microbiological analysis of red meat, poultry and eggs-* Woodhead Publishing Ltd
- [15] Sofos, J. 2005, *Improving the safety of fresh meat -* Woodhead Publishing Ltd
- [16] Delgado, E.; Patricia, K., 2012, Análisis microbiológico para control cualitativo de carne ovina y caprina, seca y salada, Teses de mestrado. *Tecnología da ciencia Animal, Bragança*, pp.11 – 17
- [17] Oliveira, A. F; , Rodrigues, S. L.; A. Pereira, E.; Teixeira, A.; 2013, Caracterización de la producción de mantas de carne salada y seca de ovinos y caprinos en ambiente preindustrial, *Asociación Interprofesional para el desarrollo Agrario, Portugal*, pp. 709 – 711

- [18] Signorini, M., 2007, Microbiología de carnes envasadas al vacío y la biopreservación como medio para prolongar la vida de anaquel. Rev. Nacameh, vol 1, n° 1, Argentina, pp. 27 – 36.
- [19] Lightfoot, N. F., y Maier, E. A., 2002, Análisis microbiológico de alimentos y agua, Zaragoza, España, pp 15- 36.
- [20] Sekwati-Monang, B., Ganzle, M. G., 2011, Microbiological and chemical characterisation of ring, a sorghum-based sourdough product from Botswana, International Journal of Food Microbiology, 150, pp 115-121.
- [21] Osorio -Cadavid, E.; Chaves – López, C.; 2008, Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage, Food Microbiology, 25, pp 771-77.
- [22] Gambelli, L; Manzi, P; Panfili, G., Vivanti, V., Pizzoferrato, L.; 1999, Constituents of nutritional relevance in fermented milk products commercialised in Italy, Food Chemistry, 66, pp 353-358
- [23] Safaei, H. G.; Jalali, M.; Jalali, M., Hosseini, A, Narimani, T., Sharifzadeh, A., Raheimi, E., 2011, The prevalence of bacterial contamination of table eggs from retail markets by *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in Shahrekord, Iran, Jundishapur journal Microbiology, v. 4, n.4, pp. 249 – 253
- [24] Shiby, V. K.; Mishra, H. N., 2013, Fermented milks and milk products as functional foods: A review, Food science and nutrition, 53, India, pp. 482-496.
- [25] Fuentes-Coto, G.; Rui-Romero, R. A., 2013, Microbiological analysis of organic milk: Desirable attributes for its transformation, ASyD, v. 10, Mexico, pp. 419-432
- [26] Condron, R.; Farrokh, C.; Jordan, K.; McClure, P., Ross, T., Cerf, O.; 2014, Guidelines for experimental design protocol and validation procedure for the measurement of heat resistance of microorganism in milk, International Journal of Food Microbiology 192, pp.20-25
- [27] Norma del Codex para Leches Fermentadas, CODEX STAN 243-2003, pp 1-3.

- [28] Bokulich, N. A., Amiranashvili, L, Chitchyan, K., Ghazanchyan, N., Darbinyan K., Gagelidze, N., Sadunishvili, T., Goginyan,, V., Kvesitadze, G., Torok, T.; 2015, Microbial biogeography of the transnational fermented milk matsoni, Food microbiology, 50, pp. 12-19
- [29] Kalmus, P.; Kramarenko, T.; 2014, Quality of raw milk intended for direct consumption in Estonia, Food Control, 51, pp. 135-139.
- [30] Bokulich, N.A., Mills, D.A., 2013. Facility-specific “house” microbiome drives microbial landscapes of artisan cheesemaking plants. Appl. Environ. Microbiol. 79, pp 5214-5223.
- [31] Polychroniadou, A, 2001. Eyes in cheese: a concise review. Milchwissenschaft, v.56, n 2, pp. 74 - 77.
- [32] Mullan, M, 2000, Causes and control of early gas production in Cheddar cheese. International Journal of Dairy Technology, v. 53, n. 2, pp. 63 – 38.
- [33] Márquez, J.G.; García, C.E. 2007, Efecto de la nisina sobre la microflora patógena del queso blanco artesanal tipo "telita" elaborado en una quesera de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.27, n. 2, pp. 108-111
- [34] Norma del Codex para la Mantequilla (Manteca), Codex Stan 279-1971, pp 1-2
- [35] Molina, J. S.; 1977, Microbiological quality of Spanish butter, Archivos de zootenia, v. 26, n. 103, España, p. 221
- [36] Nespolo, N. M.; Martineli, T. M.; y Rossi Jr, O. D.; 2012; Microbiological quality of salmon (*Salmo salar*) sold in cites of the stata of Sao Paulo, Brazil, Brazilian Journal of Microbiology, pp. 1393-1400.
- [37] Uddin, Gazi M. N.; Larsen, M. H., 2012, Bacterial flora and antimicrobial resistance in raw frozen culture seafood imported to Denmark, Journal of Food Protectiob, v. 76, n 3, pp.490-499
- [38] Connell, J. J., 1995, Control of fish quality, 4^a ed., Oxford: Fishing News Books Limited, pp. 435-439

- [39] Ruggirello, M.; Dolci, P.; Cocolin, L., 2014, Detection and viability of *Lactococcus lactis* throughout cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, pp. 1-14.
- [40] FAO/WHO. (1991). Report on protein quality evaluation (paper no. 51). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- [41] Instituto de Estudios del Huevo, 2006, Seguridad alimentaria en huevos y ovoproductos, 2ª ed. 30 – 70.
- [42] Poza, M. M. F., Galdón, J. G., et al., 2004, INOVO - Asociación Española de industrias de ovoproductos, España, pp. 7 – 30
- [43] Arias C. R., Burns J. K., Friedrich LM, Goodrich RM, Parish ME, 2002, Yeasts species associated with orange juice: evaluation of different identification methods. *Appl Environ Microbiol*; 68: 19, pp. 55-61.
- [44] Rivoal, K. ; Quéguiner, S.; Boscher, E.; Bougeard, S.; Ermel, G., Salvat, G. , Federighi, M. ; Jugiau, F.; Protais, J.; 2010, Detection of *Listeria monocytogenes* in raw and pasteurized liquid whole eggs and characterization by PFGE, *International Journal of Food Microbiology*, 138, pp 56-62.
- [45] Geveke, D. J., 2008, UV inactivation of *E. coli* in liquid egg white. *Food Bioprocess Technology*, 1, pp. 201–206
- [46] Souza, P. M.; Muller, A.; Fernández, A.; Stahl, M.; 2013, Microbiological efficacy in liquid egg products of a UV-C treatment in a coiled reactor, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 21, pp 90-98.
- [47] Alonso-Urmeneta, B., 2003, Manual práctico de microbiología, Editorial Masson, S. A, 2º ed, España – Barcelona, 51 - 54 pag.
- [48] Yousef, Ahmed E., Carlstrom, C., 2006, Microbiología de los alimentos: Manual de Laboratorio, Editorial Acribia, S.A, España, 45. 85 pag.
- [49] Adams, M. R., Moss, M. O., 1997, Microbiología de los alimentos, Editorial Acribia, S. A, España, 141 – 147 pag.

- [50] ICMSF, 1986, *Microorganisms in foods: Sampling for microbiological analysis- Principles and specific applications*, 2^a ed v. 2, Blackwell scientific publications, Oxford, p. 26-32
- [51] Anonymous. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, 1977, Changes in methods: spiral plate method for bacterial count. Official first action (Applicable to foods and cosmetics) Methods No 46.C10-46.C16, pp 93-494.
- [52] Gurler, Z.; Pamuk, S.; Yildirim, Y.; Ertas, N.; 2014, The microbiological quality of ready-to- est salads in Turkey: A focus on *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*, *International Journal of Food Microbiology*, 196, pp. 79-83.
- [53] Salmieri, S.; Islam, F.; Khan, R. A. ; Hossain, F. M. , Ibrahim, H. M. M. , Miao, C. , Hamad, W. Y. , Lacroix, M., 2014, Antimicrobial nanocomposite films made of poly (latic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications-part B: effect of oregano essential oil release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in mixed vegetables, *Cellulose*, 21, pp. 4271-4285.
- [54] Wood, J. L., Chen, J. C., 2014, Microbiological survey of locally grown lettuce sold at farmers, markets in Vancouver, British Columbia, *Journal of Food Protection*, v. 78, n. 1, pp 203-208.
- [55] Abadias, M., Usall, J., et al., 2008. Microbiological quality of fresh minimally processed fruit, vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int. J. Food Microbiol*, v. 123, n. 1-2, pp. 121–129
- [56] Avila-Queada, G.; Sánchez, E., Anguera, M., Solsona, C., Viñas, I.; 2008, Diagnosis of the microbiological quality of fruits and vegetables in Chihuahua, Mexico, *YTON*, 77, pp. 129-136.
- [57] Rizzello, C. G., Filannino, P., Cagno; R. D. , Calasso, M.; Gobbetti, M.; 2014, Quorum-Sensing Regulation of Constitutive Plantaricin by *Lactobacillus plantarum* Strains under a Model System for Vegetables and Fruits, *Applied and Environmental microbiology*, v. 80, n. 2, pp 777-787.
- [58] Corredor, Y. R., Mercado, M. M., 1994, Incidencia de microorganismos mesofilos en la producción del agua de bebida envasada, *Biomedica*, 14, pp. 140-145.

- [59] International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 1998, Microorganisms in Food. Vol. 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic & Professional, London, p. 418- 440.
- [60] Pascual, R., 1989, Microbiología alimentaria. Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Ministerio de Sanidad y Consumo. Instituto de la Salud Carlos III. España, Madrid, pp230-232.
- [61] Mirelis B, Coll P, López P. 1986, Métodos de aislamiento y técnicas de identificación convencionales de las enterobacterias, Laboratorio, pp.233-245.
- [62] Frazier W, Westhoff D., 2003, Microbiología de los alimentos. 3ª ed. España: Edit. Acribia, S.A., PP 125-128.
- [63] Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 1999. CDC/NIH. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 4ª ed., Washington.
- [64] Schoolnik, G. K. 1993, PCR detection of *Shigella* species and enteroinvasive *Escherichia coli*. En: Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications. ASM Press, Washington; pp. 277-281.
- [65] Migazaki L.M., 2000, Roll of exotoxin A in including severe *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *J-Med- Microbiol*, v. 43, n. 3, pp. 169-75.
- [66] Jay J. M. 2009, Microbiología Moderna de los alimentos. 5ª ed. España: Edit. Acribia, S.A., pp 126-128.
- [67] Dupont H. 1995, *Shigella* species (Bacillary dysentery). En: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Principles and practice of Infectious Diseases. 4ª ed. Churchill Livingstone, New York, pp 2033-2039
- [68] Ramirez, L. C. C.; Ospina, M. A. A., 2011, Estudio bacteriológico de la calidad del pescado fresco, Bagre (*Pseudoplatystoma sp.*) y Mojarra Roja (*Oreochromis sp.*) comercializado en el municipio de el Colegio, Condiamarca (Colombia), Publicación científica en ciencias biomédicas, v. 9, n. 15, pp. 149-157.

- [69] Arashisar, S., Hisar, O., Kaya, M., y Yanik, T., 2004, Effects of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology*, 97, pp. 209-214.
- [70] Martinez, Y. B.; Iquierdo, P., 1999, Evaluación microbiológica y características químicas del pescado salado consumido en la ciudad de Maracaibo, Venezuela, *Rev. Científica FCV-Luz*, v. 9, n 2, pp. 134-137.
- [71] Grau, Crucita; Elgueabal, Luis; 2003, Evaluation of Halophile flora spoiling dry-salted fish processed in Sucre state, *Rev. científica, FCV-Luz*, v. 13, n. 4, pp 319-325.
- [72] Rizo, Arantxa; Mañes, Verónica; 2015, Physicochemical and microbial changes during storage of smoke-flavoured salmon obtained by a new method, *Food Control*, 56, pp 195-201.
- [73] Salinas, A: P. A., Valles, V. M. N., 2013, Sulphite-reducing *Clostridium perfringens* in hamburgers sold at markets in the city of Trujillo, Peru, *Rebiol*, v. 33, n. 1, pp 1-5.
- [74] Jay JM. 2009. *Microbiología Moderna de los alimentos*. 5ª ed. España: Edit. Acribia, S.A. pp. 125-146.
- [75] Castañeda, P. E., Aparicio, E. D., 2000, Identification and typing of *Yersinia enterocolitica* Biotypes and serotypes isolated, *Rev. Saúde Púbilca*, v. 35, n. 4, pp 380- 384.
- [76] Zink D. L., 1982, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-likes species: their pathogenicity and significance in foods. *Journal Food Safety*, 4, pp 223-242.
- [77] ICMSF. (2002). *International commission on microbiological specifications for foods. Microorganisms in foods 7. Microbiological testing in food safety management*. London: Kluwer Academic/Plenum Publishers. Springer.
- [78] Gram, L.; Huss, H. H., 1996, Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology*, v. 33, n., pp. 121-137.

- [79] Sinde, E., Gallardo, C. S., Saa, A., Castillo, A., Rodríguez, L. A., 1998, Bacteriological study of frozen hake sticks, *Ciencia Tecnologia Alimentos*, v. 2, n. 1, pp 20-23.
- [80] Fernandez-Sai, P.; Sanchez, G.; Soler, C., Lagaron, J.M., Ocio, M.J. , 2012, Chitosan films for the microbiological preservation of refrigerated sole and hake fillets, *Food Control*, 34, pp. 61-68.
- [81] Rodríguez, O.; Losada, V.; Aubourg, S. P , Barros-Velázquez, J., 2004, Enhanced shelf life of chilled European hake (*Merluccius merluccius*) stored in slurry ice as determined by sensory and assessment of microbiological activity, *Food Research International*, 37, pp 749-757.
- [82] Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M. T., Vidal-Carou M. C., 2006, Effects of previous frozen storage on chemical, microbiological and sensory changes during chilled storage of Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) after thawing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, pp. 6504–6510.
- [83] Mello, S. C. R. P., Freitas, M. Q., 2012, Development and bacteriological, chemical and sensory characterization of fishburgers made of Tilapia minced meat and surimi, *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 64, n, 5, pp 1389 – 1397.
- [84] Kirschnik, P.G.; Macedo-Viegas, E.M., 2009, Efeito da lavagem e da adição de aditivos sobre a estabilidade de carne mecanicamente separada de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) durante estocagem a – 18°C. *Cienc. Tecnol. Alim.*, v.29, pp.1-7,
- [85] Zambuchini, B., Fiorini, D., Verdenelli, M.C. , Orpianesi, C. , Ballini, R. , 2008, Inhibition of microbiological activity during sole (*Sole solea L.*) chilled storage by applying ellangic and ascorbic acids, *Food Science and Techonology*, 41, pp. 1733-1738
- [86] Conselho de Ministros, 2001, Plano de Acção Para a Redução da Pobreza Absoluta, 2001-2005 (PARPA). Documento de Estratégia e Plano de Acção Para a Redução da Pobreza e Promoção do Crescimento Económico). Versão final aprovada pelo Conselho de Ministros, Maputo.

- [87] Valá, S. C., 1998, A Problematização do Alívio à Pobreza em Moçambique. In: Extra, N° 21, pp 6-18.
- [88] Bolnic, B. R, 2002, Crescimento Económico, Instrumento para a Redução da Pobreza em Moçambique: Quadro Analítico para uma Estratégia de Crescimento. In: ROLIM, Gabinete de Estudos do Ministério do Plano e Finanças.
- [89] FAO (2011), Nutrition country profile: Republic of Mozambique.

Legislaciones consultadas

Recopilación de normas microbiológicas y parámetros físico-químicos relacionados,
Enero 2014

Reglamento (CE) nº 1441/2007 de la comisión de 15 de noviembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicados a los productos alimenticios.

Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicados a los productos alimenticios.

ANEXO I

Alimentos	Parámetros										Legislaciones
	Aerobios mesofilos (ufc/g o ml)		Enterobacterias Coliformes (ufc/g o ml)		E. coli (ufc/g o ml)		S.aureus (ufc/g o ml)		Salmonella, Shigella, Mohos, L. monocytogenes (ufc/g o ml)		
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo	
Carne separada mecánicamente	5x10 ⁵	5x10 ⁶			50	500			Salmonella Aus/10g		Reglamento C:E: 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007
Carne picada elaborada por carnicería							10 ²				Como referencia O. 14/1/86 BOE 21/1/86
Carne picada destinada a ser consumida en cruda	5x10 ⁵	5x10 ⁶			50	500			Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g		Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Carne picada de carne de aves de corral destinada a ser consumida cocinada	5x10 ⁵	5x10 ⁶			50	500			Salmonella Aus/25g		Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 y Reglamento 365/2010 D.O.U.E. 29/04/2010
Canales bovinas, ovinas, caprinas y equinas	3,16x10 ³	10 ⁵	3,16x10	3,16x10 ²					Salmonella Ausencia en la zona examinada por canal		Reglamento C:E: 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007
Canales porcinas	10 ⁴	10 ⁵	10 ²	10 ³					Salmonella Ausencia en la zona examinada por canal		Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Canales de pollos de carne y pavos									Salmonella Ausencia en 25g de una muestra mezclada de piel del cuello		Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento 1086/2011 D.O.U.E 28/10/2011
Carne fresca de aves de corral(gallinas, ponedoras, pollos y pavos engorde)									Salmonella enteritidis Salmonella typhimurium Campylobacter termófilo Aus/25g		Reglamento 1086/2011 D.O.U.E 28/10/2011 Recomendación de la comisión D.O.U.E 10/9 1/2004
Carne refrigeradas y congeladas	10 ⁶		Enterobacterias 10 ²		10		10 ²		Ausencia en 25g Clostridium perfringens 10/g		CENAN (1982)
Carne picada a base de carne de especies distintas a las aves de corral destinados a ser	5x10 ⁵	5x10 ⁶			50	500			Salmonella Aus/10g		Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007

consumidos cocinados										
Preparados de carne a base de carne de ave destinados a ser consumidos cocinados (salchichas frescas, longaniza fresca, hamburguesas, etc, de aves de corral)					500	5×10^3			Salmonella Aus/25g	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 y Reglamento 365/2010 D.O.U.E. 29/04/2010
Preparados de carne destinados a ser consumidos en crudo					500	5×10^3			Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Preparados de carne a base de carne de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados (salchicha fresca, longaniza fresca, hamburguesa, butifarra fresca no de ave, lomo adobado pincho moruno)					500	5×10^3			Salmonella Aus/10g	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Productos cármicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de salmonella (Chorizo, salchichas, etc)									Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Productos cármicos hechos a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados									Salmonella Aus/25g	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 y Reglamento 365/2010 D.O.U.E. 29/04/2010
Jamón cocido y fiambre de jamón Paleta cocida y fiambre de paleta Magro de cerdo cocido y fiambre de magro de cerdo			Enterobacterias 10^2				10^2		Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Cl. Sulfito reductores anaerobios esporulados 10^2	Reglamento C.E. 2073/2005 modificado por reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 Como referencia O. 14/1/86 BOE 21/1/86 O. 29/6/83 BOE 5/7/83 R. 26/12/83 BOE 3/1/84 O. 29/6/83 BOE 5/7/83 R. 26/12/83 BOE 3/1/84
Leche cruda de vaca destinada a industria láctea		10^5 (30 °C)								Reglamento CE 853/204 modificado por Reglamento CE 1662/2006 D.O.U.E 18. 11. 2006
Leche cruda de vaca utilizada		10^5 (30 °C)								Reglamento CE 853/204

para preparar productos lácteos									modificado por Reglamento CE 1662/2006 y 1020/2008 D.O.U.E 18. 11. 2006
Leche de vaca tratada térmicamente utilizada para preparar productos lácteos	10 ⁵ (30 °C)								Reglamento CE 853/204 modificado por Reglamento CE 1662/2006 y 1020/2008 D.O.U.E 18. 11. 2006
Leche cruda de otras especies (no vaca) destinada a industria láctea para la elaboración de productos con tratamiento térmico	1,5x10 ⁶ (a 30 °C)								Reglamento CE 853/204 modificado por Reglamento CE 1662/2006
Leche cruda de otras especies (no vaca) para elaboración de productos lácteos sin tratamiento térmico	5x10 ⁵ (a 30 °C)								Reglamento CE 853/204 modificado por Reglamento CE 1662/2006 D.O.U.E 18. 11. 2006
Leche pasteurizada y otros productos lácteos líquidos pasterizados (leche concentrada, condensada, nata pasterizada, etc)			Enterobacterias 10 (al final del proceso de fabricación)					L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento C.E. 2073/2005 22/12/2005 Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 y Reglamento 365/2010 D.O.U.E 29/04/2010
Leche en polvo y suero en polvo			Enterobacterias 10			Estafilococo coagulasa positiva		Salmonella Aus/25g L. monocytogenes 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
						10	100		
Leche esterilizada y UHT	Estabilidad microbiológica tras incubación 30 °C 15 días o 55 °C 7 días (para leche UHT)							L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g (leche esterilizada)	Reglamento 2073/2005 modificado por el 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 Reglamento CE 1662/2006 D.O.U.E 18. 11. 2006 que modifica el Reglamento CE 853/2004 Solamente se refiere a leche UHT
Queso a base de leche cruda						Estafilococo coagulasa positiva		Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Campylobacter termófilo Aus/25g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
						10 ⁴	10 ⁵		

Quesos blandos no maduros hechos a base de leche o suero sometido a pasterización o un tratamiento térmico más fuerte					10 ²	10 ³	10	100	L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Mantequilla a base de leche o Nata pasterizada			Coliformes a 30 °C						Salmonella Aus/25g	Solo referencia el derogado R.D. 1679/1994
			0	10						
Mantequilla de leche higienizada			Ausencia en 0,1g						Ausencia total de gérmenes patógenos Mohos max 10/g Levaduras max 100/g Microorganismos lipoliticos max 10/g	Solo referencia el derogado Orden 7/01/1975
Mantequilla y nata elaborados a base de leche cruda o leche sometida a tratamiento térmico inferior a la pasterización					10	100			Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Nata pasterizada	≤ 1x10 ⁵		Enterobacterias totales ≤ 1x10 ⁴		Ausencia en 1 g		≤ 1x10 ⁴		Salmonella Shigella Aus/25g	Solo referencia el derogado Orden 12/07/1983
Queso a base de leche sometida a un tratamiento térmico inferior a la pasterización					10 ²	10 ³	Estafilococo coagulasa positiva		Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Campylobacter termófilo Aus/25g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
							10 ²	10 ³		
Quesos maduros hechos a base de leche o suero sometidos a pasterización o tratamiento					10 ²	10 ³	Estafilococo coagulasa positiva		L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por

térmico mas fuerte							10 ²	10 ³		Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Nata en polvo	≤ 1x10 ⁵		Enterobacterias totales ≤ 1x10 ⁴		Ausencia en 1 g				Salmonella Shigella Aus/25g	Solo referencia el derogado Orden 12/07/1983
Yogur			Enterobacterias (aplicación al final del proceso de fabricación)						L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g L. bulgaricus y S. thermophilus min 10 ⁷	RD 179/2003 BOE 18/02/03 Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
			< 1	5						
Ovoproductos		10 ⁵	Enterobacterias					Aus/g o ml	Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 Solo referencia el derogado R.D. 1348/1992 BOE 5/12/92
			10	100 o 10 ²						
Productos de la pesca frescos, salprocesados, refrigerados y congelados	10 ⁶		Enterobacterias 10 ³						Salmonella Shigella Aus/25g	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91
Semi conserva de la pesca en vinagre	10 ³		Enterobacterias 10 ²						Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91 Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Anchoas en aceite	10 ⁵		Enterobacterias Aus/g					Aus/g	L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Ausencia C.botulinum	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91 Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007

									D.O.U.E 07/12/2007		
Moluscos bivalvos vivos y equinodermos, tunicados y gasterópodos vivos				230 NPM en 100g de carne y líquido intervalvar				Salmonella Aus/25g L. monocytogenes 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007 Reglamento C.E. 854/2004 D.O.U.E 25/06/2004		
Productos de la pesca seco salados, salazanos y desecados	10 ⁵		Enterobacterias 10 ⁷					Salmonella Shigella Aus/25g L. monocytogenes 100 ufc/g	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91 Reglamento 2073/2005 y 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007		
Productos de la pesca ahumados	10 ⁵	10 ⁶	10 ²	10 ³			10 ¹	2x10	Salmonella Shigella	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91 Reglamento 2073/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007	
									Aus/25g		0
									L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Ausencia C.botulinum		
Salmo, abadejo y otros pescados ahumados Arenque ahumado y anchoas en salmuera Salmon ahumado en filetes envasados a vacío	10 ⁵ o 10 ⁶	10 ⁶ o 10 ⁷	Coliformes		10	100	1 o 10	10 o 100	L. monocytogenes 100 ufc/g	Recomendación de la comisión 2001/337/CE	
			1	100							
Productos de pesca cocidos (no crustáceos ni moluscos cocidos)	10 ⁵		10 ³					10 ²	Salmonella Shigella Aus/25g	Solo referencia el derogado Orden 2/8/1991 BOE 15/08/91	
Frutas y hortalizas troceadas (listos para el consumo)					100	10 ³			Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007	

Zumos de frutas y hortalizas no pasterizados					100	10 ³			Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Reglamento 2073/2005 D.O.U.E 22/12/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Frutas, verduras y hortalizas congeladas	5x10 ³	Coliformes		10	10	10 ²			Salmonella Aus/25g Mohos y levaduras 10 ² Sulfitos reductores 10 Aerobios psicrotrofos 5x10 ⁵	Rivas Palas y cols Alimentaria 1984, n° 149
		10 ²	3x10 ²							
Verduras y hortalizas	5x10 ³	Coliformes		10	10 ²				Salmonella Aus/25g Mohos y levaduras 10-10 ⁴	Rosario Pascual "Microbiologia Alimentaria", 92
		10 ²	10 ⁴							
Pan y panes especiales									L. monocytogenes 100 ufc/g	R.D 1137/84 BOE 19/06/84 RD 285/99 BOE 23/02/99 RD 1202/02 BOE 22/11/02 Reglamento CE 2073/05 y 1441/2007
Patas alimentarias									L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Como referencia el derogado RD 2419/78 BOE 19/05/78 Reglamento 2073/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Pastelería, bollería, confitería y repostería					Aus/g		Aus / 0,1 g		Salmonella Aus en 30g Mohos y levaduras 5x10 ² L. monocytogenes	Como referencia el derogado RD 2419/78 BOE 19/05/78 Reglamento 2073/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007

						Aus/25g o 100 ufc/g	D.O.U.E 07/12/2007
Galletas simples	10 ³	Enterobacterias Aus/g	Aus/g	Aus/g		Salmonella Aus/25g Mohos y levaduras 2x10 ² L. monocytogenes 100 ufc/g	Como referencia el derogado RD 1124/82 BOE 4/06/82 Reglamento 2073/2005 y 1441/2007
Galletas rellenas o cubiertas	10 ⁴	Enterobacterias 10	Aus/g	Aus/g		Salmonella Aus/25g Mohos y levaduras 2x10 ² L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g Bacillus cereus Aus/g	Como referencia el derogado RD 1124/82 BOE 4/6/782 Reglamento 2073/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007
Galletas comestibles	10 ³ o 5x10 ³	Enterobacterias Aus/g Coliformes 0 ufc/g a 30 °C 0 ufc/10g a 45°C		0		Cl. Perfringens Aus/g Aerobios sulfitos reductores 10 ufc/g Salmonella Aus/25g L. monocytogenes Aus/25g o 100 ufc/g	Como referencia el derogado O 12/83/84 BOE 17/03/84 Decision Comision DOCE 12/11/99 Reglamento 2073/2005 modificado por Reglamento C.E. 1441/2007 D.O.U.E 07/12/2007

Fuente: Recopilación de normas microbiológicas y parámetros físicos – químicos relacionados

