



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA  
**RAFAEL NÚÑEZ**  
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

---

# GUÍA DE LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS

## VI SEMESTRE

Elincer Elles Navarro Bacteriólogo  
Máster en Gestión Alimentaria  
Esp. en aseguramiento de la calidad microbiológica de los  
alimentos

---

Facultad Ciencias de la salud  
Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**  
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación  
2018  
Hecho en Colombia

**Rector**  
**Miguel Ángel Henríquez López**

**Vicerrector General**  
**Miguel Henríquez Emiliani**

**Vicerrectora Académica**  
**Patricia De Moya Carazo**

**Vicerrector Administrativo y Financiero**  
**Nicolás Arrázola Merlano**

**Directora Institucional de la Calidad**  
**Rosario López Guerrero**

**Directora de Investigación**  
**Judith Herrera Hernández**

**Directora Programa de Bacteriología**  
**Rosana De la Torre Barboza**

**Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda- Cartagena**  
**Luis Fernando Rodríguez L.**

**Revisión Técnica disciplinar**  
**Elayne Flórez Julio**  
**Eliana Buelvas Pereira**

**Revisión y Corrección de Estilo**  
**Zarina Durango Herazo**



**Autor**

**Elincer Elles Navarro**

**TABLA DE CONTENIDO**

	<b>Pag.</b>
PRESENTACIÓN	6
NORMAS GENERALES PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS	8
PLAN DE TRABAJO	9
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	10
CAPITULO 1. ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO Y ORGANOLÉPTICO DE AGUAS Y ALIMENTO	11
Práctico No. 1: Determinación de la humedad en los alimentos	11
Práctica No. 2: Determinación de pH en los alimentos	14
Práctica No. 3: Determinación acidez titulable en los alimentos	17
Práctica No. 4: Determinación de Grados Brix en los alimentos	21
Práctica No. 5: Análisis fisicoquímico y organoléptico de productos lácteos	25
Práctica No. 6: Análisis fisicoquímico de aguas	31
CAPITULO II.: TÉCNICAS DE DILUCIÓN, PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y RECuento MICROBIOLÓGICO	35
Práctica No. 7: Cuantificación de microorganismos por el método de recuento en placa	35
Práctica No. 8: Técnica del Número más Probable (NMP)	39
Práctica No. 9: Preparación, Dilución de homogenizados en alimentos y reglas de recuento bacteriano	43
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS	55
Práctica No. 10: Identificación de mesófilos, psicrófilos y termófilos en alimento	55
Práctica No. 11: NMP de coliformes totales y fecales en alimento de origen animal o vegetal	58
Práctica No. 12: Recuento de <i>Saphylococcus aureus</i> coagulasa positiva	62
Práctica No. 13: Investigación de <i>Salmonella</i> en alimentos	66



Práctica No. 14: Investigación de <i>Vibrión Cholerae</i>	69
Práctica No. 15: Recuento de Esporas <i>Clostridium</i> Sulfito – reductor	72
Práctica No. 16: Recuento de <i>Bacillus Cereus</i>	77
Práctica No. 17: Recuento de mohos y levaduras	82
CAPITULO IV: CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS	85
Práctica No. 18: Microbiología de leche y derivados	85
Práctica No. 19: Microbiología de pescados y mariscos	89
Práctica No. 20: Microbiología de frutas y derivados	89
Práctica No. 21: Microbiología de cárnicos	92
Práctica No. 22: Microbiología de cereales y productos de panificación	98
Práctica No. 23: Microbiología de agua potable y bebidas	101
Práctica No. 24: Microbiología de productos a base de huevos	104
CAPITULO V: CONTROL DE CALIDAD A MANIPULADORES, UTENSILIOS SUPERFICIE, AMBIENTE Y EMPAQUES	107
Práctica No. 25: Estudio microbiológico a manipulaores, superficies, utensilios y medio ambiente	107
Práctica No. 26: Determinación de aerobios mesófilos, coliformes totales, E. Coli, hongos y levaduras en empaques.	115
Bibliografía.	



## **TABLA DE ANEXOS**

Figura 1 Campo visual del refractómetro manual	133
Figura 2 Campo visual del refractómetro electrónico con la luz encendida Spectronic	133
Figura 3 Campo visual del refractómetro electrónico Spectronic. Con la luz apagada apreciar las dos escalas de medida	134
Figura 4 Diluciones decimales	134
Figura 5 Siembra en profundidad	135
Figura 6 Siembra en superficie	135
Figura 7 Técnica de NMP para 9 tubos (Muestras puras líquidas)	136
Figura 8 Cuadrícula para el recuento bacteriano en caja Petri	136
Figura 9 Formato de informe	137
Figura 10 Formato de resultados	138



## PRESENTACIÓN

Los alimentos son aquellas sustancias o productos de cualquier naturaleza que, por sus características, aplicaciones, componentes, preparación y estado de conservación son susceptibles de ser habitual e idóneamente utilizados para la normal nutrición humana, como fruitivos o como productos dietéticos en casos especiales de nutrición humana. (Código Alimentario Español)

Los alimentos, en general, constituyen medios adecuados para el crecimiento de los microorganismos que pueden causar su alteración e incluso hacer que sean responsables de infecciones e intoxicaciones. También son susceptibles de sufrir, a lo largo de su producción o proceso tecnológico, contaminación por sustancias químicas, representando un peligro cuando sobrepasan algunos umbrales. Todos estos aspectos determinan la importancia de la calidad higiénica sanitaria de los alimentos.

La calidad de los alimentos está constituida por tres áreas de estudio, estas son calidad microbiológica, calidad físico-química y calidad sensorial. Entre estas áreas la calidad microbiológica reviste un papel fundamental, porque a través de esta se puede estipular la inocuidad de los alimentos, es decir, su capacidad de no producir enfermedad a las personas que lo consumen.

El laboratorio de Microbiología de alimentos es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Para llevar a cabo el análisis microbiológico de los alimentos es obligatorio disponer de un laboratorio especializado donde se manipulen exclusivamente materias primas y aditivos alimentarios, productos procesados, materiales de insumo (envases, empaques) y muestras provenientes de la instalaciones de la empresas de alimentos (manipuladores, superficies y ambiente).



En el laboratorio de Microbiología de Alimentos se debe contar con una dotación mínima de equipos, entre los cuales cabe mencionar incubadoras, autoclave, baños serológicos, microscopios, balanzas, centrifuga, PH metro; con una dotación de medios de cultivo y reactivos, todos los cuales se deben encontrar en óptimas condiciones de uso y con suficiente cantidad de material de vidriería, así mismo debe contar con un sistema de calidad en el cual se contemplen los procedimientos que se realicen en ese lugar.

A través de este manual, los estudiantes obtendrán las herramientas básicas para el procesamiento y análisis microbiológico de muestras de alimentos bajo las normas establecidas para tal efecto. El estudiante logrará hacer la identificación de microorganismos presentes en los alimentos y la búsqueda de microorganismos patógenos de importancia sanitaria como son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* entre otros.



## **NORMAS GENERALES PARA TRABAJAR EN EL LABORATORIO DE BROMATOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**

En el laboratorio de microbiología se trabaja con microorganismos vivos y muestras de agua y alimentos contaminados, algunos de ellos patógenos o potencialmente patógenos. Por lo tanto, debe tenerse gran cuidado y realizar los análisis teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Es imprescindible el uso de bata de laboratorio limpia, mascarillas y guantes.
2. Al iniciar y finalizar prácticas se deben lavar las manos con agua y jabón.
3. El lugar de trabajo debe estar limpio y desinfectado.
4. Manejar los microorganismos siempre alrededor de la llama.
5. Precaución en la manipulación de productos biológicos.
6. Durante la práctica está prohibido comer, beber y fumar.
7. Mantener organizados y apartados libros, carpetas, celulares, o cualquier otro material que no se utilice para la realización de la práctica.
8. Descartar material contaminado en los recipientes adecuados.
9. Mantener la limpieza del Microscopio.



## PLAN DE TRABAJO

- Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de la misma.
- Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también, de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
- Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
- En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
- Revise todos los instrumentos y/o equipos eléctricos utilizados en la práctica.
- Asegúrese de marcar adecuadamente los frascos, tubos, cajas.
- Tome todas las precauciones necesarias (para la homogenización, dilución de los alimentos, siembra e incubación)
- Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
- Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los materiales usados en los sitios destinados para esto. No deje muestras de alimentos en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
- Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.



## **MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES**

Los estudiantes deben llevar:

- Elementos de Bioseguridad: gorro, tapabocas, guantes.
- Guías de laboratorio.
- Muestras de alimentos.
- Marcador de vidrio.
- Asas bacteriológicas.
- Láminas.



# CAPÍTULO I

## ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO Y ORGANOLÉPTICO DE AGUAS Y ALIMENTOS

### PRÁCTICA N° 1

#### DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD EN LOS ALIMENTOS

##### **I. Introducción:**

En términos generales, se entiende por humedad la pérdida de peso que sufre una muestra al ser calentada a la temperatura de ebullición del agua. Algunos productos se descomponen al ser calentados a temperaturas tan altas (por ejemplo, aquellos con un alto contenido en carbohidratos sufren caramelización) y por consiguiente hay que tener cuidado en este tipo de procedimiento.

El contenido de humedad influye en las propiedades físicas de una sustancia: en el peso, la densidad, la viscosidad, el índice de refracción, la conductividad eléctrica y en muchas otras, la cantidad de agua disponible o  $A_w$  presente en los alimentos, es la principal causa de deterioro en los mismos, ya que de la concentración del agua va a depender la flora microbiana que va a proliferar en el alimento. Por consiguiente, el bacteriólogo que se desempeña en el área de los alimentos debe conocer el procedimiento general con los equipos adecuados para su determinación.



## II. Objetivos:

**Objetivo General:** Comprender el procedimiento analítico para la determinación y cálculo del porcentaje de humedad en diferentes tipos de alimentos.

### Objetivos específicos

- Aprender el fundamento de la técnica basado en el empleo de los equipos y elementos necesarios tales como la mufla, desecador y balanza analítica.
- Establecer las diferentes características organolépticas de las muestras de alimento con las cuales va a trabajar.
- Comparar los resultados obtenidos en esta práctica con las normas nacionales o internacionales vigentes para este tipo de productos.

## III. Fundamento:

En este método la muestra se calienta bajo condiciones específicas y la pérdida de peso de la muestra se utiliza para calcular el contenido de humedad de la misma. El método se basa en la determinación gravimétrica de la pérdida de masa de la muestra desecada hasta masa constante en estufa de aire.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
	Pinzas de madera	Mufla
	Vidrio reloj	
	Papel absorbente	
	Marcador vidrio grafico	
	Cronometro	
	Guantes para calor	
	Guantes quirúrgicos	
	Cápsula de porcelana	

## V. Muestra:

Productos de panificación.



## VI. Procedimiento:

1. Pesar la cápsula de porcelana.
2. Introducirla en la mufla a 100°C por 10 minutos.
3. Pesarla nuevamente y anotar peso (de cápsula caliente).
4. Pesar 10 gr. de muestra del alimento dentro de la cápsula.
5. Llevarlos a la mufla previamente calentada a 100°C por 30 minutos.
6. Sacar la cápsula de la mufla, introducirla en el desecador y dejar reposar por 5 minutos.
7. Volver a pesar la capsula y anotar el dato.
8. Introducir de nuevo la cápsula en la mufla por 10 min.
9. Repetir pasó 6.
10. Repetir pasó 7, hasta peso constante.
11. Aplicar las siguientes fórmulas para determinar el % de humedad y la  $A_w$  en la muestra:

$$\% \text{ de humedad} = P_i - P_f \times 10$$

$$A_w = P_i - P_f \times 0.1$$

% de humedad = concentración de agua

$P_i$  = peso cápsula caliente + muestra

$P_f$  = peso cápsula + muestra después de 100°C/30min

10 = constante

$A_w$  = Actividad de Agua

0.1 = Constante

## VII. Taller:

1. Consultar el porcentaje de humedad de acuerdo al producto con el que usted trabajó y clasifíquelo, acuerdo a las normas colombianas.



2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuáles son los análisis organosensoriales, fisicoquímicos y microbiológicos que se realizan a los productos de panificación para evaluar su calidad?
5. ¿Qué otros métodos se pueden utilizar para determinar humedad en alimentos?
6. A qué productos de los debe realizar determinación de humedad según normativa alimentaria.

## PRÁCTICA N° 2

### DETERMINACIÓN DE pH EN LOS ALIMENTOS

#### I. Introducción:

El pH se define como  $-\log [H_3O^+]$  ó  $-\log 1/[H_3O^+]$ . Su determinación y control es de gran importancia en las industrias de alimentos: en la utilización y control de microorganismos y enzimas; en la clarificación y estabilización de jugos de frutas y vegetales y de productos fermentados de frutas y cereales; en la producción de mermeladas, jaleas y cuya textura está determinada por la concentración del ion hidrógeno del gel pectina-azúcar-ácido; en el color y retención del “flavor” de productos de frutas; en la coloración de frutas con colorantes artificiales como eritrosina, etc. Resulta particularmente importante en lo que se refiere a rigurosidad del tratamiento térmico (tiempo y temperatura de procesamiento) en general, la velocidad de destrucción térmica de las bacterias, particularmente las anaerobias formadoras de esporas, se incrementa marcadamente cuando aumenta la concentración de iones hidronio (el efecto no es tan pronunciado en el caso de hongos y levaduras).

Alimentos con valores de pH menores de 4,5 son considerados “ácidos” y con valores mayores, alimentos “no ácidos”. Para estos últimos, la rigurosidad del procesamiento térmico deberá ser mayor.



Las medidas electrométricas del pH han sustituido grandemente los otros métodos, aun cuando en el AOAC todavía se incluyen métodos calorimétricos para pan y otros productos de cereales.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Estudiar la importancia de determinación de pH en los diferentes alimentos.

### **Objetivos específicos:**

- Aprender a utilizar el potenciómetro electrónico para medición de pH
- Preparar los diferentes tipos de muestras para medición de pH

## **III. Fundamento:**

Los aparatos electrónicos utilizados para este fin se denominan pH-metro, constan de un electrodo indicador y de referencia unidos a un milivoltímetro. Mide la diferencia de potencial o voltaje de dos electrodos sumergidos en una solución de la muestra. Uno de los electrodos es de referencia e independiente del pH de la solución analizada, el otro es sensible a la concentración molar de iones hidrógeno de la solución.

El pH presente en el alimento será el resultado de los sistemas amortiguadores naturales que predominen en el mismo. Los sistemas amortiguadores (o “buffers”) son mezclas de ácidos (o bases) débiles y sus sales. La “capacidad buffer” se ha definido como la resistencia al cambio de pH que muestra una solución cuando se le somete a ganancia o pérdida de ácido o álcali.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos	Materiales	Equipos
Solución buffer, pH 7	Frasco lavador de 10 ml	beaker Potenciómetro



Solución buffer pH 4	Pipetas de 10 ml
Agua destilada	Morteros
	Balanza

### **V. Muestra:**

Productos de panificación, cárnicos, productos de la pesca, verduras, frutas.

### **VI. Procedimiento:**

Determinación de pH para muestras líquidas.

1. Conectar el potenciómetro a la corriente eléctrica media hora antes de la usar, con el objeto de estabilizar el instrumento.
2. Lavar cuidadosamente con agua destilada el electrodo y secar.
3. Prender el potenciómetro y calibrar con la solución buffer pH 7 y enjuagar con agua destilada.
4. Calibrar con solución buffer pH 4 y enjuagar nuevamente.
5. Tomar en un beaker aproximadamente 8 ml de la muestra.
6. Introducir en la muestra el electrodo hasta cubrir el bulbo sensible al pH y esperar la lectura del equipo.
7. Apagar el instrumento, lavar con agua destilada el electrodo, secar y cubrirlo con su protector.

Determinación de pH para cereales: En la determinación de pH de productos de cereales tales como pan y otros productos horneados y pastas se prepara un extracto suspendiendo 10 g en 100 ml de agua y se mide el pH del líquido sobrenadante, decantado previamente.

Determinación de pH para carnes: Preparar una papilla en licuadora proporción 1:1 con agua destilada y hacer la lectura en pHmetro.

Determinación de pH para camarones: Preparar una papilla en licuadora proporción 1:1 con agua destilada y hacer la lectura en pHmetro.



## VII. Taller

- 1 Consultar el valor de pH de acuerdo al producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
- 2 Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
- 3 ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de pH en los alimentos?
- 4 ¿A qué productos de los debe realizar determinación de pH según normativa alimentaria?
- 5 Clasifique a los microorganismos en base al pH en el cual pueden desarrollarse. 6 ¿Durante la descomposición de los alimentos hay alguna variación en el pH? ¿Por qué?

## PRÁCTICA N°3

### DETERMINACIÓN ACIDEZ TITULABLE EN LOS ALIMENTOS

#### I. Introducción:

Los ácidos orgánicos presentes en los alimentos influyen en el sabor, color y la estabilidad de los mismos. Los valores de acidez pueden ser muy variables, por ejemplo, en el caso de las frutas, varían desde 0,2 a 0,3%, en manzanas de poca acidez hasta de 6% en el limón (al ácido cítrico puede constituir hasta 60% de los sólidos solubles totales de la porción comestible). Los ácidos predominantes en frutas son: el cítrico (en la mayoría de las frutas tropicales), el málico (Ej. manzana), el tartárico (Ej. uvas y tamarindo). Acidez titulable en Jugos o Zumos y Pulpa pueden ir de 1,5 a 4,5. RESOLUCIÓN 3929 DE 2013 (octubre 2) Ministerio de Salud y Protección social.



Los productos pesqueros, aves y productos cárnicos son de acidez muy baja y el ácido predominante es el láctico y no los di o tri-carboxílicos característicos de los tejidos vegetales. Esta determinación puede ser también importante en grasas y aceites, jugos de frutas y vegetales, etc. El contenido de ácidos volátiles es de importancia en productos fermentados de frutas y cereales. En vinos constituye un buen índice de calidad; aunque las levaduras forman algo de ácido acético durante la fermentación alcohólica, particularmente en las etapas iniciales lo utilizan parcialmente: la presencia de 0,1% o más de ácido acético es una buena indicación de descomposición. La determinación de acidez volátil (cantidad y tipo) es también útil, entre otros productos, en la determinación de la descomposición de algunos **productos enlatados de pescado.**

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Identificar la importancia de la determinación de acidez titulable en los alimentos.

### **Objetivos específicos:**

- Preparar los diferentes tipos de muestras según cada alimento para determinación de acidez titularle.
- Aprender a determinar la acidez titulable en los diferentes tipos de alimentos.

## **III. Fundamento:**

En el procedimiento usual para determinar la concentración total de ácidos, una alícuota de la solución que contiene el ácido se titula con una solución estándar de álcali hasta el punto en el cual una cantidad equivalente de la base ha sido añadida. Este punto final puede detectarse mediante indicadores (cambio de color), electrométricamente (pHmetro), etc.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**



Reactivos	Materiales	Equipos
Solución NaOH 0.1 N	Pañuelos desechables	
Fenofaleína al 1%	beaker 300 ml	
Azul de Bromotimol	Erlenmeyer de 100ml.	
	Balón aforado 500 ml	
	Mortero y pistilo.	
	papel filtro	
	1 embudo de vidrio	
	1 probeta de 100 ml	
	1 soporte universal	
	1 pinza para bureta	
	1 bureta de 25 ml.	
	1 mechero	

#### **V. Muestra:**

Jugo de frutas (naranja, piña, toronja), puré de tomate, carne de res molida, refresco (gaseoso), leche.

#### **VI. Procedimiento**

Preparación de las Muestras.

- Frutas y hortalizas: pesar 25 g del producto molido en un vaso de precipitado y se añaden 20 ml de agua destilada. Se hierve el conjunto durante 15 minutos, agitando periódicamente. Con agua destilada se completa el volumen hasta 250 ml. La mezcla se filtra a través de papel filtro. Del filtrado se toman 50 ml y se le agregan 50 ml de agua destilada. Esta solución corresponde a 5 g de la muestra original.
- Puré de tomate: pesar 10gr de puré de tomate en un frasco de 250 ml, añadir 90 ml de agua y agitar con una varilla de vidrio. Calentar ligeramente la muestra y colocarla en matraz aforado de 500ml. Enfriar la muestra y aforar con agua destilada. Mezclar y filtrar en embudo de filtración rápida. colocar 50 ml de filtrado en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y valorar la acidez



- Jugo: tomar una alícuota de 50 ml de jugo y colocarlo en un matraz. Poner en ebullición la muestra durante un minuto, con el objeto de eliminar el dióxido de carbono. Enfriar y valorar la acidez
- Vinagre: tomar 10 ml de vinagre natural disuelto en 10 ml de agua destilada.
- Leche: tomar 10 ml de leche.
- Yogurt: tomar 10 g diluidos en 50 ml de agua destilada.
- Crema: tomar 10 g diluidos en 50 ml de agua destilada.
- Queso: tomar 10 g de queso finamente molido, se colocan en un frasco volumétrico de 100 ml y se añade agua destilada a 40°C hasta alcanzar 100 ml. La mezcla se agita rigurosamente y se filtra la solución. Con una pipeta se toman 25 ml de filtrado. Esta cantidad corresponde a 2.5 g de la muestra.
- Mantequilla: tomar 5 g de ésta (fundida a 50°C) y se vacía en un matraz. Se añaden 25 ml de alcohol etílico y 25 ml de éter sulfúrico para disolver la mantequilla.

#### Titulación:

1. Mida 10 o 50 ml dependiendo de la muestra a titular en un Erlenmeyer
  2. Añada 3 a 5 gotas de fenolftaleína o azul de bromatimol según sea la muestra a titular
  3. Se llena una bureta con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N valorada
  4. Se toma la lectura de la cantidad de solución en la bureta.
  5. Deje caer gota a gota sobre la muestra el hidróxido de sodio hasta coloración rosada. Cuando aparece el color rosa se cierra la llave de la bureta y se sigue girando el frasco durante 15 segundos para ver si el color permanece
  6. Se toma la lectura en la bureta y se calcula la cantidad de hidróxido de sodio usada para neutralizar la acidez de la muestra.
  7. Calcule la acidez cuantitativamente a partir de la siguiente fórmula
- Cálculo de la acidez. La acidez del producto se expresa como el porcentaje del ácido



predominante en la muestra, ya sea como % de ácido cítrico, málico, láctico, etc.

$$\% \text{ Ácidoz} = \frac{V \times N \times \text{Meq}}{\text{g. o ml. de muestra}} \times 100$$

V = volumen de NaOH consumidos

N = normalidad del NaOH

Meq = peso miliequivalente del ácido predominante en la muestra

#### VII. Taller

1. Consultar el valor de Acidez de acuerdo al producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de acidez en los alimentos?
4. ¿A qué productos se les debe realizar determinación de acidez según normativa alimentaria?

## PRÁCTICA N°4

### DETERMINACIÓN DE GRADOS BRIX EN LOS ALIMENTOS

#### I. Introducción:

Los grados Brix son una unidad de medida de la densidad y concentración de sólidos solubles contenidos en una solución líquida, expresados como el porcentaje de peso aproximado del contenido de azúcares. A través de esta medida, se puede obtener indirectamente un valor objetivo del grado de madurez de la fruta. RESOLUCIÓN 3929 DE 2013 (octubre 2) MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCIÓN SOCIAL. Los grados Brix son una medida física de la concentración de azúcares en los alimentos, su determinación se hace mediante un refractómetro. Este equipo es un instrumento óptico simple estandarizado normalmente para



soluciones acuosas de azúcar de caña. Permite tomar lecturas rápidas directas sobre la muestra sin ningún tipo de manipulación previa. Los valores obtenidos se consideran semicuantitativos por la dependencia de las medidas a la temperatura y a la presencia de azúcares diferentes a la sacarosa. El método es útil para detectar desviaciones importantes de las especificaciones de azúcares antes, durante y después del proceso de transformación.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Determinar el porcentaje peso / peso de glucosa (grados Brix) en diferentes alimentos y bebidas, a través de un método manual y uno electrónico.

### **Objetivos específicos:**

- Estudiar el fundamento y utilidad de los refractómetros utilizados en la técnica.
- Comparar los datos obtenidos empleando el refractómetro manual y electrónico, sacando conclusiones que permitan saber si se mantiene la lectura en ambos equipos.
- Identificar las normas colombianas que rigen estos procesos (determinación de grados Brix).

## **III. Fundamento:**

Los grados Brix miden la cantidad de sólidos solubles presentes en un jugo o pulpa expresados en porcentaje de sacarosa. Se determinan empleando un refractómetro calibrado a 20 °C. El principio de medición se basa sobre el hecho de que el ángulo limitante de la reflexión total sobre una superficie límite depende del índice de refracción de los medios ópticos implicados



#### IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Soluciones patrón de glucosa, sacarosa, Fructosa al 10%.	Pipetas de Pasteur	Refractómetro manual y electrónico
Agua destilada	Papel absorbente Morteros beaker de 50 ml	

#### V. Muestra:

Frutas, jugos de fruta.

#### VI. Procedimiento:

Lectura en el refractómetro manual o de Abbe.

1. Depositar una gota de agua destilada sobre el prisma, para calibrar el equipo en cero, con ayuda del tornillo micrométrico. Ver figura 1.
2. Limpiar el prisma con papel absorbente.
3. Colocar la muestra en el prisma.
4. Realizar la lectura en la escala izquierda, con ayuda de la línea horizontal azul y expresar el valor en porcentaje.

Lectura en el refractómetro electrónico marca Spectronic

1. Depositar una gota de agua destilada en el prisma, para calibrar el equipo en cero, con ayuda del tornillo macrométrico. Con la lámpara encendida se ubica la fase oscura en la parte inferior y la fase clara en la parte superior del campo, coincidiendo con la intersección de las diagonales que cruzan el campo visual tal como se observa en la figura 2.



2. Luego con la lámpara apagada verificar que el equipo haya quedado en cero con respecto a la escala numérica, como se observa en la figura 3.
3. Limpiar el prisma con papel de arroz
4. Depositar una gota de la muestra a analizar sobre el prisma, cerrar la celda. Y con la luz encendida, calibrar la fase oscura y la fase clara igual como en el paso 1.
5. Luego apague la lámpara y realice la lectura en la escala inferior del campo. La escala inferior de los Grados Brix, va de 0° a 85°. Y la escala superior de densidad va de 1000 a 1140.

Cálculos:

Después de realizar la lectura en el refractómetro se debe aplicar un factor de corrección basado en la temperatura que marca el termómetro, porque los grados Brix vienen estandarizados para leerse a 20 °C. Si es mayor, se le suma la diferencia de grados, resultado del siguiente factor de corrección 0.002. Por ejemplo: Si se obtiene una lectura de 4° Brix a 25°C; se realiza la corrección de temperatura restando el valor de temperatura ambiente (25C°) con el valor de la temperatura del refractómetro (20C°) la diferencia serán 5°C, esta diferencia obtenida se debe multiplicar por el factor de corrección =  $(0.002 * 5) = 0.008$

Este resultado 0.008 se le suma a la lectura inicial =  $4+0.008= 4.008$  lectura real  
Se debe informar 4.008 ° Brix.

## VII. Taller:

1. Consultar el valor de Grados Brix de acuerdo al producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. Investigar los valores de grados Brix de pulpas, jugos y zumos de Frutas según normativa colombiana



4. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de grados Brix en los alimentos?
5. ¿A qué productos se les debe realizar determinación de Grados Brix según normativa alimentaria?
6. Investigue los diferentes equipos para determinación de grados Brix y describa su fundamento.

## **PRÁCTICA N°5**

### **ANÁLISIS FISICOQUÍMICO Y ORGANOLÉPTICO DE PRODUCTOS LÁCTEOS**

#### **I. Introducción:**

La leche, desde el punto de vista biológico es el producto de la secreción normal de las glándulas mamarias de animales bovinos sanos, obtenido por uno o varios ordeños en condiciones higiénicas.

La leche es un producto que se altera fácilmente, especialmente bajo la acción del calor. Numerosos microorganismos pueden proliferar en ella, especialmente aquellos que degradan lactosa con producción de ácido láctico, ocasionando la floculación de una parte de las proteínas.

Desde el punto de vista fisicoquímico la leche puede ser definida como una emulsión de grasa en una sustancia compleja. La leche está compuesta por agua en un 90%, lo que la hace el componente más importante en la leche, Proteínas entre 3 y 4 % dependiendo de la raza de la vaca, grasa entre 3.5 y 5.25% dependiendo de la raza de la vaca y del nivel de nutrición y la azúcar de la leche que es la lactosa representa en 5%, le proporciona a la leche el sabor dulce y forma el 52% de sólidos en leche, además de poseer vitaminas A, D y Calcio.



Para determinar la calidad de la leche se deben realizar análisis cualitativos y cuantitativos de tal manera que demuestre que es apta para consumo humano.

A continuación se describe las diferentes pruebas que se aplican al control de calidad de la leche:

- Análisis presuntivos: características organolépticas, lactofermentación, prueba de alcohol y ebullición.
- Análisis cuantitativos: porcentaje de ácido láctico por titulación con NaOH al 0.1%, pH, densidad, determinación de materia grasa, sólidos no grasos, sólidos totales.
- Determinación de adulterantes: crioscopia, peróxido de hidrógenos, almidón, cloro, sacarosa.
- Enzimáticas: reductasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Evaluar la calidad de la leche mediante análisis cualitativo y cuantitativo para demostrar que es apta para el consumo humano, es decir: que cumpla con todas las características de inocuidad y calidad.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar todos los análisis fisicoquímicos pertinentes para evaluar la calidad de la leche.
- Conocer los parámetros de calidad fisicoquímicos que deben cumplir la leche según las normas colombianas.

## **III. Pruebas a realizar:**

### Determinación de la densidad



#### Fundamento:

La densidad de la leche es el peso de un litro de leche expresado en Kg. La densidad expresa la relación entre la parte sólida y la parte líquida de la leche. Se puede medir por medio de un lactodensímetro que consiste en un flotador que en algunos casos va provisto por 2 columnas una para medir la temperatura y otra para medir la densidad.

#### Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Agua destilada	Cilindro 250 ml Termómetro Leche	Lactodensímetro

#### Muestra:

Leche.

#### Procedimiento:

1. Verter 100 ml de leche adecuado en el cilindro.
2. Introducir el lactodensímetro en la leche.
3. Realice la lectura correspondiente en su respectiva escala.
4. Realice la corrección que sea necesaria adicionando o restando 0.2 por cada grado diferente a 15°C, a la lectura del lactodensímetro.

#### Determinación de la acidez presuntiva

#### Fundamento:

Prueba cualitativa y rápida que orienta sobre el grado de acidez de la leche, consiste en mezclar partes iguales de leche y alcohol de 68% en peso 72% volumen, con una ligera inversión. La leche de buena calidad, fresca y bien conservada no se debe



coagular, cuando se evidencia signos de coagulación, se toma la prueba como positiva, la cual debe confirmarse por cuantificación.

Reactivos, materiales y equipos

Reactivos	Materiales	Equipos
Alcohol de 70%	Tubos de ensayos	
Agua destilada	Pipetas	

Muestra:

Leche.

Procedimiento:

1. Coloque en un tubo de ensayo 4 ml de leche.
2. Adicione 4 ml de alcohol de 70% y agite observando si hay coagulación. En caso positivo, se concluye que la leche esta ácida, mastítica o calostrada y debe por lo tanto rechazarse o utilizarse para otros fines.

### Determinación de la acidez titulable

Fundamento:

Es un método utilizado para determinar la acidez de la leche o el contenido en ácido expresado en gramos de ácido láctico por 100 ml o gramos de la leche, que equivale a decir gramos de acidez. Se determina por medio de titulación de un volumen determinado de leche, con una solución alcalina valorada y empleando un indicador.

Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Hidróxido de sodio	Pipetas	Plataforma con agitación
Fenolftaleína	Erlenmeyer 50 ml	



Bureta con soporte universal

Muestra:

Leche y derivados.

Procedimiento:

1. Mida 9 ml de leche en un Erlenmeyer.
2. Añada 3 a 5 gotas de fenolftaleína.
3. Deje caer gota a gota sobre la leche el hidróxido de sodio hasta coloración rosada.
4. Calcule la acidez cuantitativamente a partir de la siguiente fórmula.

$\% \text{ de AC. Láctico} = \frac{\text{ml de NaOH gastados} \times N (\text{NaOH}) \times \text{milEq-g de AC láctico} \times 100}{\text{Volumen de la alícuota}}$

Volumen de la alícuota

Los resultados se expresan en grados de ácido láctico por 100 ml de leche, siempre que se tomen 9 ml de muestra.

### Determinación de adulterantes como harina y almidones

Prueba del lugol

Fundamento:

Método basado en la propiedad que tiene el yodo de fijarse al almidón, revelando su presencia al colorearlo de azul, indicando así, al almidón como adulterante de leche que ha sido aclarada.

Reactivos, materiales y equipos:



**Reactivos**

Solución de lugol

**Materiales**

Tubo de ensayo

Pipetas

Leche

**Equipos**

Estufa

**Muestra:**

Leche.

**Procedimiento:**

1. Mida 5 ml de leche en un tubo de ensayo, hervir y enfriar.
2. Agregar 5 gotas de reactivo lugol.
3. Una coloración amarillenta indica la ausencia de este adulterante. La aparición de un color azul indica la presencia de harina o almidón. El color azul debe desaparecer por calentamiento.

**IV. Taller:**

1. Consultar los valores de referencia de los diferentes análisis fisicoquímicos y sensoriales que se le realizan a los diferentes tipos de leche.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. Investigue y describa los diferentes métodos utilizados para determinación de enzimáticas en la leche.
4. Investigue y describa los diferentes métodos utilizados para determinación de adulterantes en la leche.
5. Elabore un flujograma de proceso una empresa procesadora de leche y describa por etapas que pruebas se deben realizar para control de calidad de este producto.



## PRÁCTICA N° 6

### ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE AGUAS

#### I. Introducción:

Por ser el agua un elemento indispensable para la vida e imprescindible como herramienta de trabajo, resulta de gran importancia el cuidado del abastecimiento de agua limpia y potable.

El análisis fisicoquímico del agua se refiere a los procedimientos de laboratorio que se efectúan a una muestra de agua para evaluar sus características físicas, químicas o ambas. Los análisis habituales para determinar la calidad del agua potable son cloro residual, turbiedad, pH, sulfatos, cloruros, hierro, dureza total y nitritos, etc. contemplados en la resolución 2115 de 2007.

La medición de parámetros fisicoquímicos en los cuerpos de agua es, tal vez, la forma más sencilla de identificar sus variaciones composicionales, tanto espaciales como temporales, resultantes de cambios en factores naturales como la litología, relieve, vegetación y clima de la región. Además, son útiles para determinar el grado de contaminación tanto orgánica como inorgánica.

#### II. Objetivos:

##### Objetivo general:

Determinar parámetros físicos, químicos y organolépticos en aguas tratadas, superficiales y subterráneas.

##### Objetivos específicos:



- Aprender el fundamento de los kit de identificación de pH, cloro y bromo en aguas.
- Determinar la presencia de cloro, bromo en diferentes muestras de aguas
- Analizar la norma colombiana para agua potable.

### **III. Fundamento:**

Es una determinación calorimétrica con la ortotoluidina que reacciona con el cloro residual de la muestra formando un compuesto amarillo, que de acuerdo a su intensidad nos demuestra la concentración del cloro. La identificación del bromo se realiza en simultánea con la determinación de cloro residual, usando la misma muestra, celda y el mismo reactivo, la ortotoluidina, pero se hace la lectura en su respectiva escala.

### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos	Materiales	Equipos
Kit de cloro, pH, Bromo	Muestra de aguas	Potenciómetro digital
Agua destilada	beaker	
	Servilletas	

### **V. Muestra:**

Agua potable de diferentes fuentes.

### **VI. Procedimiento:**

- Análisis organoléptico.  
Determinar olor, color y aspecto con la observación de sólidos suspendidos, etc. Fecha de recolección y condiciones climáticas. Se recomienda que el analista no sufra ninguna afección respiratoria que vaya a afectar los órganos sensoriales.
- Análisis fisicoquímico  
Las pruebas de cloro residual, Bromo y pH se realizan utilizando el mismo Kit.



- **Determinación de cloro residual**

Es una determinación calorimétrica con la ortotoluidina que reacciona con el cloro residual de la muestra formando un compuesto amarillo, que de acuerdo a su intensidad nos demuestra la concentración del cloro.

1. Purgar o enjuagar la celda con agua de la muestra con el fin de eliminar residuos contaminantes de muestras anteriores.
2. Llenar la celda con la muestra de agua hasta la marca y adicionar 5 gotas de ortotoluidina.
3. Agitar vigorosamente.
4. Comparar el color de la columna de agua con la escala de colores.

- **Determinación de bromo**

El Bromo es un componente altamente tóxico para todos los seres vivos y el agua de consumo humano debe estar libre de él. Se realiza en simultánea con la determinación de cloro residual, usando la misma muestra, celda y el mismo reactivo la ortotoluidina, pero se hace la lectura en su respectiva escala. El rango de lectura va de 0 a 10 partes por millón (ppm) o miligramos por litro (mg/L).

- **Determinación colorimétrica de pH**

Con el mismo Kit de Cloro y Bromo; pero en la otra celda. Su rango de lectura va de 1 a 14.

Seguir el siguiente procedimiento:

Purgar o enjuagar la celda con agua de la muestra con el fin de eliminar residuos contaminantes de muestras anteriores.

1. Llenar la celda con la muestra y adicionarle 5 gotas de rojo de fenol.
  2. Agitar vigorosamente.
  3. Realizar la lectura en la respectiva escala. El rango de lectura va de 0 a 10 partes por millón (ppm) o miligramos por litro (mg/L).
- **Determinación potenciométrica de pH**



Es una medida cuantitativa del pH de agua, más exacta que la colorimétrica ya que se realiza con la ayuda de un equipo electrónico llamado potenciómetro o peachimetro calibrado con soluciones tampón.

1. Medir 50 ml de la muestra en un beaker limpio y seco.
2. Introducir el electrodo del potenciómetro previamente calibrado con soluciones tampón pH 7 - 4.
3. Anotar la lectura que marca el equipo en la pantalla.
4. Si lo considera necesario repetir la operación.

#### **VII. Taller:**

1. Comparar los resultados con lo exigido en la resolución 2115 de 2007 y discutir.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos en su muestra, investigue qué tipo de contaminantes biológicos, físicos o químicos están contaminando la fuente de su muestra.
3. Consulte qué otros análisis se le practican al agua y con qué métodos.



## CAPÍTULO II

# TÉCNICAS DE DILUCIÓN, PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y RECUENTO MICROBIOLÓGICO

### PRÁCTICA Nº 7

#### CUANTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR EL MÉTODO DE RECUENTO EN PLACA.

##### I. Introducción:

El recuento en placa es el método más utilizado y más recomendado por la *Comisión Internacional sobre especificaciones Microbiológicas en los alimentos* (ICMSF). La mayoría de los alimentos no son estériles, sino que contienen una población microbiana, que varía ampliamente en número, dependiendo del alimento. Es por esto que al alimento se le realizan diluciones para su cuantificación, ya que, si se sembraran los alimentos sin diluir, presentarían un recuento tan alto que sería imposible realizar su conteo. Para eso se utilizan las diluciones logarítmicas en base 10 ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ), las cuales se pueden relacionar con el recuento de microorganismos multiplicando por el factor de dilución, que es el inverso de la



dilución. La dilución inicial siempre será 1:10 (10+90; 25+225; 50+450; 100+900), la cantidad de muestra va a depender del tipo de alimento y de los parámetros que existan, pero lo importante que se guarde la relación: 1+9 o sea 1 parte de alimento y 9 partes de diluyente.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Al finalizar el trabajo práctico, el estudiante estará en capacidad de realizar el conteo de colonias bacterianas a través de la técnica recuento en placa.

Objetivos específicos:

- Preparar correctamente homogenizados a partir de muestras de alimentos sólidos o líquidos y realizar diluciones logarítmicas en base 10 a partir de los homogenizados.
- Sembrar en profundidad 1 ml de las diferentes diluciones con agar plate count.
- Sembrar en superficie 0.1 ml de las diferentes diluciones en el agar correspondiente.
- Contar las UFC teniendo en cuenta las reglas, después de evaluar la calidad de los controles y de las diluciones.

## **III. Fundamento:**

Se basa en colocar en un medio de cultivo adecuado un volumen determinado de muestra, cada una de las células aisladas dará lugar, después de la incubación correspondiente, a una colonia de forma que el número de estas nos permitirá estimar el número de células presentes en la muestra sembrada.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos

Materiales

Equipos



Agar Plate count	Cuchillos-cucharas	Homogenizador
Agua peptona 0.1%	Asa bacteriológica	Balanza
Algodón	Bolsas de polipropileno	Incubadora
	Cajas Petri estériles	Contador de colonias
	Algodón	

## V. Muestras:

Diferentes clases de alimentos (Sólidos, semisólidos, líquidos).

## VI. Procedimiento:

Procedimiento de las diluciones.

1. Desinfectar con alcohol al 70% el frasco o envase que contiene el alimento.
2. En un frasco adicionar 90 ml de agua peptonada al 0.1% y marcarla como dilución  $10^{-1}$ .
3. Marcar dos tubos de vidrio tapa rosca como dilución  $10^{-2}$  y dilución  $10^{-3}$ , adicionar a cada uno de ellos 9 ml de agua peptonada al 0.1%.
4. Agitar unas 25 veces las muestras líquidas, formando un arco con el antebrazo de 30 cm o resuspendiendo con la pipeta unas 10 veces, si el recipiente no tiene espacio libre con el fin de homogenizar la muestra y tomar una parte representativa del producto. Para muestras sólidas pesar 10g de la muestra, tratando de tomar porciones de varias partes.
5. Tomar 10 ml o 10g de la muestra mezclada y agregarlos al frasco que contiene los 90 ml, mezclar resuspendiendo con la pipeta más de 10 veces, hasta homogenizar la mezcla; así se obtiene la dilución  $10^{-1}$ .
6. Tomar 1 ml de la dilución  $10^{-1}$  y adicionarlos al tubo que contiene 9 ml de agua peptonada al 0.1% marcado con la dilución  $10^{-2}$ . Mezclar unas 10 veces aspirando con la pipeta. Esta es la dilución  $10^{-2}$ .
7. Tomar 1 ml de la dilución  $10^{-2}$  y adicionarlos al tubo marcado con la dilución  $10^{-3}$ . Mezclar unas 10 veces aspirando con la pipeta. Así se obtiene la dilución  $10^{-3}$ .



8. De esta forma se tienen las diferentes diluciones, el número de ellas va a depender del alimento y de los parámetros que existan, pero deben sembrarse por lo menos tres (3) diluciones. ( ver figura 4)

#### Procedimiento de siembra en profundidad.

1. Tomar 5 cajas de Petri estériles y marcarlas en la tapa como dilución  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , control del diluyente y control del medio; además escribir en cada una de ellas el N° del grupo, el semestre, la fecha, el tipo de examen y el número de la muestra.
2. Mezclar unas diez veces con la pipeta la dilución  $10^{-1}$  y tomar 1 ml de la dilución y adicionarlo en la caja marcada con  $10^{-1}$ , las diluciones deben sembrarse por duplicado. (ver figura 5)
3. Mezclar de igual forma con pipeta diferente la dilución  $10^{-2}$ , tomar 1 ml y adicionarlo en la caja marcada como dilución  $10^{-2}$ .
4. Mezclar de igual forma con pipeta nueva la dilución  $10^{-3}$ , pipetear 1 ml y
5. Adicionarlo en la caja marcada como dilución  $10^{-3}$ . El tiempo transcurrido entre la realización de las diluciones y la siembra en la última caja, no debe ser mayor de 20 minutos.
6. Adicionar 1 ml de agua peptonada al 0.1% a la caja marcada como control del diluyente.
7. Adicionar 15 ml del agar fundido a  $45^{\circ}\text{C}$ , a cada una de las cajas, incluyendo las cajas marcadas como control del diluyente y del medio.
8. Según la temperatura de incubación, se obtienen los mesófilos aerobios a  $37^{\circ}\text{C}$ , los termófilos cuando se incuban las cajas a  $55^{\circ}\text{C}$ , los psicrófilos a  $7^{\circ}\text{C}$  por 10 días. La temperatura elegida dependerá del objetivo que se pretenda con la realización del recuento.
9. Mezclar cinco veces en forma de ochos, en dirección de las manecillas del reloj y viceversa, de arriba hacia abajo y viceversa, con el fin de obtener una distribución homogénea de la muestra en el medio de cultivo.



10. Dejar solidificar, invertir las cajas e incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

Procedimiento de la siembra en superficie.

1. Preparar la muestra y realizar las diferentes diluciones.
2. Marcar tres cajas de Petri que contienen agar con el nombre del alimento, fecha, dilución y No. del grupo.
3. Marcar dos cajas de Petri del mismo medio, una como control del diluyente y otra como control del medio.
4. Adicionar 0.1 ml de cada una de las diluciones y del control del diluyente en las cajas marcadas respectivamente que contienen el medio de cultivo.
5. Extender con una varilla de vidrio la muestra sobre toda la superficie del medio, hasta que la superficie quede seca.
6. Incubar por 24-48 horas a 35-37°C (ver figura 6).
7. Seleccionar las cajas que tengan entre 20 a 200 colonias.
8. Realizar el conteo final multiplicando por la dilución y por 10.

## **PRÁCTICA N° 8**

### **TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP)**

#### **I. Introducción:**

Esta técnica sirve para estimar la población de microorganismos viables en una muestra de alimento. En contraste con el recuento estándar en placa, el NMP es un método indirecto y solo da recuentos estimados de la población microbiana; es menos preciso que el recuento en placa cuando se trata de alimentos que contienen altas poblaciones microbianas, pero más eficaz en poblaciones bajas porque permite el análisis de muestras de tamaño más significativo. Se usa principalmente para la



determinación de coliformes, pero variando el medio de cultivo también se puede utilizar para la cuantificación de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, etc.

Se pueden utilizar varios medios de cultivo para NMP coliformes. Se puede emplear el caldo laurel sulfato triptosa, seguido de la confirmación de los tubos positivos en caldo lactosa bilis verde brillante o siembra por estría en EMB. Otro método emplea el caldo lactosa bilis verde brillante y confirman con agar cristal violeta rojo neutro bilis lactosa. La utilización del método dependerá del tratamiento a que ha sido sometido el alimento.

## II. Objetivos:

**Objetivo general:** Valorar los métodos de cuantificación de Número Más Probable con el empleo de muestras puras y diluidas.

### Objetivos específicos:

- Sembrar muestras puras y diluidas por la técnica del NMP utilizando diversas modalidades y medio de cultivo.
- Leer la positividad de los tubos en las tablas correspondientes.
- Informar los resultados de la técnica del NMP.

## III. Fundamento:

Este número es calculado a partir de la observación del crecimiento, tanto con la aparición de turbidez como con la formación de gas, en cultivos en caldo duplicados, inoculados con porciones de un ml de diluciones decimales de la muestra. La metodología de la técnica se basa en la siembra de volúmenes secuenciales de base 10 (10, 1, 0.1, 0.01 ml.) de la muestra pura o 1 ml. de las diluciones decimales.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos

Materiales

Equipos



EMB	Cuchillos-cucharas	Balanza
Coloración de gram	Pipetas 1 y 10ml.	Homogenizador
bilis verde brillante	Asa bacteriológica	Incubadora
lactosa con Durham		
Agua peptona 0.1%	Bolsas de polipropileno	
alcohol al 70%	Gradilla	
	Tubos de ensayo	
	Algodón	
	Morteros	

#### **V. Muestra:**

Diferentes clases de alimentos (sólidos, semisólidos, líquidos).

#### **VI. Procedimiento:**

Técnica con 9 tubos para muestras líquidas puras.

1. Desinfectar con alcohol al 70% toda el área de trabajo.
2. Tomar 9 tubos que contienen 10ml. cada uno de medio bilis verde brillante lactosa, tres de los cuales están a doble concentración y los 6 restantes a concentración simple.
3. Marcar los tubos anteriores de la siguiente manera: con el número 10 los tres tubos que tienen doble concentración, con el número 1 tres tubos con concentración simple y con el número 0.1 los tres tubos restantes que también tienen una concentración normal o simple.
4. Limpiar con alcohol al 70% el recipiente que contiene el alimento a utilizar.
5. Mezclar muy bien el alimento y sembrar por triplicado 10ml., 1ml. y 0.1 ml. en cada uno de los tubos marcados respectivamente (ver figura 6).
6. Mezclar e incubar por 24-48 horas a 35-37°C.
7. Leer los tubos: Positivos, los que presenten gas y turbidez. Negativos, los que no presenten estos parámetros o presenten solamente uno de los dos.



8. Anotar los tubos positivos y confirmar la presencia del microorganismo a determinar usando pruebas complementarias, sembrar por estría una asada de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de agar EMB o V.R.B.A.
9. Incubar las placas invertidas a 35°C por 24 horas, hacer lectura de las colonias típicas de coliformes.
10. Anotar los tubos que resultaron positivos en la prueba confirmatoria.
11. Buscar en la tabla No. 1, que es una tabla que se usa cuando se siembran 10ml. de muestra en tres tubos, 1ml. en otros tres tubos y 0.1ml. de muestra en los últimos tres tubos. El resultado del NMP se da en 100ml., si el resultado se debe expresar por ml. se divide entre 100.

#### Resultados e interpretación.

Los resultados se expresan como NMP = No. de bacteria/ g ó ml. de alimento; hay veces dependiendo de los alimentos se expresa como NMP = No. de bacterias / 100ml.. Los resultados de un análisis de NMP, están directamente relacionados con la frecuencia con que se presentan una serie de resultados positivos, que son los más probables que ocurran cuando un número dado de organismos están presentes en una muestra de alimentos.

En caso de realizar más diluciones de las que posea la tabla empleada, se puede usar la siguiente fórmula para hallar el NMP por g. o ml.:

$(\text{NMP de la tabla} \times \text{Factor de dilución intermedio de la lectura}) / 100 = \text{Bact/g ó ml}$

Número más probable (NMP) coliformes de origen fecal

#### Test de Mac-Kenzie

A partir de los tubos positivos con producción de gas del NMP de coliformes totales, transferir de cada tubo una asada de cultivo en:



- Caldo lactosado bilis verde brillante al 2% conteniendo tubo de fermentación de Durham.
- Caldo Triptofano.
- Incubar los tubos 45c +0.5c por 48 horas en el baño de agua.

Leer el test de Mac-Kenzei como sigue:

- Observar la producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2%
- Revelar el caldo triptófano, adicionando 0,2 ml del reactivo de Kovacs, agitar suavemente y observar presencia de anillo rojo cereza en la superficie de la capa del alcohol amílico cuando la prueba es positiva o del color original de medio cuando la prueba es negativa.
- Considerar como coliformes de origen fecal los que demuestren positividad en ambas pruebas, Gas: positivo, Indol: Positivo
- Confrontar los resultados con la tabla de NMP.

#### **VII. Taller:**

1. ¿Cuáles son algunas desventajas del método de NMP?
2. ¿Qué otras aplicaciones tienen este método?
3. Describa las características observadas en los tubos donde considera que hubo crecimiento bacteriano.
4. Teniendo en cuenta la composición del medio utilizado para NMP ¿cómo lo clasificaría y por qué?
5. Describa los fundamentos de los medios utilizados en la práctica.

### **PRÁCTICA N° 9**



## **PREPARACIÓN, DILUCIÓN DE HOMOGENIZADOS EN ALIMENTOS Y REGLAS DE RECuento BACTERIANO**

### **I. Introducción:**

Cumplidas todas las condiciones para una buena preservación de la muestra, se procede a prepararla para el análisis.

En los alimentos sólidos se hace necesario el uso de aparatos de trituración y mezcla provistos de cuchillas cortantes (licuadoras homogenizadoras), de esta forma se logra una suspensión homogénea del alimento y microorganismos que permitan luego, la preparación oportuna de las diluciones.

En caso de “estrés” celular deben utilizarse métodos que permitan la revivificación, manteniendo la suspensión, tiempos variables (20°C-30°C etc.), antes de proceder a diluir.

La densidad de la población microbiana en las muestras de alimentos varía ampliamente en número y distribución, de tal manera que, si en todos los casos se inoculara la muestra directamente, muchos de los recuentos presentarían una población microbiana tan alta que sería imposible realizar el conteo.

Por tal motivo es indispensable recurrir a las diluciones logarítmicas en base 10 (10, 100, 1000 etc.) que posteriormente podemos relacionar con el recuento de microorganismos (multiplicando por el respectivo factor de dilución, al hallar una dilución en la cual sea posible la lectura.

La dilución inicial (10) se prepara regularmente suspendiendo 10 gramos o ml. del alimento en 90 ml. del diluyente apropiado, pero estas cantidades pueden variar, siempre que se conserve la relación 1 de muestra en 9 de diluyente respectivamente. Por ejemplo 11 g de alimento y 99 ml del diluyente, 50 g de alimento en 450 de solución diluyente o, también, 100 g de muestra en 900 de solución diluyente.



Cuando se trata de muestras superficiales, se toman por capas o lonchas, este método es útil en canales de aves y en pescados; en donde la piel proporciona la muestra adecuada. Cuando se trata de productos en donde la contaminación es esencialmente superficial, se utiliza el método de lavado o enjuague en diluyente estéril a una proporción de 1/10. Esta agua de lavado, corresponde a la dilución 10, y a partir de ella se realizan las siguientes. Puede aplicarse a productos como: Frutas secas, semillas, granos, legumbres, ensaladas, etc. De utilizarlo es preciso especificar en el informe que el recuento representa bacterias procedentes únicamente de la superficie.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Aprender cual es el protocolo a seguir cuando llega una muestra de alimentos al laboratorio.

### **Objetivos específicos:**

- Homogenizar correctamente las muestras sólidas.
- Preparar diluciones logarítmicas en base 10, a partir de los homogenizados.
- Realizar siembra en profundidad, a partir de las diluciones respectivas.
- Evaluar la calidad de las diluciones, y aplicar reglas de recuento.

## **III. Fundamento:**

La operación de preparación de muestras para el análisis microbiológico exige unas reglas de manipulación aséptica muy estricta, así como la utilización de material y diluyente estériles, para evitar la contaminación exterior del alimento.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos

Materiales

Equipos



Frascos con 90 ml. de agua peptonada al 0,1%.  
Tubos con 9 ml. de agua peptonada al 0,1%.  
Alcohol al 70%.

Cuchillos, espátulas  
Algodón estéril  
Pipetas de 10 y 1 ml.  
Estériles  
Bolsas de polietileno

cucharas, Homogenizador.  
(Mortero o licuadora).  
Balanza Granataria

### V. Muestra:

Diferentes clases de alimentos (Sólidos, semisólidos, líquidos).

### VI. Procedimiento:

1. Comenzar el trabajo lo más pronto posible después del recibo de las muestras en el laboratorio. A continuación se describe la distribución de las muestras por grupos y sus respectivas diluciones.

MUESTRAS	DILUCIÓN	SIEMBRAS
Agua de pluma	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$	1 caja por dilución
Agua de bolsa	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$	1 caja por dilución
Pan	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$	1 caja por dilución
Harina de trigo	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$	1 caja por dilución
Ajo en polvo	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución
Jugo de naranja comercial	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución
Butifarra	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución
Chorizo	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución
Salchichón	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución
Tuti-fruti callejero	$10^{-1}$ , $10^{-2}$ , $10^{-3}$ , $10^{-4}$	1 caja por dilución

Si las muestras llegan congeladas, descongelarlas en su envase original en una nevera entre 2°C – 5°C y comenzar el trabajo de análisis tan pronto como sea



posible, una vez conseguida la descongelación completa. Las muestras líquidas deben agitarse vigorosamente, moviendo 25 veces el antebrazo, para formar un arco de 30 cm. Si el recipiente no presenta espacio libre, abrirlo y con pipeta estéril, aspirar y dejar caer por 10 veces el líquido; finalmente tomar 10 ml. de la muestra y llevarlos al frasco que contiene los 90 ml. del agua peptonada al 0.1% de este modo, se obtiene la dilución  $10^{-1}$ . Para los productos sólidos o semisólidos, deben tomarse pequeñas porciones a diferentes niveles o zonas, con la ayuda de pinzas, tijeras, espátulas, los cuales se van colocando en una bolsa de polietileno previamente tarada, hasta obtener 10 gr.

2. Añadir los 10 gr. al frasco que contiene los 90 ml. del diluyente, y así se obtiene la dilución  $10^{-1}$

En los productos en polvo o granulados, mezclar previamente el envase e ir depositando pequeñas porciones en la bolsa; añadirla posteriormente a frasco con 90 ml. de diluyente.

Si se trata de productos grasos, se toman pedazos de diferentes sitios, hasta obtener más o menos 50 gr., estos se colocan en un recipiente estéril de boca ancha, se llevan al baño maría a 45 - 50°C, para fundir la muestra, agitando frecuentemente. Una vez fundida, se toman asépticamente 10 ml. y se depositan en 90 ml. del diluyente, el cual debe estar a, más o menos, 45°C. Así se obtiene la dilución  $10^{-1}$ .

Si es en licuadora. Comenzar la homogenización con un número bajo de revoluciones, e ir aumentando gradualmente en pocos segundos, hasta alcanzar revoluciones máximas; el tiempo de homogenizado no puede ser superior a 2 minutos, ya que puede producirse deterioro celular por efecto mecánico o por calor.

Si se utiliza homogenizador (Stomacher), colocar en bolsa que contiene el alimento y el diluyente en el aparato y hacerlo funcionar por un minuto.



Si el alimento tiene un contenido graso de más de 20%, añadir 1% de Tween 80 y otro tensoactivo no tóxico.

Se recomienda no emplear un tiempo mayor de 15 minutos entre la preparación de las diluciones y la siembra de la última dilución. Si se trata de productos que han sido sometidos a congelación, deshidratación, pasteurización, los microorganismos del producto se someterán a un proceso de revivificación. En este caso la dilución inicial se dejará a 25-30°C por 20-30 minutos, especialmente si la siembra va a realizarse en medios selectivos. Ya que en medios nutritivos, tal como el agar cuenta gérmenes, este proceso de revivificación puede obviarse. A partir de la dilución  $10^{-1}$ , pipetear 1 ml. a un tubo que contiene 9 ml. de diluyente, esto sería la dilución  $10^{-2}$ .

4. Agitar la dilución  $10^{-2}$  por 25 veces llevar 1 ml. a otro tubo con 9 ml. de diluyente esta corresponde a  $10^{-3}$ .
5. Repetir la operación hasta preparar las diluciones necesarias de acuerdo al caso.
6. Sembrar en profundidad 1 ml. de cada dilución, en cajas Petri estériles.
7. Agregar más o menos 15 ml. de agar Plate Count fundido.
8. Mezclar. Dejar solidificar, invertir y llevar a la incubadora a  $35 \pm 2$  °C por 48h.

Resultados e interpretación:

Transcurridas 48 horas, sacar las cajas, organizarlas y evaluar los controles y las siembras.

Calcular el crecimiento secuencial, realizando un recuento utilizando la plantilla para recuento microbiológico en caja que aparece en la figura 8; y evaluar la calidad de sus diluciones; el conteo debe ser aproximadamente 10 veces menos a medida que la dilución es más alta.

Reglas para el recuento bacteriano:



Transcurrido el tiempo de incubación necesario según los microorganismos buscados, se hace el recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando magnificación y buena luz, baja y uniforme. En lo posible, emplee un cuenta-colonias. Como siempre, se tiene una serie de cajas correspondientes a los diferentes volúmenes de muestras, escoja las más adecuadas para realizar la lectura. En todos los casos debe definirse si se cuentan todas las UFC observadas en una caja o sólo algunas con determinadas características; esto lo deducirá la población microbiana, que se quiere contar y el medio de cultivo utilizado.

Para el recuento en placa de microorganismos se han establecido tres rangos principales en los cuales debe hacerse el conteo.

1. Rango entre 30 -300 colonias por placa: esta forma se aplica cuando el recuento contempla un número de microorganismos de diferentes tipos, sin importar características macroscópicas y/o reacciones enzimáticas en el medio de cultivo.

Ejemplos:

Rec. de aerobias mesofilas.

Rec. de psicofilas.

Rec. termófilas.

Rec. termodúricos.

2. Rango entre 20-200 colonias por placa: Esta norma se emplea cuando el recuento contempla un número de bacterias que presentan alrededor de su crecimiento alguna reacción enzimática.

Ejemplos:

Rec. *Staphilococcus aureus*.



Rec. de *Bacillus cereus*.

Rec. de coliformes.

3. Rango entre 10-100 colonias por placa: Esta norma se aplica cuando el recuento contempla un número de microorganismos con características macroscópicas importantes.

Ejemplo:

Rec. Hongos y levaduras.

Procedimiento para el conteo:

Las reglas implican que no es necesario hacer el recuento en cada una de las cajas. Lo primero es organizar el conjunto de cajas en orden de dilución, observarlas detenidamente y darse cuenta si cumplen la presunción teórica de que a medida que aumentan las diluciones disminuirá (aprox/ 10 veces) la población microbiana. Si ésta condición no se cumple es inútil recurrir a las reglas, a no ser que la secuencia falle sólo en la última y/o penúltima caja (s) de una serie larga (por ejemplo 6 diluciones), en cuyo caso podrán descartarse éstas y realizar el recuento en las restantes.

A continuación, se dan una serie de “Reglas”, las cuales tienen la finalidad de orientar al estudiante para hacer un recuento de la mejor forma. Es imposible considerar todos los casos y es más el sentido común del analista que el seguimiento de estas reglas lo que llevará a una decisión correcta, sin embargo, su valor práctico es indiscutible.

Se acostumbra informar los recuentos microbianos con dos cifras significativas y potencias de base 10, por lo tanto, una vez obtenidos los resultados se hacen las aproximaciones del caso con base en las normas matemáticas.

REGLA No. 1. Caja con 30 - 300 UFC.



1) Es la caja ideal. Basta contar los UFC y multiplicar por el factor de dilución y/o siembra. Ejemplo:

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
>250	>250	80	10	0

R/ Se escoge la caja de  $10^{-3}$  entonces  $80 \times 10^3$  UFC/gr o ml.

2)

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
>250	>250	>250	>250	32

R/  $32 \times 10^5$  UFC/gr. o ml.

3) Si se han realizado siembras por duplicado, cuente las colonias de las dos cajas que contengan entre 30 - 300 UFC, promedie el valor y multiplique por el factor de dilución. Ejemplo:

Dilución  $10^{-1}$   $10^{-2}$   $10^{-3}$   $10^{-4}$

Cajas A >250 >250 125 15

Cajas B >250 >250 98 8

R/.  $\frac{223}{2} = 111 \times 10^{-3} = 11 \times 10^{-4}$  UFC/gr o ml.

2

Si solo una de las cajas tiene entre 30 y 3000 y la otra un valor cercano, cuente ambas cajas, promedie y multiplique por el factor de dilución. Ejemplo:

Dilución  $10^{-1}$   $10^{-2}$   $10^{-3}$   $10^{-4}$



Cajas A	>250	>250	280	23
Cajas B	>250	>250	<u>235</u>	17

$$\underline{515} = 257 \times 10^{-3} = 26 \times 10^{-4} \text{ UfC/gr o}$$

2

REGLA No. 2. Diluciones consecutivas entre 30 - 300 UFC.

Haga el recuento por cada dilución y promedie los resultados a menos que el recuento de una de las diluciones sea el doble o más del recuento de la otra, en tal caso informe el conteo menor. Ejemplo:

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
> 250	250	60	4	0
> 250	240	50	3	0

Entonces:	250+	60+
	<u>240</u>	<u>50</u>
	490	110

Promedios:  $490/2 = 245$        $110/2 = 55$

Aplicar el inverso del factor de dilución =

$$245 \times 10^3 = 24.500$$

$$55 \times 10^3 = 55.000$$

Entonces: 55.000 + 24.500 > 2 entonces: se informa 39.759 media aritmética.

REGLA No. 3. Ninguna Caja con 30 - 300 UFC.



Ya que la caja de la dilución mayor tiene menos de 30 UFC y la de la dilución menor tiene más de 300, se escoge el recuento más cercano a 300, se promedia el conteo y se multiplica por el factor de dilución. Se informa conteo estimado. Ejemplo:

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
356	20	0	0	0
360	18	2	1	0

$$\underline{356 + 360} = 358 \times 10^1$$

2

REGLA No. 4. Todas las cajas tienen menos de 300 UFC.

Registre el número de colonias en la dilución más baja e informe como UFC/gr. o ml., conteo estimado. Ejemplo:

$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
18	4	0	0	0
12	5	0	0	0

$$\underline{18 + 12} = 15 \times 10^{-1} \text{ conteo estimado.}$$

2

REGLA No. 5. Cajas sin colonias.

Si en las cajas de todas las diluciones no hay colonias y no se ha detectado sustancia inhibitoria, informe el recuento como menor que las veces correspondientes a la dilución más baja. Ejemplo:

Dilución	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
A)	—	—	—	—	—
B)	—	—	—	—	—



R/ Menos de 10 UFC/gr o ml. O Menor de 100/g. o ml. si se ha sembrado 0,1 ml

REGLA No. 6. Cajas con más de 300 UFC.

Dividir la caja en 8 secciones.

Contar en un octavo de la caja las colonias presentes.

Si el recuento es > de 200 por octavo, multiplicar  $200 \times 8 = 1600$  en x dilución.

Ej.  $10^{-3}$

Informar > de  $16 \times 10^{-5}$ .

REGLA No. 7. Spreader.

Se considera Spreader el crecimiento que se caracteriza por la dispersión en película de un microorganismo a través del agar. Esta puede ocupar la totalidad de la caja o parte de ella.

Si el Spreader cubre solo la mitad de la caja y el área restante presenta colonias bien distribuidas, haga el recuento en esta porción de la caja. Si cubre más de la mitad, reporte Spreader o accidente de laboratorio. En cuyo caso habría que repetir la muestra.

## VII. Taller:

1. Investigar el procedimiento para la toma de muestra, transporte y almacenamiento de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
2. ¿Qué permite determinar el estudio cuantitativo de bacterias?
3. ¿Qué tipo de muestras se pueden analizar con este método? Ejemplifique.
4. Mencione las limitaciones del método del recuento de colonias en placa.



# CAPÍTULO III

## IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN ALIMENTOS

### PRÁCTICA Nº 10

#### RECuento DE MESÓFILOS, TERMÓFILOS Y PSICRÓFILOS AEROBIAS

##### **I. Introducción:**

El número de microorganismos mesófilos aerobios encontrados en los alimentos por el método del recuento en placa es uno de los indicadores microbiológicos de la calidad de los alimentos más frecuentemente usados, este recuento estima la flora total pero sin especificar tipos de gérmenes.

Este recuento es utilizado para determinar si la limpieza, desinfección y el control de temperaturas durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado de forma adecuada. También permite obtener información sobre alteraciones incipientes en los alimentos, la probable vida útil del producto, la descongelación incontrolada de los alimentos congelados o las fallas en el mantenimiento de las temperaturas de refrigeración en alimentos fríos.

Las bacterias psicrófilos son capaces de crecer de 0-7 °C y producir colonias viables en 7 días. Su temperatura óptima y máxima está entre 15 y 20 °C y la mínima, 5°C o menos. Hay pocos alimentos obligados, la mayoría de los microorganismos que crecen en alimentos refrigerados son psicrófilos, por otro lado, las bacterias



termófilas tienen una temperatura óptima por encima de 45 °C. En muchos casos, de 55°C o superior, y son importantes en el caso de alimentos mantenidos a elevadas temperaturas

## II. Objetivos:

Objetivo general: Realizar recuento de microorganismos mesófilos, psicrófilos y termófilos a partir de alimentos de origen animal o vegetal.

### Objetivos específicos

- Identificar los diferentes métodos de recuento en placa para estos microorganismos.
- Aprender a que tipos de alimentos se debe investigar estos microorganismos.

## III. Fundamento:

El recuento de la flora aerobia mesófila, psicrófila y termófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Agua peptona 0.1%	Cuchillos-cucharas	Homogenizador
Agar Plate count	Gradilla	Balanza
Alcohol al 70%	Cajas de Petri	Incubadora
	Algodón	

**V. Muestra:** diferentes clases de alimentos. (Sólidos, semisólidos, líquidos, a temperatura ambiente, refrigerados)

## VI. Procedimiento:

Recuento de mesófilos aerobios, psicrófilos y termófilos



- Preparar las diluciones seriadas
- Marcar tres cajas de Petri con fecha, muestra, dilución y No. del grupo.
- Marcar una caja como control del medio y otra como control del diluyente.
- Pipetear a las cajas de Petri 1 ml de cada una de las diluciones y 1 ml del diluyente.
- Verter 15 ml de agar Plate count fundido a 45°C en cada una de las cajas.
- Mezclar de igual forma que para el recuento en placa.
- Dejar solidificar.
- Invertir las cajas e incubar por 24-48 horas a 35-37°C en caso de aerobias mesófilas
- Invertir las cajas e incubar por 10 días a 7 °C en caso de psicrófilas aerobias
- Invertir las cajas e incubar por 3 días a 55°C en caso de termófilos aerobios
- Luego de cumplido el tiempo de incubación, sacar las cajas y evaluar el control del medio y del diluyente; posteriormente proceder al conteo de las cajas con las diluciones, si no se presentan problemas en los controles y si se observa mayor población de microorganismos en las cajas menos diluidas.

## **VII. Taller:**

1. Consultar el valor permitido de aerobias mesófilas, psicrófilas y termófilas para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de estos microorganismos en los alimentos?
4. ¿A qué productos se les debe realizar determinación de aerobia mesófila, psicrófila y termófila?
5. Investigar fundamento del medio de cultivo agar Plate Count



## PRÁCTICA Nº 11

### NMP DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL O VEGETAL

#### I. Introducción:

La *Escherichia coli* es huésped constante del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente, por su especificidad está considerado un indicador de contaminación fecal, su presencia en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal y por consiguiente, existe el riesgo de que hayan podido llegar al alimento microorganismos patógenos de procedencia entérica (Escobar, 1994, p 68).

Es el indicador de contaminación fecal universal y de hecho es el marcador sanitario ideal en el análisis microbiológico de los alimentos crudos o que no han sido sometidos a ningún tratamiento para asegurar su inocuidad.

La *E. Coli* Tiene el inconveniente de vivir poco tiempo en el ambiente externo por lo que su presencia en los alimentos indica contaminación reciente.

En los alimentos que han sido sometidos a un tratamiento de higienización eficaz que asegure su inocuidad al consumidor, está indicado por regla general, la determinación de coliformes totales incubados a 37°C, que fermentan la lactosa con producción de gas en el medio caldo lactosa bilis verde brillante (2%), su presencia no tiene necesariamente relación con una contaminación de origen fecal y, consiguientemente, con la posible presencia en los alimentos de microorganismos patógenos de naturaleza entérica, sino que es solo una indicación de deficiencias o fallos en el tratamiento industrial, recontaminaciones después de los procesos de los alimentos y, en última instancia, de su calidad higiénica. Ya sea por mala calidad higiénica en el proceso o falta de higiene de los manipuladores.



## II. Objetivos:

### Objetivo general:

Determinar coliformes totales y fecales, a partir de productos de origen animal o vegetal.

### Objetivos específicos:

- Identificar la presencia de de coliformes totales y fecal en alimentos
- Analizar La importancia de la identificación de E. Coli en alimentos
- Conocer a que grupos de alimentos se debe investigar coliformes totales y E. Coli.

## III. Fundamento:

Esta técnica se basa en la determinación de coliformes totales o gérmenes del grupo coli-aerógenos, incubados a 37°C, que fermentan la lactosa con producción de gas en el medio caldo lactosa bilis verde brillante (2%)

La determinación de coliformes totales indica deficiencias o fallos en el tratamiento industrial, y la *E. Coli* contaminación de origen fecal.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
bilis verde brillante lactosa con Durham	Cuchillos-cucharas	Homogenizador
Agar EMB	Pipetas 1 y 10ml.	Balanza
Agua peptona 0.1%	Asa bacteriológica	Incubadora
Medio SIM	Bolsas de polipropileno	
Reactivo de Kovacs	Gradilla	
Coloración de gram	Tubos de ensayo	
alcohol al 70%	Cajas de Petri	



Agar Cromocult

Algodón

### **V. Muestra:**

Diferentes clases de alimentos (Sólidos, semisólidos, líquidos).

### **VI. Procedimiento:**

Procedimiento de coliformes totales

1. Desinfectar con alcohol al 70% toda el área de trabajo y el recipiente que contiene la muestra a analizar.
2. Pesar 10 g o medir 10 ml de la muestra y realizar tres o más diluciones de igual forma que para el recuento en placa.
3. Sembrar por triplicado 1 ml de cada una de las diluciones en tubos que contengan 10 ml de bilis verde brillante lactosa con tubos Durham preparados a concentración simple.
4. Mezclar e incubar por 24-48 horas a 35-37°C.
5. Leer a las 24 horas los tubos positivos; los negativos, reincubarlos otras 24 horas.
6. Repicar mediante una asada todos los tubos positivos al agar EMB e incubar por 24 horas a 35-37°C.
7. Anotar todos los tubos positivos que fueron confirmados por crecimiento característico en agar EMB (colonias con brillo verde metálico).
8. Buscar en la tabla No.2 el resultado de NMP.
9. Expresar el resultado como NMP de coliformes totales = No. de bacterias / g ó ml.

Número más probable (NMP) coliformes de origen fecal

Test de Mac-Kenzi



A partir de los tubos positivos con producción de gas del NMP de coliformes totales, transferir de cada tubo una asada de cultivo en:

- Caldo lactosado bilis verde brillante al 2% conteniendo tubo de fermentación de Durham.
- Caldo Triptofano
- Incubar los tubos 45c +0.5c por 48 horas en el baño de agua  
Leer el test de Mac-Kenzei como sigue:
- Observar la producción de gas en el caldo lactosado bilis verde brillante al 2%
- Revelar el caldo triptófano, adicionando 0,2 ml del reactivo de Kovacs, agitar suavemente y observar presencia de anillo rojo cereza en la superficie de la capa del alcohol amílico cuando la prueba es positiva o del color original de medio cuando la prueba es negativa.
- Considerar como coliformes de origen fecal los que demuestren positividad en ambas pruebas, Gas: positivo, Indol: Positivo
- Confrontar los resultados con la tabla de NMP.

Determinación de coliformes fecales por Fluorocult:

Al utilizar este medio, se evidencia la acción de la glucuronidasa producida por la *E. Coli*, mediante la fluorescencia del medio al colocar los tubos bajo la luz UV y al agregar gotas de reactivo de kovacs se evidencia la producción de indol por la *E. Coli*.

Se incuba el tubo por 24 horas y se lee por fluorescencia.

Determinación de coliformes totales y *e. Coli* en agar Chromocult

- Pesar 10 gr. de muestra y macerarlos
- Diluirlos en 90 ml de agua peptonada estéril



- Tomar con una pipeta 1 y 0.1 ml y servirlos en cajas Petri
- Servir agar Chromocult fundido a 50°C
- Homogenizar con movimientos en cruz
- Dejar solidificar
- Incubar invertido a 35± 2°C por 24 h
- Realizar la lectura e informar de acuerdo al factor de dilución, observe las colonias moradas típicas de *E. coli* y las colonias de coliformes rosadas

#### **VII. Taller:**

1. Consultar el valor permitido de coliformes totales y *E. Coli* para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de estos microorganismos en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de agar Chromocult y bilis verde brillante.
5. ¿A qué tipos de alimentos se les hace la investigación de *E. Coli*?

## **PRÁCTICA Nº 12**

### **RECuento DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* COAGULASA POSITIVA**

#### **I. Introducción:**

*S. aureus* es un patógeno importante para el ser humano, formando parte también de su microbiota saprofita habitual. Está implicado en toxiinfecciones alimentarse, en la mayoría de los casos, a partir de la manipulación de portadores nasales de este microorganismo, como consecuencia de una carencia de buenas prácticas de higiene.



La intoxicación estafilocócica se produce por el consumo de alimentos en los que se ha multiplicado *S. aureus*, produciendo toxinas muy termorresistentes, activas por vía oral, que se encuentran ya preformadas en el alimento (Escobar, 1994, p 94).

Los estafilococos enterotoxigénicos pueden encontrarse, por lo tanto, ya en los alimentos en el momento de su obtención, en especial en los de origen animal, o bien llegar posteriormente a ellos a partir principalmente de los manipuladores.

## II. Objetivos:

### Objetivo general:

Estudiar la importancia de la identificación de *Staphylococcus aureus* como indicador de calidad en los alimentos y las diferentes técnicas para su identificación.

### Objetivos específicos:

- Aprender el fundamento de los medios de cultivo para el aislamiento del *Staphylococcus aureus*
- Identificar las posibles fuentes de contaminación de *Staphylococcus aureus*
- Realizar recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva a partir de alimentos de origen animal o vegetal.

## III. Fundamento:

En el control sanitario de los alimentos es importante investigar *Staphylococcus aureus*, es necesario conocer su presencia o ausencia en los productos alimenticios con la finalidad de verificar la efectividad de las medidas aplicadas en el manejo higiénico del alimento por parte del operario.

## IV .Reactivos, Materiales y Equipos

Reactivos	Materiales	Equipos
Agar Baird Parker	Asa redonda escobillón estéril	o Balanza



Agua peptonada estéril Pipeta de 0.1 ml Homogenizador  
al 2%  
Plasma fresco Bolsas de polietileno  
Erlenmeyer  
Morteros  
Mecheros

### V. Muestras:

Quesos.

### VI. Procedimiento:

1. Preparar diluciones decimales y tomar 0.1 m.
2. Inocular la caja Petri con agar Baird Parker servido y extender por aislamiento con un asa redonda o triangular de vidrio (asa de jockey)
3. Incubar invertida por  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 24 h.
4. Realizar la lectura presuntiva de *S. aureus* a las colonias negras con borde opaco y halo transparente
5. Transferir al menos 5 colonias sospechosas a tubos con plasma
6. Incubar a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 6 horas
7. Realizar el cálculo de *S. aureus* de acuerdo al número de colonias coagulasa positivas sobre las negativas, con una regla de tres.

Para poder realizar la confirmación se necesita como mínimo 5 colonias sospechosas.

5 colonias sospechosas -----→ N° tubos positivos

Recuento total de colonias sospechosas *S. aureus* -----→ X

Ejemplo:



5 -----→ 4 tubos positivos

48 -----→ X

48 x 4

X = \_\_\_\_\_ = 38 ufc/ g/ml

5

Prueba simplificada para determinación de *staphylococcus coagulasa* Instituto Nacional de Salud:

Para la identificación rápida de colonias de *Staphylococcus aureus* sobre medios solidos

1. Sembrar las diluciones del alimento en placas de agar selectivo para estafilococo según Bair Parker
2. Incubar invertida por  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 24 h.
3. Después de la incubación sacar las cajas y calentar las placas en una incubadora durante 2 horas a  $60^\circ \text{C}$
4. Agregar sobre la superficie del medio de 10 a 15 ml de azul de toluidina DNA, previamente fundido, incubar las placas durante 3 horas.

Cada colonia *Staphylococcus aureus* producirá sobre la superficie del agar azul de toluidina DNA, una zona rosada brillante.

## VII. Taller:

1. Consultar el valor permitido de *Staphylococcus aureus* para el producto con el que usted trabajó según la normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?



3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de este microorganismo en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de agar Bair Parker
5. ¿A qué tipos de alimentos se les hace la investigación de *Staphylococcus aureus*?
6. Mencione medidas preventivas para evitar o disminuir la contaminación por *Staphylococcus aureus*.

## PRÁCTICA Nº 13

### INVESTIGACIÓN DE *SALMONELLA* EN ALIMENTOS

#### I. Introducción:

La *Salmonella* se encuentra en pequeñas cantidades en los alimentos, salvo en los casos de toxicoinfección; por tanto, para que quede en manifiesto la contaminación microbiana, es necesario utilizar técnicas específicas.

Hay varios métodos de identificación de *Salmonella*, pero todos son similares en principio y comprenden varias etapas como el enriquecimiento no selectivo, enriquecimiento selectivo, siembra en placas con medios sólidos, pruebas bioquímicas para caracterización de colonias sospechosas, confirmación serológica.

Todas las *Salmonellas* deberían ser consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano y los animales. La única forma de transmisión es la oral, por lo que es de suma importancia el análisis de los alimentos para detectar su presencia en ellos (Escobar, 1994, p 79).

Los alimentos más contaminados son los de origen animal, leche cruda y productos lácteos, carnes y derivados, aves, huevos crudos, ovoproductos. La infección se disemina en los animales por los alimentos concentrados para animales como, por ejemplo, harinas de pescado, y de sangre



## II. Objetivos:

### Objetivo general:

Estudiar la importancia de investigar la presencia de *Salmonella* en alimentos de origen animal y en derivados vegetales y los diferentes métodos de identificación.

### Objetivos específicos:

- Identificar las características de crecimiento de la *Salmonella* en el medio de cultivo específico
- Realizar el protocolo de detención, identificación y recuento correctamente.

## III. Fundamento:

La importancia de la investigación de *Salmonella* se fundamenta básicamente por la peligrosidad de esta bacteria para el ser humano, ya que es considerada potencialmente patógena y productora de toxico-infecciones en el hombre.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Agar Rambach	Erlenmeyer de 250 ml	Incubadoras a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$
Caldo base Salmosyst,	Cajas Petri estériles	Balanza
Agar XLD	Probeta de 50 ml estéril	
Agar SS	Marcador	
	Mecheros	

## V. Muestra:



Carnes, pescados, huevos, quesos.

#### **VI. Procedimiento:**

1. Pesar 25 gr de la muestra y macerarla
2. Servir en un Erlenmeyer con 225 ml de caldo Salmosyst
3. Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 6 horas.
4. Adicionar tableta selectiva Salmosyst.
5. Incubar por 24 horas
6. Con un asa redonda transferir del caldo Salmosyst por aislamiento en agar XLD , SS y Agar Rambach
7. Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h
8. Realizar la lectura de colonias sospechosas e informar presencia/ ausencia
9. Realizar bioquímicas y serología si es necesario

#### Pruebas bioquímicas

- Prueba de la oxidasa
- Reducción de nitrato con la prueba de Griess
- Prueba de movilidad
- Prueba urea
- Prueba de indol
- Citrato
- MR-VP
- Prueba lisina
- TSI
- Fenilalanina.

#### **VII. TALLER**



1. Consultar el valor permitido de *Salmonella* para el producto con el que usted trabajó según la normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de este microorganismo en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de Agar Rambach, Caldo Salmosyst
5. ¿A qué tipos de alimentos se les hace la investigación de *Salmonella*?
6. Explique las diferentes etapas para la identificación de *Salmonella* en alimentos.

## PRÁCTICA Nº 14

### INVESTIGACIÓN DE *VIBRIO CHOLERA*

#### I. Introducción:

El *Vibrio cholerae* pertenece a la familia Vibrionaceae, genero Vibrio. Es un bacilo pequeño, curvo, móvil por medio de un flagelo polar único. No esporulado, no encapsulado, gram-negativo, aerobio y anaerobio facultativo, oxidasa positivo. El *Vibrio cholerae* O1 es el agente causal del cólera, enfermedad diarreica producida por una toxina segregada por el microorganismo al intestino, vive libremente en aguas dulces y solo causa infección en seres humanos, la enfermedad se transmite a través del alimento contaminado, participando en su difusión los mariscos de agua dulce y pescados, sobre todo en lugares donde se consume crudo. Es poco frecuente el contacto directo persona a persona, por lo tanto se mantiene en comunidades donde el suministro de agua potable y el sistema cloacal son inadecuados e inexistentes.



No todas las personas que ingieren *V. cholerae* se enferman, se requiere para ello consumir un número elevado de microorganismo que, además, deben sobrevivir las defensas del individuo. (SALGADO Pag 103 2006)

## II. Objetivos:

### Objetivo general:

Estudiar la importancia de investigar la presencia de *Vibrio cholerae* en alimentos de origen animal y los diferentes métodos de identificación.

### Objetivos específicos:

- Identificar las características de crecimiento de *Vibrio cholerae* en el medio de cultivo específico.
- Comprender el fundamento del medio de cultivo para identificación de *Vibrio cholerae*.

## III. Fundamento:

La importancia de la investigación de *Vibrio cholerae* se fundamenta básicamente por la peligrosidad de esta bacteria para el ser humano, ya que es considerada potencialmente patógena y productora de toxicoinfecciones en el hombre.

## IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Agar TCBS	Erlenmeyer de 250 ml	Incubadoras a 35±2°C
Agua peptonada alcalinizada	Cajas Petri estériles	Balanza
Desoxicolato de sodio	Probeta de 50 ml estéril	
Oxidasa	Marcador	
	Mecheros	
	Morteros	



## **V. Muestra:**

Productos de la pesca.

## **VI. Procedimiento:**

1. Pesar 25 gr de la muestra y macerarla.
2. Servir en un Erlenmeyer con 225 ml de agua peptonada alcalinizada.
3. Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 6-8 horas.
4. Con un asa redonda transferir del caldo por aislamiento en agar TCBS.
5. Incubar a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h.
6. Realizar la lectura de colonias sospechosas e informar presencia/ ausencia.
7. Realizar bioquímicas y serología si es necesario.

### Pruebas bioquímicas

- Prueba de la oxidasa.
- Prueba de la cuerda.

Si las pruebas anteriores resultan positivas realizar pruebas Bioquímicas:

- Fermentación de carbohidratos.
- Descarboxilación de aminoácidos.
- Reducción de Nitratos.
- TSI.
- Reacción Kliger.
- Coloración de Gram.

## **VII. TALLER**



1. Consultar el valor permitido de *Vibrio Cholerae* para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. ¿Según los resultados arrojados en la práctica, su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de este microorganismo en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de Agar TCBS, OXIDASA y Prueba de la cuerda
5. ¿Qué tipos de alimentos se le hace la investigación de *Vibrio Cholerae*?

## PRÁCTICA Nº 15

### RECuento DE ESPORAS *CLOSTRIDIUM* SULFITO-REDUCTOR

#### I. Introducción:

El género *Clostridium* se define como bacilos Gram-positivos, al menos en las etapas tempranas del crecimiento, usualmente móviles por flagelos peritricos, con excepción de *Clostridium perfringens*; presentan esporas termorresistentes ovoides subterminales que deforman el cuerpo del bacilo (Acosta y González, 1995, p 298).

Son anaerobios estrictos y algunas cepas presentan aerotolerancia. Su temperatura óptima de crecimiento es 37°C; crecen a pH entre 4,7 y 9,0 pero su óptimo es de 7,0. Se desarrollan a niveles de Aw entre 0,94 y 0,97 dependiendo de la cepa.

*Clostridium perfringens* es una bacteria anaeróbica (incapaz de crecer en la presencia de oxígeno), con forma de bastón, Gram-positiva y formadora de esporas, fermenta rápidamente la glucosa y lactosa; tiene pH óptimo de 7,0, temperatura de 46°C, nivel de Aw de 0,93 a 0,95 y resiste concentraciones de 3% de NaCl y 100 mg de nitrito de sodio (Acosta y González, 1995, p 299).



Está distribuida ampliamente en el medio ambiente y se encuentra frecuentemente en el intestino de los humanos, así como también en el de varios animales domésticos y salvajes. Sus esporas sobreviven en el suelo, en los sedimentos y en las áreas sujetas a la polución fecal tanto humana como animal.

En la mayoría de los casos, la causa actual del envenenamiento por *C.perfringens* es el abuso en las temperaturas de los alimentos preparados. Un número pequeño de organismos está presente normalmente después de la elaboración del producto, y pueden multiplicarse hasta llegar a niveles muy peligrosos durante su enfriamiento y almacenamiento. Las carnes y sus derivados son los más implicados.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Estudiar la importancia de identificar la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito-reductor a partir de productos cárnicos.

### **Objetivos específicos:**

- Identificar las características morfológicas de crecimiento de la bacteria.
- Comprender el fundamento del medio SPS.

## **III. Fundamento:**

Algunas especies del genero *Clostridium* tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro, que en presencia de citrato férrico dan colonias negras.

La importancia de su identificación en alimentos radica en la enfermedad causada por esta bacteria la cual es conocida como envenenamiento alimentario.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos	Materiales	Equipos
Agua peptonada	Pipetas estériles 1 ml	Incubadora



Agar Sps	Gradillas	Balanza
Reactivos de Gram	Portaobjetos	Baño serológico
Caldo tioglicolato	Tubos tapa rosca	refrigerador a 0-5 °C
SIM,	Cronometro	Campanas de
caldo nitrato,		anaerobiosis
Agar gelatina y agar		Microscopio
Kligler.		
peróxido de hidrógeno al		
3%		

#### **V. Muestra:**

Carnes y derivados.

#### **VI. Procedimiento:**

Recuento de esporas *Clostridium* sulfito-reductor.

Recuento en placa

1. Preparar las diluciones del homogenizado de igual que para el recuento en placa, tener cuidado de que al homogenizar no se aumente demasiado la temperatura.
2. Marcar tres (3) cajas de Petri con fecha, muestra, dilución y No. del grupo.
3. Marcar dos (2) cajas, una como control del diluyente y otra como control del medio.
4. Pipetear en las cajas de Petri 1 ml de cada una de las diluciones y 1 ml del diluyente en la caja marcada como control del diluyente.
5. Verter 15 ml de agar SPS fundido a 45°C en cada una de las cajas.
6. Mezclar de igual forma que para el recuento en placa.
7. Dejar solidificar.



8. Colocar las cajas con las tapas hacia arriba en la jara de anaerobiosis.
9. Incubar a 37°C por 48 horas.
10. Sacar las cajas y evaluar el control del medio y del diluyente.
11. Seleccionar las cajas entre 30 y 300 colonias y contar todas las colonias negras, calcular el número de esporas *Clostridium* sulfito-reductor por gramo o mililitro de alimento multiplicando por el inverso de la dilución.

#### Recuento en tubo

1. Preparar las diluciones del homogenizado de igual forma que para el recuento en placa.
2. Marcar tres (3) tubos con fecha, muestra, dilución y No. del grupo.
3. Pipetear en los tubos 1 ml de cada una de las diluciones.
4. Calentar en el baño serológico a 80°C durante 10 minutos cada una de las diluciones.
5. Enfriar en un beaker con agua y hielo.
6. Verter 12 ml de agar SPS fundido a 45°C en cada uno de los tubos.
7. Dejar solidificar.
8. Adicionar una segunda capa (de aproximadamente 3ml) de agar SPS fundido a 45°C.
9. Dejar solidificar.
10. Incubar a 37°C por 72 horas.
11. Seleccionar los tubos entre 30 y 300 colonias y contar todas las colonias negras, calcular el número de esporas *Clostridium* sulfito-reductor por gramo o mililitro de alimento multiplicando por el inverso de la dilución.

#### Confirmación de las colonias de *Clostridium perfringens*

1. Elegir como mínimo tres (3) colonias características (negras) y sembrar cada una en tubos con caldo tiogicolato o caldo de carne cocida.



2. Incubar en baño serológico a 46°C por 3-4 horas.
3. Realizar un extendido de cada uno de los cultivos y colorearlos con Gram.
4. Observar al microscopio, bacilos grandes con extremos redondeados Gram-positivos con esporas subterminales.
5. Realizar la prueba de la catalasa a partir del cultivo de tioglicolato: tomar 3 ml del cultivo y adicionarle 0.5 ml de peróxido de hidrógeno al 3%, mezclar y observar desprendimientos de burbujas de gas, lo que indica una reacción positiva.
6. Inocular a partir del cultivo de tioglicolato en SIM, caldo nitrato, agar gelatina y agar Kligler.
7. Incubar a 37°C por 18-24 horas.
8. Considerar positivas las pruebas para *Clostridium perfringes* cuando se presentan los siguientes resultados:

Catalasa	Negativa
Movilidad	Negativa
Nitratos	Positiva
Licuefacción de la gelatina	Positiva
Lactosa	Positiva

Realizar el conteo final sobre la cantidad total de colonias contadas y el número de confirmadas positivas.

Ejemplo:

Total de colonias contadas en dilución  $10^{-2} = 3 \longrightarrow 300$

Elegidas para realizar las pruebas = 6

Colonias que resultaron positivas = 4

$$300 \times 4 = 200 \text{ bacterias / g ó ml}$$



Reporte de *Clostridium perfringes* =  $\frac{\quad}{6}$

## VII. TALLER:

1. Consultar el valor permitido de *Clostridium* sulfito-reductor para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. Investigar el fundamento de agar SPS , caldo de carne y caldo tioglicolato
4. ¿Aaaaué tipos de alimentos se le hace la investigación de *Clostridium* sulfito-reductor y cuál es la importancia de este control?

## PRÁCTICA Nº 16

### RECuento DE *BACILLUS CEREUS*

#### I. Introducción:

*Bacillus cereus*, bacilos formadores de esporas termorresistentes, aerobio, Gram-positivo, catalasa positivo y oxidasa negativo, común en el suelo y habitualmente se le encuentra en alimentos crudos, secos y elaborados como son los cereales y sus productos (arroz, pastas etc.); leche y sus derivados; huevos y productos derivados; postres en base a salsas de vainilla, budines, especias y yerbas.

Los síntomas de las toxico infecciones alimentarias producidas por *Bacillus cereus* se deben a dos tipos distintos de exotoxinas que son excretada al medio interno: la toxina diarreica y toxina emética. (Control e higiene de los alimentos Pág. 124).



La intoxicación alimentaria causada por *B. cereus* se produce debido a la ingestión de alimentos, cuyo contenido del microorganismo sea mayor de 105 unidades formadoras de colonia/gramo (ufc/g).

Los alimentos no deben permanecer a temperatura ambiente una vez cocidos ya que cerca del 50% de los alimentos e ingredientes alimentarios están contaminados hasta cierto punto (<10/g) por este organismo. La ingestión de alimentos que han sido conservados a temperatura ambiente después de su cocción, permite que las esporas, las cuales sobreviven la ebullición, germinen y se multipliquen a niveles altos y verter las toxinas al alimento, para que finalmente provoquen la intoxicación. (Escobar, 1994, p 147).

## II. Objetivos:

### Objetivo general:

Realizar recuento de *Bacillus cereus* a partir de diferentes productos.

### Objetivos específicos:

- Identificar las características morfológicas de crecimiento del *B. cereus* en el medio de cultivo
- Aprender manejo adecuado de muestras para la siembra
- Comprender importancia de la investigación de *B. cereus* en alimentos

## III. Fundamento:

*Bacillus cereus* es una bacteria que puede encontrarse con cierta facilidad en una gran proporción de alimentos. Al ser un microorganismo esporulado, es capaz de tolerar durante largos períodos de tiempo condiciones medioambientales adversas. Tiene la capacidad de producir una enfermedad alimentaria que se presenta después de la ingestión de alimentos en los que ha crecido el organismo y formado sus toxinas, de aquí radica la importancia de su investigación en Alimentos.



#### IV. Reactivos, materiales y equipos:

Reactivos	Materiales	Equipos
Agua peptona 0.1%	Cuchillos-cucharas	Homogenizador
Agar Cereus según Mossel	Pipetas 1 y 10ml.	Balanza
Agar Gelatina	Asa bacteriológica	Incubadora
Agar Almidón	Bolsas de polipropileno	
Agar Citrato Simmons	Gradilla	
Agar Urea	Tubos de ensayo	
Agar SIM		
Caldo nitrato		
Caldo MR-VP		
Caldo MR-Glucosa (5%)		
Caldo MR-Xilosa (5%)		
Caldo MR-Arabinosa (5%)		
Caldo cerebro corazón		
Coloración de gram		
Reactivo de Kovacs		
Solución lugol		
Griess		
Alfa naftol 5%		
KOH 40%		
Rojo de metilo		
Peróxido hidrogeno 3%		
Oxidasa		

#### V. Muestra:

Leche y sus derivados; huevos y productos derivados; postres en base a salsas de vainilla, budines, especias y yerbas.

#### VI. Procedimiento:

Recuento de *Bacillus cereus*.

1. Preparar las diluciones de igual forma que para el recuento en placa.



2. Marcar tres cajas de Petri que contienen agar Cereus según Mossel con fecha, muestra, dilución y No. del grupo.
3. Marcar dos cajas que contienen agar Cereus según Mossel, una como control del medio y la otra como control del diluyente.
4. Adicionar 0.1 ml de cada una de las diluciones y 0.1 ml del diluyente en las cajas marcadas respectivamente que contienen el medio agar Cereus según Mossel.
5. Extender con una varilla la muestra sobre toda la superficie del medio, hasta que la superficie quede seca.
6. Incubar por 24-48 horas a 35-37°C.
7. Seleccionar las cajas que contengan entre 20 a 200 colonias y contar las colonias características (colonias rosadas con bordes regulares e irregulares, con un halo denso a su alrededor debido a la lecitinasa). Realizar el conteo final multiplicando por el inverso de la dilución y por 10.
8. Tomar al menos tres UFC características, realizarles la prueba de la catalasa y la coloración de Gram. Si son catalasa positiva y, a la coloración de Gram, se observan bastones Gram-positivos con extremos más o menos cuadrados en cadenas cortas o largas y entrelazadas con espora subterminal, central o elipsoidal que no deforman el cuerpo bacteriano, realizar la identificación bioquímica.

#### Identificación bioquímica de *Bacillus cereus*

- Subcultivar tres colonias características en caldo cerebro corazón.
- Realizar la siguientes pruebas bioquímicas:
- Hidrólisis de la gelatina: sembrar dos líneas paralelas en agar gelatina e incubar a 37° por 24 horas.
- Hidrólisis de almidón: sembrar dos líneas paralelas en agar almidón e incubar a 37°C por 24 horas.



- Agar Urea: inocular el fondo por picadura y el bisel por estría e incubar 37°C por 24 horas.
- Agar Citrato Simmons: inocular el fondo por picadura y el bisel en línea e incubar 37°C por 24 horas.
- Movilidad: inocular el fondo (Agar SIM) por picadura e incubar 37°C por 24 horas.
- Reducción de nitratos: caldo Nitrato.
- Producción acetoina: caldo MR-VP.
- Fermentación de carbohidratos: glucosa, xilosa, arabinosa.
- Comparar los resultados con las características bioquímicas de *Bacillus cereus*.
- Hidrólisis de la gelatina: zonas claras alrededor de las colonias luego de cubrir las colonias con reactivo sublimado de Hg.
- Hidrólisis de almidón: zonas claras alrededor de las colonias luego de cubrir las colonias con lugol.
- Agar Urea: tubos con reacción ácida (amarillos), urea-negativos.
- Agar Citrato Simmons: medio de cultivo verde citrato negativo.
- Móvil: crecimiento desplazado a través de la línea de siembra.
- Reducción de nitratos: aparición de un color rojo después de agregar el reactivo Griess.
- Producción acetoina: aparición de un color rojo luego de adicionar el alfa naftol y el hidróxido de potasio.
- Fermentación de carbohidratos (glucosa, xilosa, arabinosa) por medio de viraje del medio a amarillo.

Sobre el número total de colonias a las 48 horas de incubación y la proporción de las colonias confirmadas, hacer el cálculo utilizando como factor de corrección la siguiente relación:

Recuento en Dilución  $10^{-2}$ : 6-----600



Colonias examinadas: 3

Colonias positivas: 2

600x 2 = 400/g. o ml.

---

3

## VII. TALLER:

1. Consultar el valor permitido de *Bacillus Cereus* reductor para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. ¿Según los resultados arrojados en la práctica, su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de este microorganismo en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de Agar Cereus según Mossel.
5. ¿A qué tipos de alimentos se les hace la investigación de *Bacillus Cereus*?

## PRÁCTICA 17

### RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS

#### I. Introducción:

Los mohos y las levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza, por lo tanto se pueden encontrar como carga normal de los alimentos con bajo pH y  $A_w$ , alto contenido de sólidos como sal o azúcar, temperaturas bajas de almacenamiento o presencia de antibióticos, pues son capaces de desarrollarse en las condiciones más adversas (Escobar, 1994, p 198).

La mayoría de los mohos se desarrollan entre 15°C Y 30°C y su temperatura óptima oscila entre 20°C y 25°C. Crecen también en ambientes con alta temperatura, como los túneles de secado de pastas alimenticias. Ciertos mohos termorresistentes se



comportan como agentes térmicos, así sucede con *Aspergillus candidus*, que es frecuente en granos, cereales y es capaz de elevar espontáneamente la temperatura de un silo hasta 55°C.

Estos microorganismos pueden utilizar sustratos complejos como: pectinas, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, proteínas, lípidos, etc.

Los cambios que induce este tipo de microorganismos pueden acarrear la alteración organoléptica de los alimentos, su modificación nutricional, sus características de conservación y la producción de toxinas. (Control e higiene de los alimentos Pág. 149)

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Realizar recuento de mohos y levaduras en productos de origen animal y vegetal.

### **Objetivos específicos:**

- Entender la importancia sanitaria de la presencia de mohos y levaduras en alimentos.
- Reconocer las características de crecimiento de los mohos y levaduras en agar OGY.

## **III. Fundamento:**

La investigación de mohos y levaduras en alimentos es de gran importancia por los cambios en las características organosensoriales que producen, estos microorganismos son responsables del mal olor, sabor, decoloración o pigmentación de la superficie de los alimentos, son los grandes alteradores de frutas, hortalizas, leguminosas, tubérculos y granos.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**



Reactivos	Materiales	Equipos
Agua peptona 0.1%	Cuchillos-cucharas	Balanza
Agar OGY	Pipetas 1 y 10ml.	Homogenizador
Alcohol al 70%	Asa bacteriológica	Incubadora
	Bolsas de polipropileno	
	Gradilla	
	Tubos de ensayo	
	Cajas de Petri	
	Algodón	

#### **V. Muestra:**

Frutas, verduras, quesos.

#### **VI. Procedimiento:**

Determinación de mohos y levaduras.

1. Preparar las diluciones de igual forma que para el recuento en placa.
2. Marcar tres cajas de Petri con fecha, muestra, dilución y No. del grupo.
3. Marcar una caja como control del medio y otra como control del diluyente.
4. Pipetear a las cajas de Petri 1 ml de cada una de las diluciones y 1 ml del diluyente.
5. Verter 15 ml de agar Extracto de malta-oxitetraciclina (OGY) fundido a 45°C en cada una de las cajas.
6. Mezclar de igual forma que para el recuento en placa.
7. Dejar solidificar.
8. Invertir las cajas e incubar a 22°C por 5 a 7 días (envolver las cajas con papel Kraft).
9. Sacar las cajas, evaluar el control del medio y del diluyente.
10. Seleccionar las cajas entre 20 y 100 colonias y multiplicar por el inverso de la dilución.



## **VII. TALLER:**

1. Consultar el valor permitido de mohos y levaduras para el producto con el que usted trabajó según normativa alimentaria.
2. Según los resultados arrojados en la práctica, ¿su muestra cumple con las normas colombianas?
3. ¿Cuál es la importancia de calidad que tiene la determinación de este microorganismo en los alimentos?
4. Investigar el fundamento de Agar OGY
5. ¿Qué tipos de alimentos se le hace la investigación de mohos y levaduras?

# **CAPÍTULO IV**

## **CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS**

### **PRÁCTICA Nº 18**

#### **MICROBIOLOGÍA DE LECHE Y DERIVADOS**

##### **I. Introducción:**



La leche es el producto de secreción de origen animal y sus cualidades sanitarias están influenciadas por muchos factores que intervienen en su curso de producción, elaboración y entrega al consumidor.

Las características nutritivas de los productos lácteos, los convierten en alimentos deseables para el consumidor. Estos mismos valores nutritivos facilitan la proliferación de muchos microorganismos, especialmente aquellos que degradan lactosa con producción de ácido láctico, ocasionando la floculación de una parte de las proteínas los cuales pueden ocasionar cambios indeseables en el producto, los microorganismos y los subproductos son indeseables en la leche y derivados si son capaces de alterar las características organolépticas, produciendo enfermedades o si indican manejo descuidado o antihigiénico del producto.

Los análisis microbiológicos que se le deben practicar a la leche están consignados en el Decreto 616 de 2006 y los de los derivados lácteos se encuentran consignados en el Decreto 2437 de agosto 30 de 1983 y la [Resolución 11961 \(30 de Agosto de 1989\)](#) emanado del Ministerio de Salud, los cuales abarcan los siguientes:

**LECHE PASTEURIZADA:** recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales y fecales.

**LECHE ULTRAPASTEURIZADA:** recuento mesófilos, coliformes totales, coniformes fecales, recuento de esporas anaerobias y recuento de esporas aerobias.

**LECHE EN POLVO:** recuento de microorganismos mesófilos, NMP de coliformes totales, NMP de coliformes fecales, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella*.

**YOGURT O KUMIS:** coliformes totales, fecales, recuento de mohos y levaduras. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).



LECHE FERMENTADA LARGA VIDA: recuento total de microorganismos mesofílicos, recuento total de microorganismos termofílicos (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

HELADOS: recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales, fecales, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Salmonella*. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

CREMA DE LECHE PASTEURIZADA: coliformes totales, fecales, recuento de mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y *Salmonella*. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

MANTEQUILLA: NMP coliformes *totales*, NMP coliformes fecales, Hongos y levaduras, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, *Salmonella* (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

AREQUIPE: recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales, fecales, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, recuento de mohos y levaduras. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

QUESO FRESCO: coliformes fecales, *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva, recuento de mohos y levaduras y *Salmonella*. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

MANJAR BLANCO: recuento total de microorganismos mesofílicos, NMP coliformes totales, NMP coliformes fecales, Hongos y levaduras. (Resoluciones: 2310/86, 1804/89, 11961/89).

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**



Determinar la calidad microbiológica de la leche y productos lácteos, mediante el análisis de los indicadores microbianos específicos, y comparar sus resultados con las normas colombianas.

#### **Objetivos específicos:**

- Determinar coniformes fecales, recuento de mohos y levaduras y recuento de *Staphylococcus coagulasa* positiva a partir de queso fresco.
- Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales y fecales a partir de leche hervida.
- Realizar recuento de mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y de *Staphylococcus coagulasa* positiva a partir de arequipe.
- Realizar pruebas microbiológicas al yogurt y suero costeño.

#### **III. Fundamento:**

El control de calidad en las empresas de lácteos se basa en los análisis microbiológicos y fisicoquímicos, gracias a ellos se logra establecer de forma efectiva y cuantitativa las condiciones higiénico-sanitarias en que se maneja la leche incluyendo desde el ordeño, hasta pasteurización y consumo.

#### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

#### **V. Muestra:**

Leche y derivados.

#### **VI. Procedimiento:**



Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

#### **VII. Taller:**

1. Investigar, según la normativa colombiana, los límites de aceptabilidad de los microorganismos en leches y productos lácteos y compararlos con sus resultados obtenidos.
2. Investigar las consecuencias del crecimiento de hongos en productos lácteos fermentados.
3. Estudiar los diferentes problemas microbiológicos de la leche y productos lácteos y las diferentes vías de entrada al producto.

## **PRÁCTICA Nº 19**

### **MICROBIOLOGÍA DE PESCADOS Y MARISCOS**

#### **I. Introducción:**

Según el Reglamento (CE) núm. 853/2004 se llama le productos de la pesca a todos los animales marinos o de agua dulce (salvo los moluscos bivalvos vivos, los equinodermos vivos, los tunicados vivos y los gasterópodos marinos vivos, así como todos los mamíferos, reptiles y ranas), ya sean salvajes o de cría, incluidas todas las formas, partes y productos comestibles de dichos animales.

En un pescado recién capturado en agua limpias, la contaminación bacteriológica prácticamente es inexistente. La mayor parte de los gérmenes se incorporan dependiendo de la contaminación y la temperatura ambiental, del método de captura



y del procedimiento empleado en el manejo del pescado a bordo de los barcos. Las diferentes manipulaciones que tienen lugar a bordo de los barcos provocan cambios en la cantidad y en la variedad de microorganismos; las manos, botas y ropa del personal, las cajas y otros materiales sucios, hielo de mala calidad y la cubierta del propio barco actúan como vehículo de transmisión. La condición del pescado de alimento altamente perecedero se debe a los procesos autolíticos de degradación rápida y crecimiento microbiano. (Control e higiene de los alimentos).

Los productos como pescados y mariscos contienen gran cantidad de sustancias nutritivas, en las cuales priman las proteínas y son muy escasos los carbohidratos razón por la cual es muy fácil que las bacterias procedan a descomponer las sustancias nitrogenadas de este produciendo colores, sabores y olores desagradables, haciendo al producto inconsumible.

Teniendo en cuenta el proceso por el cual deben pasar los productos de la pesca para llegar hasta los consumidores y su importancia en la alimentación, es importante hacer el debido control microbiológico.

Según las normas nacionales expedidas por el INVIMA en la resolución 776 de 2008, a los productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos, se les realizan las siguientes determinaciones microbiológicas:

**PESCADOS, MOLUSCOS Y CRUSTACEOS FRESCOS ULTRACONGELADOS Y CONGELADOS CRUDOS:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo, *Salmonella* y *Vibrium cholerae*.

**PESCADOS, MOLUSCOS Y MARISCOS PRECOCIDOS:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo, *Salmonella* y *Vibrium cholerae*.

**PESCADOS, MOLUSCOS Y MARISCOS COCIDO:** *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa* positivo y *Salmonella*.



PESCADOS MOLUSCOS Y MARISCOS EN CONSERVAS ESTERILIDAD COMERCIAL: mesófilos aerobios y anaerobios.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Comprobar la calidad microbiológica de los productos de la pesca mediante el análisis de los indicadores microbianos específicos y comparar sus resultados con las normas colombianas.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar recuento de microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus coagulasa positivo*, *Salmonella* y *Vibrium cholerae* a partir de pescados y mariscos.
- Analizar los límites de referencia que deben cumplir los productos de la pesca según las normas nacionales.

## **III. Fundamento:**

El control de calidad microbiológico en los productos pesqueros se basa en identificar los parámetros microbiológicos que deben cumplir dicho producto según los criterios legales, gracias a ellos se logra establecer de forma efectiva las condiciones higiénico-sanitarias en que se maneja los productos pesqueros desde la pesca hasta su comercialización.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utiliza los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

## **V Muestra:**

Productos de la pesca.



## **VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

## **VII. Taller:**

1. Comparar los resultados obtenidos con las normas colombianas y hacer conclusión.
2. ¿Cuáles son las principales enfermedades transmitidas por el consumo de productos marinos crudos contaminados?
3. Investigar los diferentes orígenes de la contaminación de los productos de la pesca.

## **PRÁCTICA Nº 20**

### **MICROBIOLOGÍA DE FRUTAS Y DERIVADOS**

#### **I. Introducción:**

Fruta es la semilla o las partes carnosas de órganos florales, que hayan alcanzado un grado adecuado de madurez y sean adecuadas para el consumo humano. Son alimentos muy saludables, la importancia de este grupo de alimentos radica en el aporte de vitaminas, minerales, fibra y por sus características organolépticas de color, textura, aroma y sabor son atractivos al consumidor.

A diferencia de lo que sucede en la mayoría de los alimentos, las frutas continúan con su proceso de respiración después de la recolección, generando esto una serie de alteraciones, que en muchos casos vienen precedidas de una mala recolección, clasificación y/o almacenamiento, reflejándose esto en el desarrollo de



podredumbres, hecho que no favorece la comercialización, la economía y la calidad del producto.

Por otra parte los cultivos frutales están a la intemperie, el viento puede llevar los microorganismos del suelo a las frutas que no contactan directamente con este, además del aire, los insectos juegan un papel muy importante. Son numerosos los insectos parásitos que, además de picar las frutas, no sólo contaminan sus tejidos, sino que las contagian con microbios fitopatógenos. Para una buena obtención de una fruta es importantes practicar las Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufacturas.

Según el INVIMA, a las frutas y derivados se les realizan las siguientes determinaciones microbiológicas:

**PULPA SIN TRATAMIENTO TÉRMICO CONGELADAS O NO RECuento:** E. Coli ufc/g. o ml., recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml., Detección de *Salmonella*/25 gr. Resolución de 3929 de 2013.

**PULPA PASTEURIZADOS, CONGELADOS O NO:** recuento de microorganismos mesófilos ufc/g. o ml., recuento E. Coli ufc/g. o ml., recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml.. Resolución de 3929 de 2013.

**PULPA AZUCARADA PASTERIZADA:** recuento de microorganismos mesófilos ufc/g. o ml., recuento E. Coli ufc/g. o ml., recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml.. Resolución de 3929 de 2013.

**PULPAS DE FRUTAS ULTRAPASTEURIZADAS (Resolución 7992 de junio 21-91):** recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y esporas de *Clostridium* sulfito-reductor.

**PULPAS DE FRUTAS CONCENTRADAS CON DOS O MÁS FRUTAS (Resolución 7992 de junio 21-91):** recuento de mesófilos aerobios, NMP coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y esporas de *Clostridium* sulfito-reductor.



FRUTAS EN ALMÍBAR (Resolución 7992 de junio 21-91): recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y esporas de *Clostridium* sulfito-reductor.

MERMELADA DE FRUTAS (Resolución 15789/84): recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y esporas de *Clostridium* sulfito-reductor.

JALEA DE FRUTAS (Resolución 15789/84): recuento de mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales, recuento de mohos y levaduras y esporas de *Clostridium* sulfito-reductor.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Realizar el control de calidad microbiológico a frutas y derivados para hacer comparación de resultados con las normas colombinas.

### **Objetivos específicos:**

1. Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, coliformes totales y fecales, mohos y levaduras a partir de frutas.
2. Identificar la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito-reductor a partir de frutas.

## **III. Fundamento:**

La importancia del control de calidad microbiológico de frutas se basa en identificar los parámetros microbiológicos que deben cumplir dicho producto según la normativa legal, gracias a ellos se logra establecer de forma efectiva las condiciones higiénico-sanitarias en que se maneja el producto desde su recolección hasta su comercialización, también es importante realizar el microbiológico adecuado por los riesgos sanitarios derivados del consumo de este producto, ya que puede ocasionar salmonelosis, cólera, shigelosis y botulismo.



#### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

#### **V. Muestra:**

Frutas y derivados.

#### **VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

#### **VII. Taller:**

1. Comparar resultados obtenidos con las normas colombianas.
2. ¿Cuáles son los patógenos de importancia en las frutas y derivados?
3. Consultar microbiota de las Frutas.
4. Investigar las diferentes alteraciones en frutas ocasionadas por microorganismos.
5. Métodos de conservación de las frutas.

## **PRÁCTICA Nº 21**

### **MICROBIOLOGÍA DE CÁRNICOS**

#### **I. Introducción:**

Desde el punto de vista Bromatológico la carne es el resultado de la transformación experimentada por el tejido muscular del animal a través de una serie de concatenada de procesos fisicoquímicos y bioquímicas, que se desarrollan como consecuencia del sacrificio del animal. (Alimentos composición y propiedades Pág. 11.)



Las carnes se pueden clasificar en función de cuatro criterios: según la especie del animal productora, según la clase de la canal, según la categoría y según la forma en que han sido conservadas y su aptitud para el consumo humano.

La carne es, tanto por su valor nutritivo como su valor sensorial, uno de los alimentos más importantes para el hombre. Es el alimento básico para cubrir las necesidades de proteínas de alta calidad. La carne, como material biológico, es una materia prima muy delicada. La calidad de los productos obtenidos de ella depende tanto de los animales de abasto como del proceso de la materia prima a partir de éstos, así como de su procesado, y distribución hasta el consumidor.

Además, la tecnología tiene que tener en cuenta las características biológicas y los cambios que acontecen en ésta durante su obtención y procesado asimismo de una óptima obtención y procesado de la carne exigen un alto estándar higiénico, para poder ofrecer al consumidor carne y productos cárnicos que se pongan en riesgo sanitario mínimo. Por ello, la higiene tiene que estar completamente integrada en la moderna tecnología de los alimentos.

Según el Decreto 2162 /83 y el 2131/97 los productos cárnicos se clasifican en: Cárnicos cocidos, Cárnicos crudos madurados o ahumados, Cárnicos crudos.

Los análisis microbiológicos practicados recomendados por el laboratorio interno del INVINA son (sin norma estipulada):

**CÁRNICOS COCIDOS:** recuento total de mesófilos/gr, NMP coliformes totales, NMP coliformes fecales, recuento de staphylococcus cuagulasa positivo, esporas clostridium sulfito-reductor, *Salmonella*, *Listeria monocytognes*. NTC 1325 DE 2008.

**CÁRNICOS CRUDOS MADURADOS O AHUMADOS:** NMP coliformes totales, NMP coliformes fecales, recuento de Staphylococcus cuagulasa positiva, esporas,



*Clostridium* Sulfito-reductor, *Salmonella*, *Listeria Monocytognes*. NTC 1325 DE 2008.

CÁRNICOS CRUDOS: NMP coliformes fecales, recuento de *Staphylococcus* cuagulasa positiva, esporas *Clostridium* Sulfito-reductor, *Salmonella*, *Listeria Monocytognes*. NTC 1325 DE 2008.

CARNES DE AVES SOMETIDAS A LA TÉCNICA DE MARINADO: NMP coliformes fecales, recuento *Staphylococcus* coagulasa positivo, recuento esporas Cl. sulfito-reductor. Resolución 00402 de 2002.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Realizar el protocolo del análisis microbiológico de la carne y derivados, para compararlo con las normas colombianas.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, *Staphylococcus* coagulasa positiva, coniformes totales y fecales a partir de productos cárnicos.
- Determinar e identificar la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito-reductor a partir de productos cárnicos.
- Determinar e identificar la presencia de *Salmonella* a partir de productos cárnicos.

## **III. Fundamento:**

El control microbiológico de carnes y derivados es de vital importancia debido a que a través de este se pueden identificar los parámetros microbiológicos que deben cumplir dicho producto según la normativa legal. Gracias a ellos se logra establecer de forma efectiva la higiene del proceso, además, la carne es considerada un alimento de mayor riesgo en salud pública.



#### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

#### **V Muestra:**

Carne y derivados.

#### **VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

#### **VII. Taller:**

1. Comparar los resultados obtenidos con las normas colombianas.
2. Importancia de la investigación de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos.
3. Investigar principales alteraciones microbiológicas de las carnes.
4. Métodos de conservación de las carnes.

## **PRÁCTICA Nº 22**

### **MICROBIOLOGÍA DE CEREALES Y PRODUCTOS DE PANIFICACIÓN**

#### **I. Introducción:**

Los cereales pertenecen a la familia de las gramíneas y se denominan así por Ceres, la diosa romana de la agricultura. (Alimentos composición y propiedades Pág. 135)

Aunque los cereales no pertenecen a ninguna familia específica de las gramíneas en sentido estricto, la elección de algunas especies como fuente de alimento parece



haber estado determinada por el mayor tamaño de la semilla o por la facilidad de obtenerla en cantidad suficiente y de liberarla de la cáscara no comestible.

Los principales cereales utilizados en la alimentación humana son el trigo, la cebada, el arroz, el maíz, el centeno el mijo y la avena.

Los cereales son los alimentos humanos más eficaces, tanto en términos de aporte energético como desde el punto de vista de abastecimiento nutricional, cocinados o molidos y transformados en harinas, aceites y otras sustancias. Son excelente fuente de energía para el hombre y el ganado, es por esta razón que tanto los productores como los encargados de la transformación y procesos, los consumidores y entidades gubernamentales deben ser conscientes de los problemas sanitarios de alteración y adulteración que puedan sufrir estos productos básicos.

Según el INVIMA, a los cereales y productos de panificación se le realizan las siguientes determinaciones microbiológicas, dependiendo de la clase.

**HARINA DE TRIGO PARA PANIFICACIÓN:** Norma No. 267 del INVIMA  
recuento de mesófilos, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus* coagulasa positiva, recuento de mohos y levaduras, *Salmonella* y *Bacillus cereus*.

**ALIMENTOS ELABORADOS A BASE DE HARINAS CRUDAS:** Resolución No. 11488 de 1984: recuento hongos y levaduras, recuento total de microorganismos mesofílicos, NMP coliformes totales, NMP coliformes fecales, *Estafilococo* coagulasa positiva, *Bacillus*, *Salmonella*.

**GALLETAS Y COLACIONES:** Resolución No. 11488 de 1984 recuento de mesófilos, coliformes totales y fecales, *Staphylococcus* coagulasa positiva, recuento de mohos y levaduras.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**



Estudiar los parámetros de control de calidad microbiológica para cereales y productos de panificación y compararlos con las normas establecidas.

**Objetivos específicos:**

- Realizar recuento de hongos y levaduras a partir de cereales y productos de panificación
- Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios, coliformes totales y fecales a partir de cereales y productos de panificación.
- Determinar e identificar la presencia de *Salmonella* a partir de productos de cereales y productos de panificación.

**III. Fundamento:**

Debido a que la harina de trigo constituye la principal materia prima para los productos de panadería, el control de calidad de esta se lleva por registro de procedencia, pero es importante identificar si cumple con los parámetros establecidos en las normas colombianas realizando en análisis microbiológico.

**IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

**V Muestra:**

Cereales y derivados.

**VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

**VII. Taller:**



1. Comparar los resultados obtenidos con las normas colombianas.
2. Investigar parámetros de control de calidad de la harina de trigo.
3. ¿Cuáles son los factores que permiten la invasión y el crecimiento de los microorganismos en los granos de cereales?
4. Elaborar un flujograma del proceso del pan e identificar, en cada etapa, los microorganismos que pueden colonizar el producto de acuerdo a los factores intrínsecos, extrínsecos y de elaboración que se manejan.

## **PRÁCTICA N° 23**

### **MICROBIOLOGÍA DE AGUA POTABLE Y BEBIDAS**

#### **I. Introducción:**

Según el decreto 1575 de 1997, se denomina agua potable o agua para consumo humano aquella que por cumplir las características físicas, químicas y microbiológicas y demás normas que la reglamenten, es apta para consumo humano. Se utiliza en bebida directa, en la preparación de alimentos o en la higiene personal.

Agua envasada es el agua potable tratada, envasada y comercializada con destino al consumo humano, entendida como un producto de la industria alimentaria.



El agua mineral natural se extrae de las capas freáticas del subsuelo a través de manantiales, pozos artesanos o pozos perforados. Se caracteriza por su alto contenido en sales minerales y en elementos trazas, y se somete únicamente a un tratamiento mínimo para preservar sus propiedades fundamentales. El agua mineral se embotella en el mismo lugar de captación con las pertinentes precauciones higiénicas.

Por otro lado, las bebidas se clasifican en bebidas alcohólicas y no alcohólicas. Las bebidas alcohólicas se producen a partir de diversas materias primas, pero especialmente a partir de cereales, frutas y productos azucarados. Entre ellas se encuentran bebidas no destiladas, como la cerveza y el vino, y destiladas, como el whisky y el ron. Las no alcohólicas o refrescantes constituyen un conjunto muy heterogéneo en el que se distinguen dos tipos de productos cuyas características microbiológicas son muy diferentes, las cuales son: las bebidas a base de extractos naturales de frutas o de otros vegetales.

Y un último tipo de bebidas consumidas por sus características refrescantes y estimulantes son las aromáticas, entre las que cabe mencionar al café, el té y las obtenidas a partir del cacao.

Según el INVIMA los análisis microbiológicos que se le realizan son:

AGUA POTABLE: Resolución 2115 de 2007, coliformes totales, *E. Coli*, mesófilos, quistes de *Giardia* y *Cryptosporidium*.

JUGOS (ZUMOS) SIN TRATAMIENTO TÉRMICO CONGELADOS O NO: recuento *E. Coli*, recuento de mohos y levaduras, *Salmonella*/25 grs. Resolución 3929 de 2013.

JUGOS (ZUMOS) PASTEURIZADOS, EDULCORADOS O NO: recuento de microorganismos mesófilos ufc/g. o ml., recuento *E. Coli* ufc/g, recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml.. Resolución 3929 de 2013.



**JUGOS (ZUMOS) SOMETIDOS A PROCESO DE ESTERILIDAD COMERCIAL:** microorganismos aerobios y anaerobios. Resolución 3929 de 2013.

**NÉCTARES DE FRUTA PASTEURIZADOS:** recuento de microorganismos mesófilos ufc/g. o ml., recuento *E. Coli* ufc/g. o ml., recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml.. Resolución 3929 de 2013.

**REFRESCOS DE FRUTA PASTEURIZADOS:** recuento de microorganismos mesófilos ufc/g. o ml., recuento *E. coli* ufc/g. o ml., recuento de mohos y levaduras ufc/g. o ml.. Resolución 3929 de 2013.

**REFRESCOS DE FRUTAS SOMETIDOS A PROCESO DE ESTERILIDAD COMERCIAL:** microorganismos aerobios y anaerobios. Resolución 3929 de 2013.

**GASEOSAS:** recuento de mesófilos, coliformes totales, NMP para fecales, recuento de mohos y levaduras. Recomendado por el LAB del INVIMA, no hay normativa.

**CERVEZA:** recuento de mesófilos, coliformes totales y fecales, recuento de esporas de *Clostridium* sulfito-reductor y recuento de mohos y levaduras. Recomendado por el LAB del INVIMA, no hay normativa.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Determinar la calidad microbiológica de agua potable, embotellada y de bebidas para compararlas con los parámetros de calidad establecidos.

### **Objetivos específicos:**

- Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, *Staphylococcus* coagulasa positiva, coliformes totales y fecales a partir de bebidas.
- Determinar la presencia de *E. coli* y coliformes totales a partir de agua embotellada.



- Determinar e identificar la presencia de esporas de *Clostridium* sulfito-reductor a partir de bebidas.

### **III. Fundamento:**

Es importante realizar los análisis microbiológicos pertinentes al agua potable y bebidas, para determinar la potabilidad del agua y las condiciones higiénicas para su tratamiento, envasado y comercialización. Así mismo, para determinar la calidad higiénica del proceso de elaboración de bebidas.

### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utiliza los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

### **V. Muestra:**

Jugos, zumos, néctares, gaseosas.

### **VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

### **VII. Taller:**

1. Comparar los resultados obtenidos con los parámetros de calidad microbiológicos.
2. Citar diferencia entre néctar de frutas, jugos y refrescos de frutas.
3. Investigar los contaminantes asociados al proceso de elaboración de la cerveza.
4. Investigar el origen de los microorganismos en el agua embotellada.



## PRÁCTICA Nº 24

### MICROBIOLOGÍA DE PRODUCTOS A BASE DE HUEVOS

#### I. Introducción:

Con la denominación genérica de huevo se entienden, única y exclusivamente, los huevos de gallináceas. Los huevos de otras aves se designarán indicando además la especie de la que proceden (huevo de pata, huevo de oca, huevo de codorniz). La máxima importancia desde todos los puntos de vista corresponde a los huevos de gallina. Los huevos han servido de alimento para el hombre desde tiempos muy antiguos y constituyen un grupo de alimentos de suma importancia por su valor nutricional, así como por su presencia en la dieta.

Los huevos tienen una vida muy corta, puesto que tienden a descomponerse rápidamente o a ser alimento de numerosos microorganismos. Entre ellos, la *Salmonella*. Con el fin de prolongar la conservación de los huevos evitando a la vez su contaminación microbiana, se someten a diversos procesos industriales, con lo que se convierten en ovoproductos.

Los ovoproductos o derivados del huevo están constituidos, total o parcialmente, por huevo de gallina sin cáscaras y sirven como materia prima en la elaboración de productos alimenticios. Cualquier derivado deberá pasteurizarse con el fin de eliminar los posibles gérmenes patógenos.

Los análisis microbiológicos que se le realizan a los derivados del huevo son los siguientes:

**MAYONESA:** mesófilos aerobios facultativos viables, NMP de coliformes totales y fecales, recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva, recuento de *Bacillus cereus*, recuento de mohos y levaduras e investigación de *Salmonella*. (Resolución 17882/85).



PASTAS ALIMENTICIAS AL HUEVO: mesófilos aerobios facultativos viables, NMP de coliformes totales y fecales, recuento de *Staphylococcus* coagulasa positiva, recuento de mohos y levaduras, e investigación de *Salmonella*. (Resolución 4393/91)

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Realizar control de calidad microbiológico de ovoproductos para determinar si cumple las normas de calidad microbiológicas establecidas por el INVIMA.

### **Objetivos específicos:**

- Determinar e identificar la presencia de *Salmonella* a partir de ovoproductos
- Realizar recuento de microorganismos mesófilos aerobios y facultativos viables, *Staphylococcus* coagulasa positiva, coliformes totales y fecales a partir de ovoproductos.
- Realizar recuento de mohos y levaduras a partir de ovoproductos.

## **III. Fundamento:**

Debido a la importancia sanitaria del consumo de huevos y derivados, es importante determinar la calidad microbiológica del producto para determinar si cumple con las normas de calidad microbiológicas correspondientes.

## **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los materiales y equipos descritos en el capítulo III.

## **V Muestra:**

Mayonesa, crema pastelera, pastas.



## **VI. Procedimiento:**

Teniendo en cuenta los microorganismos a investigar en este grupo de alimentos, se utilizan los procedimientos descritos en el capítulo III.

## **VII. Taller:**

- 1.Cuál es la microflora de los huevos de gallina.
2. Enfermedades generadas por el consumo de las aves y los derivados del huevo.
3. Investigar las alteraciones y métodos de conservación de los huevos.

# CAPÍTULO V



# CONTROL DE CALIDAD A MANIPULADORES, UTENSILIOS, SUPERFICIE, AMBIENTE Y EMPAQUES

## PRÁCTICA Nº 25

### ESTUDIO MICROBIOLÓGICO A MANIPULADORES, SUPERFICIES, UTENSILIOS Y MEDIO AMBIENTE.

#### **I. Introducción:**

Todas las operaciones de fabricación, procesamiento, envase, almacenamiento y distribución de los alimentos deben estar sujetas a los controles de calidad apropiados, para asegurar la calidad de los alimentos en la industria debe prestarse atención tanto a los microorganismos patógenos como a los alterantes, que pudieran llegar a las materias primas o al alimento terminado, a partir del hombre (manipulador), de los equipos, tuberías, superficies, ambiente.

Según el Ministerio de la Protección Social Decreto 3075 de 1998, manipulador de alimentos es toda persona que interviene directamente, aunque sea en forma ocasional, en actividades de fabricación, procesamiento, preparación, envase, almacenamiento, transporte y expendio de alimentos. Toda persona mientras trabaja directamente en la manipulación o elaboración de alimentos, debe adoptar las prácticas higiénicas y medidas de protección establecidas en el decreto.

En una planta procesadora de alimentos, el manipulador juega un papel importante en la fabricación de sus productos, ya que se puede convertir en una fuente de contaminación.

Muchos sitios del cuerpo humano albergan una carga microbiana normal, los sitios de importancia donde residen los microorganismos saprófitos y que se constituyen



en una fuente de contaminación para manipuladores de alimentos son la piel y el tracto respiratorio (fosas nasales y faringe). El microorganismo más importante a analizar es el *Staphylococcus aureus*, este microorganismo reside en la piel, en las fosas, tracto nasofaríngeo y la mayoría de las veces se encuentra asociado a furúnculos, heridas y lesiones de la piel.

La presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en los alimentos procesados indica contaminación a partir de piel, boca o nariz de los manipuladores. La importancia de identificar este microorganismo, radica en la propiedad que tiene de liberar una toxina termoestable en los alimentos y causar intoxicaciones alimentarias; *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva es el agente bacteriano que con mayor frecuencia se asocia a brotes de intoxicación alimentaria, es por esto que el manipulador de alimentos se puede convertir en una fuente de contaminación.

Otros microorganismos no pertenecientes a la flora normal de la piel, pueden transferirse al alimento debido a una pobre higiene corporal, un ejemplo son los coliformes totales y fecales, provenientes del tracto gastrointestinal, específicamente de la región anal, la presencia de estos también se investiga en las manos, dedos y uñas de los manipuladores e indican contaminación de origen fecal.

Los equipos y utensilios utilizados en el procesamiento, fabricación, preparación, de alimentos dependen del tipo de alimento, materia prima o insumo, de la tecnología a emplear y de la máxima capacidad de producción prevista. Todos ellos deben estar diseñados, contruidos, instalados y mantenidos de manera que se evite la contaminación del alimento, facilite la limpieza y desinfección de sus superficies y permitan desempeñar adecuadamente el uso previsto. Decreto 3075/ 97.

Igualmente es importante el estudio microbiológico del aire (ambiente), ya que este se pone en contacto con los alimentos, por eso se debe estar seguro de trabajar en un ambiente adecuado, debidamente desinfectado o esterilizado.

## **II. Objetivos:**



### **Objetivo general:**

Realizar el control microbiológico a manipuladores, superficies, utensilios y medio ambiente.

### **Objetivos específicos:**

- Establecer la eficacia del lavado de manos, mediante la comparación del número de UFC antes y después del lavado.
- Identificar la presencia de coliformes totales y fecales en utensilios, equipos y las superficies.
- Evaluar la contaminación del ambiente.
- Detectar la presencia de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en fosas nasales y zona faríngea de los manipuladores, mediante la realización de frotis y cultivos.
- Identificar la presencia de coliformes totales y fecales a partir de las manos, dedos y uñas de los manipuladores, mediante frotis y cultivos.

### **III. Fundamento:**

La importancia de realizar el control de calidad microbiológico a manipuladores, superficies, utensilios y medio ambiente es de vital importancia en la industria alimentaria, ya que a través de estos aspectos pueden presentarse contaminaciones en el alimento.

### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos	Materiales	Equipos
Baird Parker / A.S.M	Escobillones estéril	Incubadora
Ogy	Baja lengua estéril	Baño serológico
Agar plate count	Gasa estéril	
EMB	Portaobjetos estériles	
Púrpura Bromocresol	Microscopio	Tubo
	taparosca estéril	
Caldo BHI	Asa bacteriológica	
Caldo Brilla		



Caldo Indol  
Caldo lactosado  
Colorantes Gram  
Aceite de inmersión  
Plasma fresco  
Reactivo de Kovacs

#### **V. Muestras:**

Superficies, utensilios, manos operarios.

#### **VI. Procedimiento:**

Manos:

- Evaluación del método de desinfección
- Colocar la mano del manipulador en una caja con Agar Púrpura de Bromocresol.
- solicitar al manipulador que lave las manos como siempre lo hace.
- Colocar la otra mano del manipulador en otra caja con Agar Púrpura de Bromocresol.
- Incubar ambas cajas a 37°C por 24-48 horas.
- Observar y contar el número de UFC en las cajas de Agar Púrpura de Bromocresol, antes y después del lavado.

Interpretación de resultados:

Esta prueba sirve para establecer la eficacia del lavado de las manos en manipuladores y se reporta la diferencia entre las UFC antes y después del lavado.

Estudio microbiológico a utensilios, equipos y superficies:

Procedimiento de la esponja o gasa estéril.

1. Con la ayuda de una bolsa de plástico, a manera de guante, tomar la esponja estéril, evitando posibles contaminaciones.



2. Verter unos mililitros de caldo lactosado a la esponja y muestrear el utensilio, equipo o superficie seleccionada frotando la esponja por toda el área.
3. Dejar la esponja en el interior de la bolsa, una vez finalice la operación, y agregar el resto del caldo lactosado.
4. Cerrar y marcar la bolsa.
5. Exprimir la esponja varias veces, suavemente.
6. Incubar la bolsa con la esponja a 37°C durante 24 horas.
7. Pipetear 1 ml de caldo lactosado y transferirlo a un tubo con caldo brilla.
8. Incubar a 37°C durante 24 a 48 horas.
9. Realizar la lectura observando la presencia de gas y turbidez.
10. Adicionar 5 gotas del reactivo de Kovacs al tubo con caldo indol, para la determinación de indol.
11. Realizar la lectura (la turbidez y el gas en el tubo de brilla y la producción de indol en el caldo indol indican la presencia de coliformes fecales).
12. Recuerde que solo la positividad de ambos tubos indica la presencia de coliformes fecales.

#### Interpretación de resultados:

La presencia de coliformes totales o fecales, indican que el proceso de limpieza y desinfección no es el adecuado o contaminación de origen fecal.

#### Estudio microbiológico al ambiente:

##### Evaluación de la contaminación bacteriana.

1. Abrir una caja de Agar Plate Count por 10 minutos.
2. Cerrar la caja e incubar a 37°C por 24-48 horas.
3. Contar y reportar el número de colonias.

##### Evaluación de la Contaminación Fúngica



1. Abrir una caja de Agar Ogy por 10 minutos.
2. Cerrar la caja e incubar por 3 a 5 días a 22°C.
3. Contar y reportar el número de microorganismos.

Interpretación de resultados:

Se reporta el número de colonias, que no debe ser mayor de 10 en 10 minutos, si es mayor indica que el ambiente está contaminado y se debe repetir el proceso de desinfección o esterilización del ambiente.

Evaluación de contaminación fecal en manipulador:

1. Frotar un escobillón humedecido con caldo, brilla las manos, dedos y uñas del manipulador.
2. Introducir el escobillón dentro de un tubo que contiene caldo brilla con tubo Durham.
3. Tapar bien el tubo.
4. Incubar a 37°C por 24-48 horas.
5. Realizar la lectura (turbidez y producción de gas indican presencia de coliformes totales).
6. Confirmar la presencia de coliformes totales, sembrando en placas de agar EMB.
7. Incubar a 37°C durante 24 horas.
8. Realizar la lectura observando la presencia de colonias sospechosas de coliformes totales (Colonias grandes verdosas con brillo metálico).
9. Transferir dos asadas del tubo positivo a un tubo con caldo brilla (con tubo Durham) y a uno con caldo indol.
10. Incubar en baño serológico a 45°C por 24-48 horas, asegurándose de que el nivel del agua cubra el medio de cultivo.
11. Adicionar 5 gotas del reactivo de Kovacs al tubo con caldo indol, para la determinación de indol.



12. Realizar la lectura (la turbidez y el gas en el tubo de brilla y la producción de indol en el caldo indol, indican la presencia de coliformes fecales).

Recuerde que solo la positividad de ambos tubos, indican la presencia de coliformes fecales.

Interpretación de resultados.

La determinación de coliformes totales y fecales. En este caso, es una prueba de presencia o ausencia, se reporta como presencia de coliformes totales o fecales, e indican si el proceso de sanitización no es el ideal o hay contaminación de origen fecal.

Manipulador:

Fosas nasales y faringe

- Marcar las cajas de Agar Baird Parker (Salado de Manitol) como muestra faríngea y nasal respectivamente.
- Inmovilizar la lengua con un bajalengua.
- Frotar con un escobillón los pilares amigdalinos, realizar un frotis y sembrar en el Agar Baird Parker (Salado de Manitol).
- Introducir un escobillón en las fosas nasales y frotarlo suavemente en las paredes, realizar un frotis y sembrar inmediatamente en el Agar Baird Parker (Salado de Manitol).
- Incubar por 24-48 horas a 37°C.
- Observar las cajas de Agar Baird Parker (Salado de Manitol) y buscar colonias negras brillantes con un halo blanco rodeadas de halos claros que contrastan con el medio (Colonias puntiformes amarillas con halos amarillos).
- Realizar un frotis de cada caja a partir de las colonias de interés y colorearlos con Gram, se deben observar cocos grampositivos agrupados en racimos.



- Tomar 3 colonias de cada caja y transferirlas a tubos con caldo infusión cerebro corazón (BHI), marcados respectivamente como fosas nasales y faringe.
- Incubar por 24 horas a 37°C.
- Realizar la prueba de la coagulasa: transferir 0.3 ml de cultivo BHI + 0.3 ml de plasma fresco, incubar a 37°C en baño serológico por 4 horas observando cada hora la formación de coagulo.

Interpretación de resultados:

Fosas nasales y zona faríngea

La determinación del *Staphylococcus aureus* en estos casos es considerada una prueba de presencia o ausencia. Se reporta como prueba positiva o negativa para *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva.

#### **VII. Taller:**

1. Investigar los principales contaminantes en la empresa de alimentos.
2. Leer el decreto 3075 y analizar los requisitos higiénicos que deben cumplir los manipuladores, los equipos, superficies en la industria de alimentos.

### **PRÁCTICA Nº 26**



## **DETERMINACIÓN DE AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES TOTALES, *E. COLI*, HONGOS Y LEVADURAS EN EMPAQUES**

### **I. Introducción:**

Los empaques, materiales indispensables en la industria alimentaria actual, tienen como función primordial aislar al alimento de la acción nociva de los agentes externos como la humedad, luz, gases y contaminación microbiana. Es entonces, lógico que el material utilizado para el envasado de alimentos deba ser controlado para asegurar que no aporte microorganismos alternantes al producto durante su transporte y/o almacenamiento. Un empaque deficiente puede deshacer todo lo logrado por prácticas meticulosas de fabricación.

Los empaques se clasifican como primarios, secundarios y terciarios. Los primarios son los que se ponen en contacto con el alimento, son los envases. Los secundarios son aquellos que brindan protección al envase y una vez cumplida ésta función son desechados. El terciario son cajas o envolturas exteriores que contienen alimentos ya envasados y por lo tanto no entran en contacto con él. Constituyen el embalaje.

Son múltiples los materiales usados para empacar alimentos en nuestro país, se usan simultáneamente los tradicionales y los industriales.

Los tradicionales o naturales, principalmente hojas de vegetales usadas para tamales, bollos, quesillos, dulces y tienen una contaminación muy variada. También se usan frutos secos como la “totuma” o recipientes elaborados en barro cocido, fique y madera.

Los materiales para empaques industriales comprenden:

- Metales: aceros recubiertos por cromo en muy pequeñas cantidades, aceros recubiertos con estaño o aluminio.
- Vidrio.



- Polímeros: polietileno, polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), cloruro de polivinilideno (PVDC), poliestireno, resinas de acrilonitrilo butadienoestireno (ABS), poliéster, nylon, resinas alquílicas, vinílicas, oleoresinasas y acrílicos.
- Papel cartulina y cartones.
- Madera.

Cuando uno de estos compuestos solo no es suficiente para la protección deseada se crean empaques constituidos por hojas de capas múltiples combinando papel, plástico y laminados metálicos.

En ocasiones las envolturas se impregnan o tratan con compuestos bacteriostáticos o fungistáticos. Por ejemplo, las envolturas del queso se tratan con ácidos sórbicos o caprílico; algunas máquinas empacadoras traen luz ultravioleta para exponer al plástico antes de formar el empaque; las latas para semiconservas se desinfectan por un chorro de vapor. Algunos plásticos tienen propiedades antibacterianas, en el caso de los que contienen alquido-barnices, resinas fenólicas, cloruro de polivinilo o poliacetal.

La toma de la porción a analizar de los envases o empaques debe realizarse asépticamente, preferiblemente en campana de flujo laminar o en cuarto al que se le ha mantenido prendida la luz ultravioleta 30 minutos antes. El envase o empaque debe limpiarse meticulosamente con alcohol etílico al 70%, en el área donde se extraerá la muestra.

## **II. Objetivos:**

### **Objetivo general:**

Realizar control de calidad microbiológico a diferentes empaques para determinar ausencia o presencia de microorganismos indicadores de calidad sanitaria.



### **Objetivos específicos:**

- Verificar las condiciones microbiológicas de diversos empaques de alimentos.
- Conocer los métodos para estudiar la población microbiana de los empaques.
- Interpretar los valores de referencia en el ensayo de diferentes empaques.

### **III. Fundamento:**

Al tener el empaque contacto directo con el producto y a ser este parte de materia prima en la industria alimentaría es importante hacer la caracterización microbiológica para determinar la inocuidad de estos, y así garantizar la calidad microbiológica del producto.

### **IV. Reactivos, materiales y equipos:**

Reactivos	Materiales	Equipos
Agar Plate Count	Cajas de Petri	Incubadora a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$
Solución de enjuague (ringer buferada o caldo nutritivo. 20 o 100 ml).	Pipeta de 10 ml. Pipeta de 1 ml. Empaque a analizar	

### **V. Muestras:**

Diferentes clases de empaques de alimentos.

### **VI. Procedimiento:**

1. En el empaque a analizar añada 20 ml de solución ringer buferada estéril o caldo nutritivo. Para contenedores de más de un galón use 100 ml. de solución.
2. Agite vigorosamente 10 veces en un arco de 20 cm. Voltee el empaque  $90^{\circ}$  y repita el tratamiento de agitación horizontal. Voltee  $90^{\circ}$  dos veces más y repita



- la agitación horizontal. Arremoline el contenedor vigorosamente 20 veces en pequeño círculo con el eje vertical, invierta y repita.
3. Tome dos cajas de Petri estériles, márkelas y deposite en cada una 1 ml del enjuague del empaque. Otra alternativa, es usar tres cajas de Petri estériles y distribuir en ellas 10 ml del enjuague.
  4. Vierta en las cajas el agar indicado según el microorganismo a investigar. Ej: Plate Count Agar para aerobios mesófilos, Chromocult para coliformes totales y *E. coli*, OGYE para mohos y levaduras.
  5. Cuando se usan porciones de 100 ml o mayores de líquido de enjuague es preferible el método de filtración por membrana, especialmente si se esperan bajos niveles de contaminación. Sin embargo, también se puede trabajar con 20 ml.
  6. Incube según el grupo microbiano o microorganismo buscado.

#### Lectura:

Transcurrido el tiempo de incubación cuente las UFC según el microorganismo y medio de cultivo utilizado.

Si se usaron 20 ml de solución ringer el número total de colonias de las tres cajas que recibieron 10 ml será multiplicado por 2, o, el número total de las colonias de las dos placas que recibieron un ml multiplíquelo por 10 veces el número de UFC por contenedor. Cuando las cajas que recibieron 1 ml muestran cada una más de 250 ufc reporte el conteo como más de 5.000 por empaque.

#### Interpretación:

Debe tenerse en cuenta tanto el número como el tipo de microorganismos. Los tipos de microorganismos son importantes dependiendo de su potencial como causantes de deterioro del alimento que será empacado en él y/o su significado en salud pública. Normalmente los microorganismos hallados son inofensivos y se encuentra



en pequeño número o no tienen ninguno. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, tal como el envasado aséptico (introducción de un alimento estéril en un recipiente estéril), la condición microbiológica de los contenedores es un producto crítico de control.

Los valores de referencia dependen del tipo de empaque y el producto a contener. Ej.: En los empaques para leche pasteurizada es permisible hasta 1 UFC/ml de capacidad o no más de una colonia por  $\text{cm}^2$  de la superficie de contacto con el producto. Ningún microorganismo coliforme puede estar presente. El valor de referencia para recipientes de uso repetido como botellas de bebidas es  $1\text{ufc}/\text{cm}^2$ .

En papel sin tratar se ha podido observar que predomina el género *Bacillus* y a veces los *Micrococcus* a niveles normalmente inferiores a  $200\text{ufc}/\text{gr}$ , y mohos y levaduras a niveles de hasta  $10\text{ufc}/100\text{cm}^2$ . En Estados Unidos, el papel para envasado de alimentos no debe sobrepasar los  $250\text{microorganismos}/\text{gr}$  y los recipientes y tapas para leche, no más de  $1\text{ufc}/\text{cm}^2$ . Los microorganismos en la superficie de hojas de aluminio en los empaques de alimentos son aún menores y se encuentran tasas de crecimiento entre  $1 - 20\text{ufc}/100\text{cm}^2$ . En los vasitos de plástico los valores son del mismo orden.

El reporte de los resultados microbiológicos, diligenciarlo en el formato n° 10.

### **VII. Taller:**

1. Al analizar un empaque de leche de 100 ml de capacidad, se usan 20 ml de caldo nutritivo y se siembran dos cajas de Petri con 1 ml de inóculo cada una. Se les agrega Agar Plate Count. Después del período de incubación se cuentan en una caja 20 UFC y en la otra 15 UFC.
2. Calcule el recuento bacteriano del empaque y diga si cumple con el valor de referencia o no.
3. Haga el mismo cálculo, pero se utilizó sólo una caja con 1 ml de inóculo y se contaron 10 UFC.



4. Haga el mismo cálculo, pero la capacidad del empaque es de 350 CC y se sembraron dos cajas con 0.1 ml, en cada una de las cuales se contaron 5 UFC.
5. Haga el mismo cálculo si la caja con 20 UFC contenía SPC y la de 15 UFC contenía Agar Chromocult.



## BIBLIOGRAFÍA

Badui Dergal Salvador, La ciencia de los Alimentos en la práctica. 1th.ed. México. Pearson; 2012

Frazier William, Microbiología de los Alimentos. 8 th.ed. España. Acribia; 2000.

Forsythe S. J. Hayes P. R. Higiene de los Alimentos Microbiología y HACCP. 2 th.ed. España. Acribia; 2002

ICMSF. Microorganismos de los Alimentos 1, su significado y métodos de enumeración. 2 th.ed. Acribia. 2000

INVIMA. Manual de toma de muestras de alimentos y bebidas para entidades territoriales de salud. Versión 1. Bogotá. Ministerio de Salud. 2015. Disponible en [https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion\\_y\\_vigilancia/direccion-alimentos/Articulacion\\_Entidades\\_Territoriales\\_Salud/19-Manual-de-toma-de-muestras-de-alimentos-y-bebidas-para-Entidades-Territoriales-de-Salud.pdf](https://www.invima.gov.co/images/pdf/inspeccion_y_vigilancia/direccion-alimentos/Articulacion_Entidades_Territoriales_Salud/19-Manual-de-toma-de-muestras-de-alimentos-y-bebidas-para-Entidades-Territoriales-de-Salud.pdf)

INVIMA. Manual de Técnicas para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para Consumo Humano. Santa fè de Bogotá. 2000.

Ministerio de Salud y protección social. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir las frutas y las bebidas con adición de jugo (zumo) o pulpa de fruta o concentrados de fruta, clarificados o no, o la mezcla de estos que se procesen, empaquen, transporten, importen y comercialicen en el territorio nacional. Resolución 3929 de 2 de Octubre de 2013. Diario Oficial No. 48.933 de 4 de octubre de 2013. Disponible en <https://www.invima.gov.co/normatividad/normograma.html>

Norma técnica colombiana. NTC 267. Harina de Trigo. 28 de agosto de 2013.

Norma técnica colombiana. NTC 1325. Industria alimentaria. Productos cárnicos procesados no enlatados. 20 de Agosto de 2008.



Ministerio de la Protección social. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos fisicoquímicos y microbiológicos que deben cumplir los productos de la pesca, en particular pescados, moluscos y crustáceos para consumo humano. Resolución 776 de 6 de Marzo de 2008. 6-03-08 Diario 46.923)

[https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion\\_776\\_2008.pdf](https://www.invima.gov.co/images/stories/resoluciones/resolucion_776_2008.pdf)

Ministerio de la protección social, Ministerio de ambiente, Vivienda y Desarrollo territorial. Por medio de la cual se señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano. Resolución 2115 de 22 de Junio de 2007. Disponible en [http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Legislaci%C3%B3n\\_del\\_agua/Resoluci%C3%B3n\\_2115.pdf](http://www.minambiente.gov.co/images/GestionIntegraldelRecursoHidrico/pdf/Legislaci%C3%B3n_del_agua/Resoluci%C3%B3n_2115.pdf)

Ministerio de la Protección social. Por el cual se expide el Reglamento Técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para el consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país. Decreto 616 de 28 de Febrero de 2006. Disponible en [https://www.invima.gov.co/images/stories/alimentos/decreto\\_616\\_2006.pdf](https://www.invima.gov.co/images/stories/alimentos/decreto_616_2006.pdf)

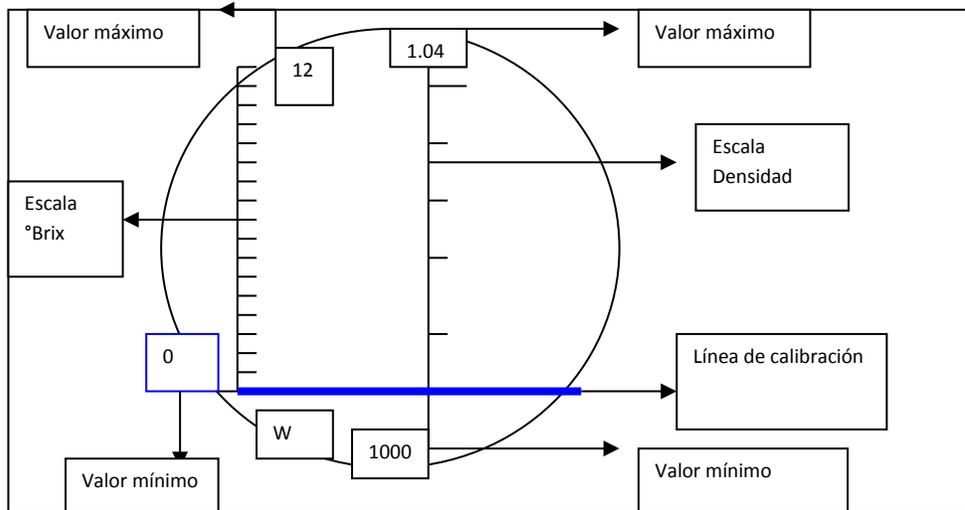
Roberts. D y col. Microbiología Práctica de los Alimentos. 2 th. Ed. España. Acribia; 2000

Salgado María Teresa. Microbiología de los Alimentos. 1 th.ed. Colombia. universidad de Caldas. 2006

Simanca Mónica, Durango Alba. Guías de laboratorio, 1.ed. Programa de ingeniería de alimentos. Colombia. Universidad de Córdoba; 2004

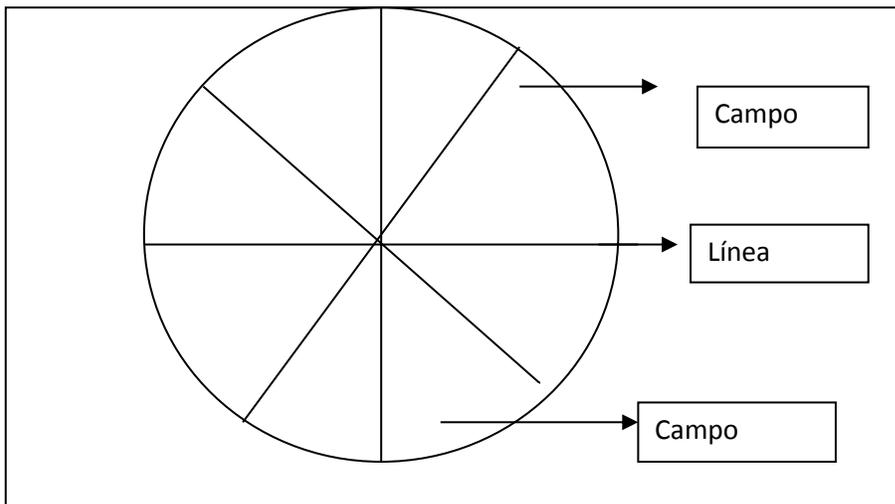
## ANEXOS DE FIGURAS

Figura 1. Campo visual del refractómetro manual



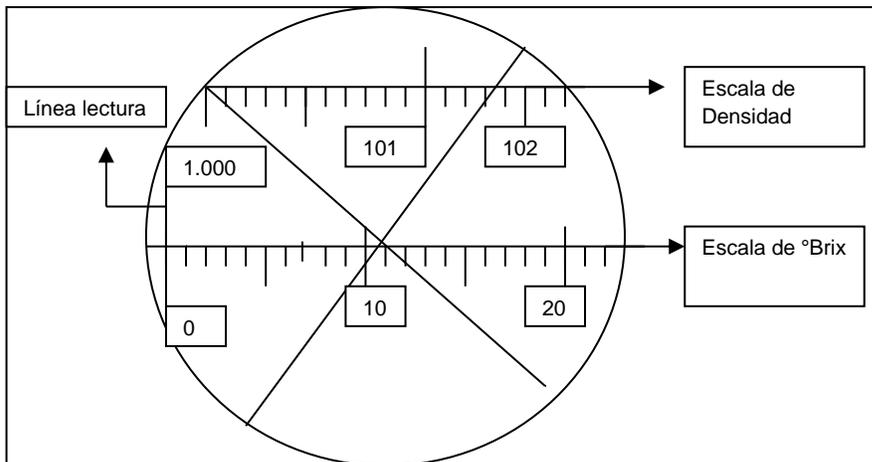
Fuente: realizado por Autora

Figura 2. Campo visual del refractómetro electrónico con la luz encendida "Spectronic"



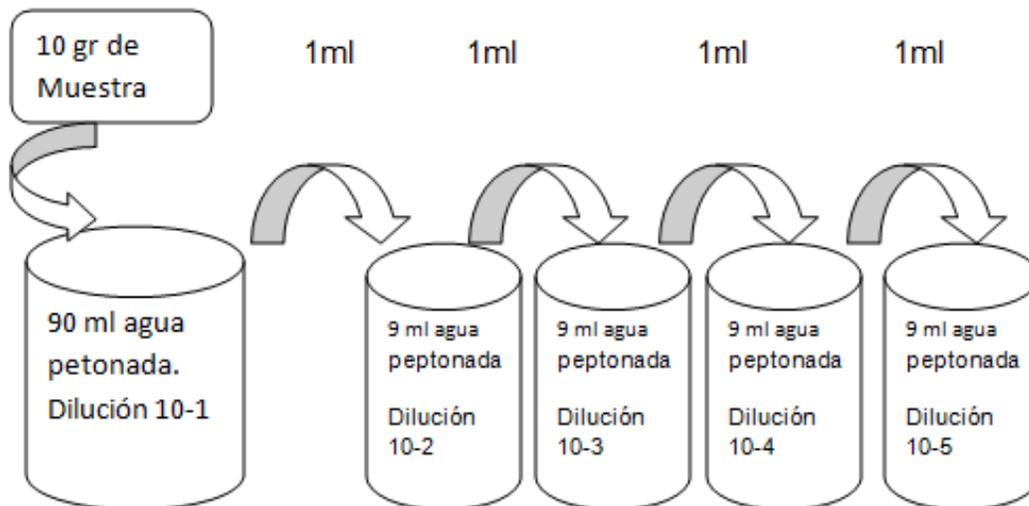
Fuente: realizado por Autora

Figura 3. Campo visual del Refractómetro electrónico Spectronic. Con la luz apagada, se pueden apreciar las dos escalas de medida



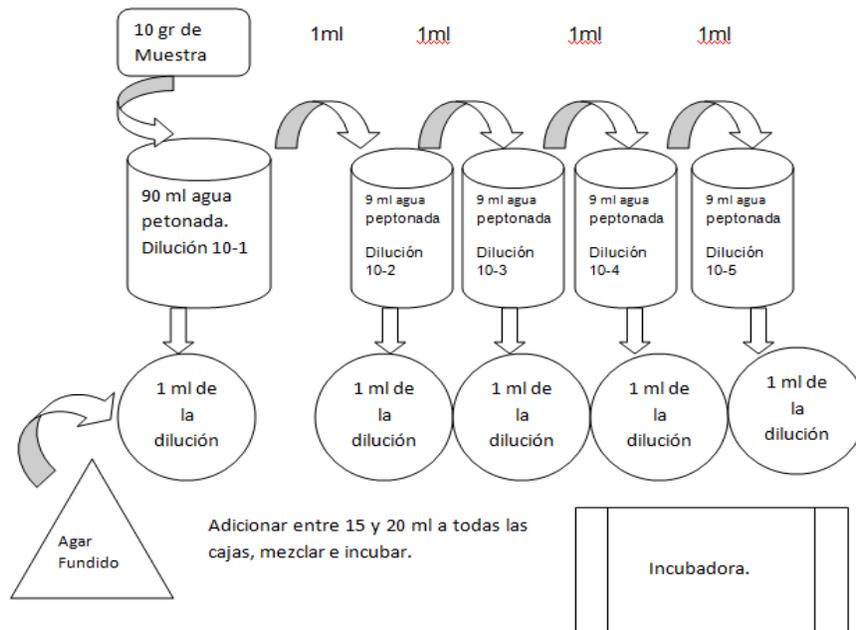
Fuente realizado por Autora

Figura N°4 Diluciones decimales



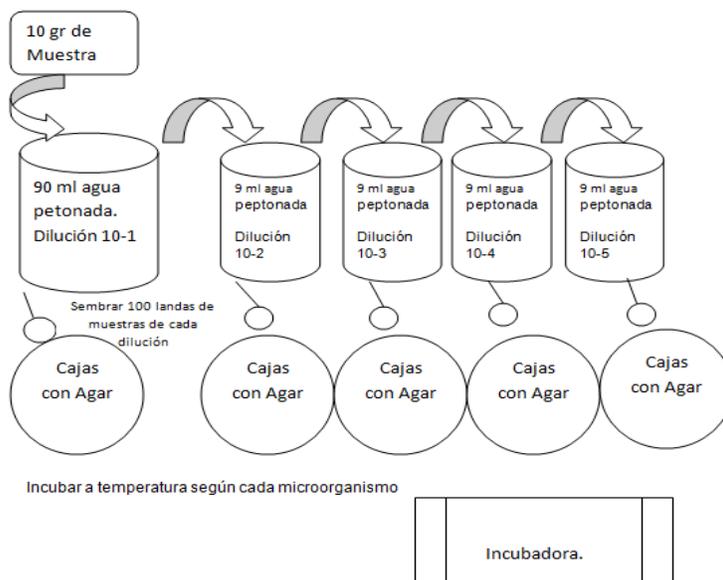
Fuente: realizado por Autora

Figura No. 5: Siembra en profundidad



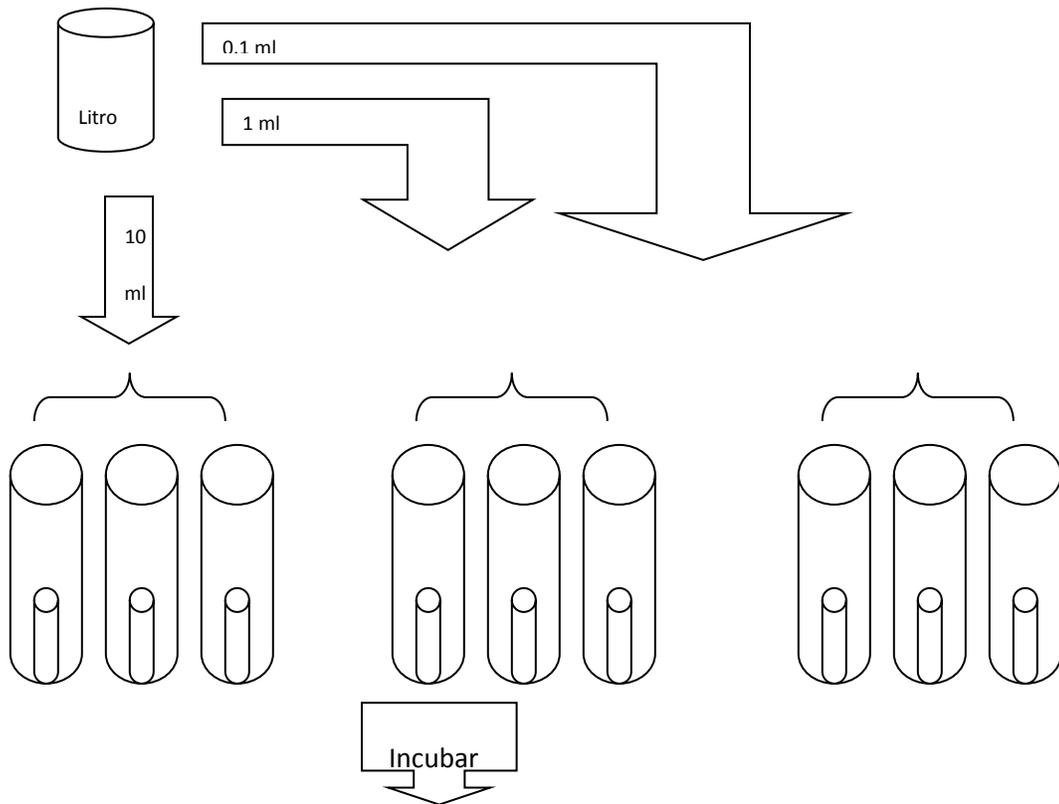
Fuente: realizado por Autora

Figura No. 6: Siembra en superficie



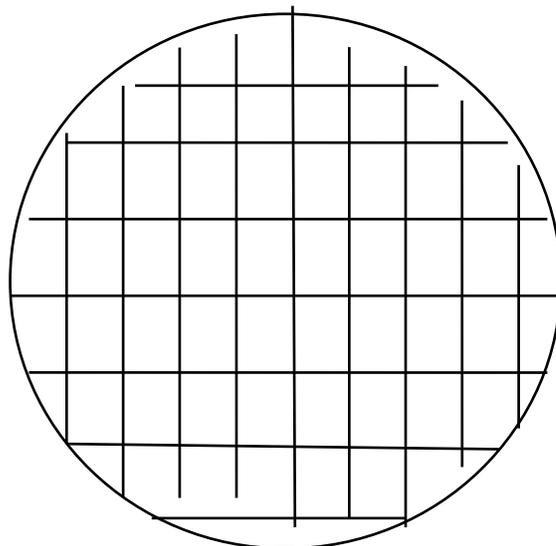
Fuente: realizado por Autora

Figura No. 7: Técnica de NMP para 9 tubos (Muestras puras líquidas)



Fuente: realizado por Autora

Figura. No 8 Cuadrícula para el recuento bacteriano en caja Petri





Fuente: realizado por Autora

Figura. No 9 Formato de informe

INTEGRANTES: \_\_\_\_\_

GRUPO \_\_\_\_\_

MUESTRA

Nombre Comercial: \_\_\_\_\_

Peso/contenido: \_\_\_\_\_ Fecha Vencimiento/Lote: \_\_\_\_\_

Empaque: \_\_\_\_\_

Lugar de muestreo: \_\_\_\_\_

Fecha de análisis: \_\_\_\_\_

Tipo de recuento: \_\_\_\_\_

Lectura:

Dilución	Recuento	Informe ufc/gr/ml
$10^{-1}$		
$10^{-2}$		
$10^{-3}$		
$10^{-4}$		

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_



Figura. No 10 Formato de resultados.

Muestra:

Tipo de empaque: \_\_\_\_\_

Se usa como empaque 1rio \_\_\_\_\_ 2rio \_\_\_\_\_ 3rio \_\_\_\_\_

Capacidad \_\_\_\_\_

Recuento obtenido \_\_\_\_\_ Microorganismo \_\_\_\_\_

Agar utilizado \_\_\_\_\_

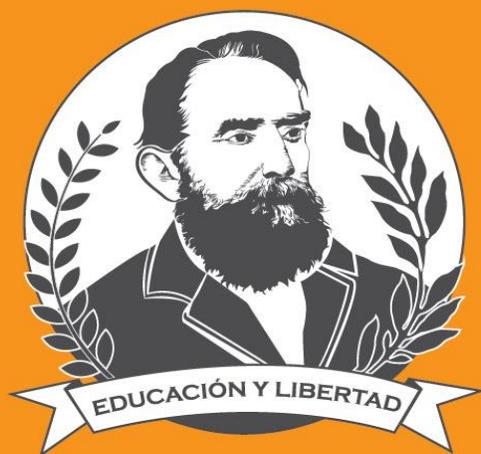
Fundamento del medio de cultivo:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Su concepto sobre el empaque:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

NOMBRE: \_\_\_\_\_ FECHA: \_\_\_\_\_



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA  
**RAFAEL NÚÑEZ**  
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA



**Campus Cartagena**  
Centro Comercial Pasaje de la Moneda  
Cra. 8B #8-56  
Tel. 6517088 Ext 1202

**Campus Barranquilla**  
Cra 54 #66-54  
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

[www.curn.edu.co](http://www.curn.edu.co)

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación  
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.