



# Manual de laboratorio Gestión de Inocuidad de Alimentos

---

Versión 2

Agosto de 2013

*Profesora Nádenka Melo*

[Escriba aquí una descripción breve del documento. Normalmente, una descripción breve es un resumen corto del contenido del documento. Escriba aquí una descripción breve del documento. Normalmente, una descripción breve es un resumen corto del contenido del documento.]

**Contenido**

PRESENTACION..... 4

PRÁCTICA 1: Análisis de ambientes..... 5

    Introducción ..... 5

    Objetivos ..... 5

    Materiales ..... 5

    Procedimiento..... 5

    Cuestionario ..... 6

    Bibliografía empleada ..... 6

PRÁCTICA 2: Análisis de superficies. .... 7

    Introducción ..... 7

    Objetivos ..... 8

    Materiales ..... 8

    Procedimiento ..... 8

    Cuestionario ..... 8

    Bibliografía empleada ..... 9

PRÁCTICA 3: Análisis de microbiológico a manipuladores ..... 10

    Introducción ..... 10

    Objetivos ..... 10

    Materiales ..... 10

    Procedimiento..... 10

    Cuestionario ..... 10

    Bibliografía empleada ..... 11

PRACTICA 4: Análisis de desinfectantes ..... 12

    Introducción ..... 12

    Objetivos ..... 12

    Materiales ..... 12

    Procedimiento ..... 13

    Cuestionario ..... 13

    Bibliografía empleada ..... 13

PRACTICA 5: Homogenización de muestras de alimentos .....	14
Introducción .....	14
Objetivos .....	14
Materiales .....	14
Procedimiento .....	14
Cuestionario .....	15
Bibliografía empleada .....	15
PRÁCTICA 6: Recuento de bacterias mesófilas aerobias.....	16
Introducción .....	16
Objetivos .....	16
Materiales .....	16
Procedimiento.....	17
Cuestionario .....	18
Bibliografía empleada .....	18
PRACTICA 7: Recuento de coliformes en alimentos.....	19
Objetivos .....	19
Materiales .....	19
Procedimiento.....	19
Cuestionario .....	20
Bibliografía empleada .....	20
PRÁCTICA 8: Recuento de hongos y levaduras en alimentos .....	21
Introducción .....	21
Objetivos .....	21
Materiales .....	21
Procedimiento.....	21
Cuestionario .....	22
Bibliografía empleada .....	22
PRACTICA 9: Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positivos.....	23
Introducción .....	23
Objetivos .....	23
Materiales .....	23
Procedimiento.....	23

Prueba de la coagulasa.....	24
Cuestionario .....	24
Bibliografía empleada .....	24
PRACTICA 10: Recuento de <i>Bacillus cereus</i> .....	25
<b>Introducción</b> .....	25
Objetivos .....	25
Materiales .....	25
Procedimiento .....	25
Cuestionario .....	26
Bibliografía empleada .....	26
PRACTICA 10: Análisis de agua envasada .....	27
<b>Introducción</b> .....	27
<b>Objetivos</b> .....	27
Materiales .....	27
Procedimiento .....	27
Cuestionario .....	28
Bibliografía empleada .....	28

## PRESENTACIÓN

Desde los inicios de la humanidad la Inocuidad de los Alimentos ha sido una enorme preocupación ya que de ellos deriva la salud de los pueblos. Es así como el inicio de la agricultura estimada en el año 10.000 a.c. hizo posible el cambio de estilo de vida nómada a sedentario y por lo tanto, el surgimiento de las grandes civilizaciones representadas hoy en día por las megaciudades y grandes urbes.

La seguridad alimentaria en uno de sus componentes requiere la Inocuidad de los alimentos definida como la capacidad de no causar daño luego de su consumo. Esta inocuidad se logra con la sumatoria de los componentes físicos, químicos y microbiológicos.

Es por ello que se ha escrito este Manual de laboratorio para la Gestión de Inocuidad de alimentos que contiene prácticas diseñadas para ser aplicadas por los estudiantes y fundamentar su conocimiento práctico sobre el tema.

## **PRÁCTICA 1: Análisis de ambientes.**

### **Introducción**

Las empresas que se encargan de la elaboración de alimentos deben llevar un estricto control microbiológico de ambientes, superficies y manipuladores de manera que se garantice la asepsia del proceso y así evitar la contaminación por microorganismos. Muchos procesos generan aerosoles (partículas de polvo, gotitas de agua y microorganismos) que suspendidos en el aire, que es un medio de transporte para muchos microorganismos, pueden llegar a los alimentos y generar contaminación.

El aire actúa como fuente de contaminación en la industria, aportando una carga variada de microorganismos dependientes del ambiente que rodea la planta, la circulación del aire y la higiene en general. Los microorganismos presentes en el aire generalmente son esporas de hongos, bacterias esporoformadoras y levaduras.

Muchos métodos se han sugerido para efectuar el análisis bacteriológico del aire para determinar el número de microorganismos por unidad de volumen. Tales métodos incluyen los de sedimentación, choque en agar, choque en líquidos y filtración.

### **Objetivos**

Evaluar la carga microbiana presente en el ambiente.

### **Materiales**

1 caja de agar Plate Count

1 caja de agar Papa Dextrosa

Incubadora a 35°C

Incubadora a 25°C

### **Procedimiento**

- Seleccione el sitio donde va a tomar la muestra de aire
- Coloque cada una de las cajas sobre una superficie plana en el sitio donde se va a muestrear el aire.
- Retire la tapa de cada una de las cajas de petri.
- Exponga el agar durante 15 minutos.

- Ponga nuevamente la tapa e incube el agar Papa Dextrosa a 25°C durante 5 días. El agar Plate Count se incuba a 35°C durante 28 horas.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación cuente las colonias en cada uno de los medios de cultivo y exprese los resultados en unidades formadoras de colonia/65cm<sup>2</sup> /tiempo de exposición.

### **Cuestionario**

1. ¿Qué equipos o dispositivos han sido diseñados para evaluación microbiológico de ambientes
2. Investigue por lo menos tres métodos diferentes para el análisis microbiológico de ambientes
3. ¿Qué métodos existen para desinfectar ambientes en industrias de alimentos?
4. ¿Qué tipos de microorganismos se encuentran con mayor frecuencia en los análisis microbiológicos de ambientes?

### **Bibliografía empleada**

## PRÁCTICA 2: Análisis de superficies.

### Introducción

Las superficies en contacto con alimentos son una gran preocupación en la industria de alimentos, debido a posibles deficiencias en los programas de limpieza y desinfección que aumentan la transmisión de microorganismos de un área donde se encuentran en mayor concentración a una de menor concentración. Adicionalmente, es posible la formación de biopelículas en estas superficies que se convierten en focos de contaminación.

Existen diversos métodos para evaluación de superficies como se describe en la figura 1; en este laboratorio se empleará la técnica de hisopado.

### Evaluación de la Higiene de Superficies



14

Tomado y adaptado de How to Clean a Management Guide: Mike Dillon & Chris Griffith

Figura 1. Métodos de Evaluación de la higiene de las superficies. Fuente 3M.

## Objetivos

Evaluar la carga microbiana presente en una superficie en contacto con alimentos.

## Materiales

2 escobillones estériles

1 plantilla de papel cortado con una superficie de 100 cm<sup>2</sup> estéril

2 pipetas de 1 mL estériles

2 tubos de agua peptonada 0.1%

2 cajas de agar Plate Count con 20 ml c/u

2 cajas de agar Papa Dextrosa

Incubadora a 35°C

Incubadora a 25°C

## Procedimiento

- Seleccione la superficie para muestrear, coloque la plantilla sobre esta superficie.
- Tome el escobillón estéril e introdúzcalo en el agua peptonada, escurra en las paredes internas del tubo, pase el escobillón por la superficie de 100 cm<sup>2</sup> con movimiento rotatorio, devuelva el escobillón al tubo y déjelo allí.
- Del tubo tome 0.1 mL y agréguelo a una caja de petri con cada uno de los agares.
- Lleve a incubar hongos y levaduras a 25°C durante 5 días y los aerobios mesófilos a 35°C durante 48h.
- Realice el recuento de las colonias. Clasifique la superficie como limpia, si encuentra entre 0 y 100 UFC; como moderadamente limpia, si encuentra >100 y 1000 UFC; como sucia si encuentra más de 1000 UFC
- Informe el resultado como UFC/100 cm<sup>2</sup>

## Cuestionario

- Existe diferencia en la limpieza y desinfección de una superficie viva o inerte? Justifique su respuesta
- Qué es un programa de limpieza y desinfección?
- Qué es la limpieza por CIP?

## **Bibliografía empleada**

## **PRÁCTICA 3: Análisis de microbiológico a manipuladores.**

### **Introducción**

El manipulador de alimentos desempeña un papel muy importante en la Gestión de Inocuidad de alimentos participando en la “cultura de inocuidad” en forma activa en los diferentes procedimientos, planes, programas y procesos. Directamente este manipulador participa en procesos de contacto directo con alimento, limpieza y desinfección, manipulación de materia prima, entre otras actividades cuya optimización debe asegurar la disminución de las enfermedades transmitidas por alimentos. La herramienta de trabajo más empleada son las manos, por lo cual debe mantenerse siguiendo una rutina estricta de limpieza.

Existen diferentes métodos de evaluación microbiológica de manos, donde se incluyen: contacto directo, enjuague e hisopado.

### **Objetivos**

Evaluar la carga microbiana presente en los manipuladores de alimentos.

### **Materiales**

1 caja de agar Baird Parker

1 caja de agar VRB+Mug

Incubadora a 35°C

### **Procedimiento**

- Identifique la mano dominante en el manipulador y revise la presencia de heridas, cortadas o alguna lesión.
- Por contacto directo tome una impresión de la superficie de la mano dominante sobre las dos placas de agares.
- Incube a 35°C durante 48 horas.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación cuente las colonias en cada uno de los medios de cultivo y exprese los resultados como escaso 0-10 UFC; moderado: 10-20 UFC; abundante: >20 UFC.

### **Cuestionario**

-

- Existen portadores asintomáticos de microorganismos? Para qué casos?
- Qué directrices tiene la Secretaria Distrital de Salud para el análisis de manipuladores de alimentos?
- Qué otros métodos existen para análisis de manipuladores de alimentos?

### **Bibliografía empleada**

## PRÁCTICA 4: Análisis de desinfectantes

### Introducción

Los programas de limpieza y desinfección dependen en gran medida de la metodología empleada, los principios activos de los desinfectantes y la aplicación por parte de los operadores. Igual manera, existen diversidad de factores que deben ser tenidos en cuenta para que un desinfectante pueda actuar con buena capacidad de desinfección. Es importante evaluar la capacidad de estos para su uso en la industria de alimentos. El número, tipo de microorganismos que existen, la calidad del agua y la concentración y/o variedad de los desinfectantes son factores determinantes para la buena o mala calidad en el proceso de desinfección.

En el laboratorio existen diferentes formas de evaluar la capacidad de los desinfectantes, en su mayoría empleando cepas de referencia o aisladas del entorno, y se pueden comparar o no con el desempeño de un desinfectante de referencia. Siempre es bueno evaluar por lo menos tres concentraciones diferentes del desinfectante.

### Objetivos

Evaluar la actividad desinfectante de un producto empleado en la industria de alimentos.

### Materiales

1 tubo tapa rosca 16 x 150 estéril

3 tubos tapa rosca de 16 x 150 con 5 mL de caldo BHI

Cepas puras de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*

Incubadora a 35°C

Pipetas de 1 mL estériles

Pipetas de 5 mL estériles

Asas bacteriológicas

Desinfectante a evaluar

### **Procedimiento**

- Deposite 5 mL del producto a evaluar en la concentración determinada.
- Coloque en contacto la cepa a evaluar con el desinfectante. Empiece a contar el tiempo hasta tener 5 minutos de contacto. Deposite una asada en un tubo de caldo BHI marcado como 5 min.
- Transcurridos otros 5 minutos, de forma tal que hayan transcurrido 10 min de la puesta en contacto del desinfectante con el microorganismo, tome otra asada e inocule en el caldo BHI marcado como 10 min.
- Repita el procedimiento cuando hayan transcurrido 15 min a otro caldo BHI marcado como 15 min.
- Incube a 35°C durante 48 horas.
- Una vez cumplido el tiempo de incubación verifique el crecimiento por turbidez y reporte como positivo o negativo en cada uno de los tiempos evaluados. Discuta.

### **Cuestionario**

- ¿Cuáles son los requisitos del desinfectante ideal para uso en alimentos?
- Describa otras metodologías para evaluación de desinfectantes
- Existen disposiciones metodológicas para la evaluación de los desinfectantes? Cuáles?

### **Bibliografía empleada**

## **PRACTICA 5: Homogenización de muestras de alimentos**

### **Introducción**

Para obtener resultados confiables en un recuento o en un método de número más probable es primordial obtener muestras bien homogeneizadas. Existen diversos aparatos para lograrlo como son el Stomacher o en su ausencia una licuadora con una velocidad de hasta 8000 rpm que permita una buena homogeneización del producto. La idea es liberar a los microorganismos que queremos enumerar hacia la fase líquida de forma que se facilite luego su detección en los medios de cultivo empleados. La fase líquida puede ser agua peptonada 0.1% o solución salina peptonada 0.1%.

### **Objetivos**

Homogenizar adecuadamente la muestra de alimento a evaluar.

### **Materiales**

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para prepara asepticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

### **Procedimiento**

- El trabajo de laboratorio debe iniciarse lo más pronto posible una vez recolectada la muestra. Si no es posible, debe mantenerse refrigerada y procesada en máximo 24 h. Si la muestra está congelada descongelarla en su recipiente original.
- Cuando la muestra es líquida la dilución  $10^{-1}$  se obtiene midiendo 10 mL en un frasco de dilución que contenga 90 mL de agua peptonada 0.1% sosteniendo la pipeta en un ángulo de 45° sobre la parte interior del cuello del frasco. Para muestras sólidas pesar 10 g $\pm$ 0.1 en forma aseptica y depositar en un frasco con 90 mL de agua peptonada 0.1% Guardar una contramuestra para eventuales verificaciones en condiciones adecuadas para el producto.
- Agitar el frasco vigorosamente, dejar en reposo por 2 a 5 min. A partir de aquí transfiera 1 mL de esta que es la dilución  $10^{-1}$  a un tubo de dilución

con 9 mL de agua peptonada 0.1% para obtener la dilución  $10^{-2}$ . Con otra pipeta estéril mezclare cuidadosamente la dilución pipeteando 10 veces, transferir un mL a otro tubo que contenga 9 mL de diluyente para obtener la dilución  $10^{-3}$ .

- Repetir estos pasos hasta obtener el número de diluciones deseadas, cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración.
- Siempre procure sembrar tres diluciones seriadas y consecutivas

### **Cuestionario**

- ¿Qué equipos se han diseñado para homogenizar las muestras de alimentos en el laboratorio?
- ¿Qué haría con un producto cuyo pH sea ácido, cómo procedería para realizar las diluciones? ¿Tendría alguna consideración especial previa su siembra ?
- ¿Qué método emplearía para homogeneizar productos con algo contenido de grasa?

### **Bibliografía empleada**

## PRÁCTICA 6: Recuento de bacterias mesófilas aerobias

### Introducción

Las bacterias mesófilas aerobias se definen como un grupo heterogéneo de bacterias capaces de crecer entre 15°C y 45°C con una temperatura óptima de 35°C $\pm$ 2°C. Es el grupo indicador más grande que existe y es ampliamente utilizado como indicador de vida útil.

Para este recuento se utilizan medios de cultivo que no tengan inhibidores para permitir el crecimiento de los microorganismos. En productos fermentados y/o enlatados no se lleva a cabo este recuento. Un recuento alto en alimentos estables indica materias primas contaminadas o tratamientos no satisfactorios, en productos perecederos puede indicar condiciones inadecuadas de tiempo/temperatura durante su almacenamiento.

Para esta práctica puede traer para analizar una muestra de: arepa precocida, empanada cocida, salchicha, jamón, etc.

### Objetivos

Realizar el recuento de bacterias mesófilas en un alimento por el método de recuento en placa estándar

### Materiales

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para prepara asepticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g $\pm$ 0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

120 mL de agar Plate count estéril y fundido

## Procedimiento

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento
- Siembre en profundidad 1 mL de cada dilución preparada.
- Adicione 15 mL de agar Plate Count fundido a una temperatura de 45°C aproximadamente.
- Mezcle inmediatamente las cajas con el medio de cultivo realizando movimientos en ángulo de 90°, circulares, ascendentes y descendentes)
- Deje solidificar el agar e incube a 35°C+/-0.2 durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 30 y 300 UFC. (Ver Tabla 1).
- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

Tabla 1. Casos recuento de UFC/mL o g

Caso	Qué hacer	Ejemplo
Ninguna de las diluciones contiene 30 UFC	Tomar la dilución más concentrada e informar la cantidad de UFC por el inverso de la dilución	$10^{-1}$ : 18 y 20 $10^{-2}$ : 0 y 0 $10^{-3}$ : 0 y 0  $19 \times 10^1$ UFC/mL
Ninguna de las cajas contiene UFC	Tome la dilución más concentrada e informe menor a 1 por el inverso de la dilución	$10^{-1}$ : 0 y 0 $10^{-2}$ : 0 y 0 $10^{-3}$ : 0 y 0  $< 1 \times 10^1$ UFC/mL
La última dilución excede el rango de conteo de 300 UFC	Divida la caja en octavos y cuente 1 octavo si excede las 200 UFC, se multiplica por el número de divisiones y luego por el inverso de la dilución. En caso de que se obtenga un número inferior, se procede en la misma forma.	$10^{-1}$ : >1600 y >1600 $10^{-2}$ : >1600 y >1600 $10^{-3}$ : >1600 y 1600  $>16 \times 10^5$ UFC/mL  $10^{-1}$ : : >1600 y >1600 $10^{-2}$ : : >1600 y >1600 $10^{-3}$ : 1/8: 135 y 1/8 147  $135 \times 8 = 1080$ $147 \times 8 = 1176$ Promedio 1128 en la dilución $10^{-3}$

		11x10 <sup>5</sup> UFC/mL
--	--	---------------------------

Nota: En el caso de que el recuento se realice en superficie el volumen de inóculo adecuado es de 0.1 mL por lo tanto, en las cajas, queda diluida 10 veces más la concentración. Es decir, a partir de la dilución 10<sup>-1</sup> en la caja quedaría una dilución 10<sup>-2</sup>.

### **Cuestionario**

- ¿Si no tiene agar Plate Count que otro podría emplear?
- Describa que métodos rápidos se pueden emplear para la enumeración de mesófilos aerobios.

### **Bibliografía empleada**

## **PRACTICA 7: Recuento de coliformes en alimentos**

### **Introducción**

Los coliformes son un grupo de microorganismos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* ampliamente difundido en la naturaleza, agua y suelo. Es habitante del tracto digestivo del hombre y de los animales de sangre caliente, por lo anterior, su presencia en alimentos es signo de mala calidad higiénica del proceso, recontaminación post-proceso y/o falta de higiene en los manipuladores. Su principal característica es fermentar lactosa. Su uso como indicador es cuestionado actualmente gracias a reportes de su presencia normal en habitats acuáticos y otros huéspedes.

Para esta semana puede traer para analizar: chorizo, queso fresco, cuajada.

### **Objetivos**

Realizar el recuento de coliformes en un alimento por el método de recuento en placa estándar

### **Materiales**

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para preparar asépticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g+/-0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

120 mL de agar violeta rojo bilis fundido (VRB)

### **Procedimiento**

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento
- Siembre en profundidad 1 mL de cada dilución preparada.
- Adicione 15 mL de agar VRB fundido a una temperatura de 45°C aproximadamente.

- Mezcle inmediatamente las cajas con el medio de cultivo realizando movimientos en ángulo de 90°, circulares, ascendentes y descendentes)
- Deje solidificar el agar e incube a 35°C±0.2 durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 20 y 200 UFC. (Ver Tabla 1).
- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

### **Cuestionario**

- ¿Si no tiene agar VRB que otro podría emplear?
- Describa que métodos rápidos se pueden emplear para la enumeración de coliformes.

### **Bibliografía empleada**

## PRÁCTICA 8: Recuento de hongos y levaduras en alimentos

### Introducción

Los hongos multicelulares (también denominados mohos) cuentan con un micelio verdadero y su crecimiento se reconoce por su aspecto aterciopelado y algodonoso. Las levaduras son hongos unicelulares de apariencia cremosa y que pueden crecer como agregados celulares. Por su característica de heterótrofos y su amplia distribución en todos los estratos bióticos e inertes, se genera su fácil y frecuente aparición como contaminantes en productos alimentarios que les proveen los nutrientes necesarios. La presencia de los hongos en alimentos puede indicar condiciones de la materia prima, deterioro del alimento y posible presencia de micotoxinas.

La muestra de esta semana puede corresponder a: arepa precocida, pan, galletas.

### Objetivos

Realizar el recuento de hongos y levaduras en un alimento por el método de recuento en placa estándar

### Materiales

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para preparar asépticamente la muestra.

Incubadora a 25°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g $\pm$ 0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

120 mL de agar Yeast Extract Glucose Chloranphenicol (YGC)

### Procedimiento

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento
- Siembre en profundidad 1 mL de cada dilución preparada.

- Adicione 15 mL de agar YGC fundido a una temperatura de 45°C aproximadamente.
- Mezcle inmediatamente las cajas con el medio de cultivo realizando movimientos en ángulo de 90°, circulares, ascendentes y descendentes)
- Deje solidificar el agar e incube a 25°C durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 20 y 200 UFC. (Ver Tabla 1).
- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

### **Cuestionario**

- Investigue sobre cinco micotoxinas que puedan estar presentes en alimentos.
- Identifique cinco alimentos a los que se le realice recuento de hongos y levaduras. Indique los valores.
- Qué factores ambientales favorecen el crecimiento de hongos en la industria de alimentos.

### **Bibliografía empleada**

## **PRACTICA 9: Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos**

### **Introducción**

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo altamente sensible a la temperatura pero puede producir 9 diferentes tipos de toxinas que se caracterizan por ser termoestables. Por lo tanto, su presencia en alimentos es indicador de condiciones higiénicas escasas. Este microorganismo es el causante de brotes en los hogares y para su confirmación deben realizarse pruebas como la coagulación del plasma deshidratado de conejo o la prueba de la nucleasa termoestable.

Para esta semana, la muestra puede corresponder a: queso fresco, cuajada, empanada, crema de leche no pasteurizada.

### **Objetivos**

Realizar el recuento de *S. aureus* coagulasa (+) en un alimento por el método de recuento en placa

### **Materiales**

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para preparar asépticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g±0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

6 cajas de agar Baird Parker (BP)

### **Procedimiento**

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento

- Siembre en superficie 0.1 mL de cada dilución preparada.
- Distribuya con un rastrillo de vidrio o asa de drigalsky teniendo cuidado de no alterar las diluciones.
- Incube a 35°C±0.2 durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de aquellas colonias que produzcan halo de lipólisis y proteólisis.
- Reporte las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 20 y 200 UFC. (Ver Tabla 1). Este recuento es presuntivo para *S. aureus* hasta la confirmación con la prueba de coagulasa.
- Confirme 5 colonias presuntivas con la prueba de la coagulasa en plasma de conejo deshidratado.
- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

#### Prueba de la coagulasa

- Transfiera las colonias sospechosas de *S. aureus* a un tubo con 0.3 ml de caldo BHI
- Lleve a incubar 18-24 h a 35°C
- Coloque 0.5 ml de plasma deshidratado de conejo e incube a 35°C, verifique la formación de coagulo durante 6 horas continuas. Para un resultado positivo, el coagulo debe mantenerse firme si se invierte el tubo de ensayo.
- Reporte

#### Cuestionario

- Cuál es la importancia de la presencia de *S. aureus* en alimentos. Qué toxinas produce?
- Qué otras pruebas puede realizar para confirmar *S. aureus*?

#### Bibliografía empleada

## PRÁCTICA 10: Recuento de *Bacillus cereus*

### Introducción

Para esta semana, la muestra a analizar puede ser: arroz con pollo, arroz chino, condimentos molidos.

### Objetivos

Realizar el recuento de *B. cereus* en un alimento por el método de recuento en placa

### Materiales

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para preparar asépticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g+/-0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

6 cajas de agar Mossel

### Procedimiento

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento
- Siembre en superficie 0.1 mL de cada dilución preparada.
- Distribuya con un rastrillo de vidrio o asa de drigalsky teniendo cuidado de no alterar las diluciones.
- Incube a 35°C+/-0.2 durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de aquellas colonias que produzcan halo de lipólisis.

- Reporte las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 20 y 200 UFC. (Ver Tabla 1).
- Confirme 5 colonias presuntivas con las siguientes pruebas bioquímicas:
- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

### **Cuestionario**

- Cuáles y que tipo de toxinas produce *B. cereus*? Qué toxinas produce?
- Qué otras especies del genero de *Bacillus* se han visto implicadas en intoxicaciones alimentarias?

### **Bibliografía empleada**

## PRÁCTICA 10: Análisis de agua envasada

### Introducción

.

Para esta semana, la muestra debe ser un agua potable o agua envasada.

### Objetivos

#### Materiales

Homogeneizador

3 pipetas de 1 mL estériles

1 frasco de dilución con 90mL de agua peptonada 0.1%

2 tubos tapa rosca de 16 x 150mm con 9 mL de agua peptonada 0.1%

Instrumentos estériles para preparar asépticamente la muestra.

Incubadora a 35°C

Marcador de vidrio

Balanza sensibilidad 500 g+/-0.1

6 cajas de petri estériles(duplicado)

6 cajas de agar Mossel

#### Procedimiento

- Realice las diluciones seriadas con base 10 de acuerdo al tipo de alimento
- Siembre en superficie 0.1 mL de cada dilución preparada.
- Distribuya con un rastrillo de vidrio o asa de drigalsky teniendo cuidado de no alterar las diluciones.
- Incube a 35°C+/-0.2 durante 48 h
- Transcurrido el tiempo de incubación saque las cajas de la incubadora y realice el recuento de aquellas colonias que produzcan halo de lipolisis.
- Reporte las Unidades Formadoras de colonia (UFC) por mL o g. Procure ubicar las cajas cuyo rango de conteo este entre 20 y 200 UFC. (Ver Tabla 1).
- Confirme 5 colonias presuntivas con las siguientes pruebas bioquímicas:

- Una vez obtenido el recuento de cada caja se saca el promedio y se multiplica por el inverso de la dilución.

### **Cuestionario**

Qué normatividad existe en Colombia para el agua envasada?

Cuáles parámetros contempla para la aptitud del agua envasada?

### **Bibliografía empleada**