

Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte

Curso:
Un enfoque práctico para la inocuidad de los alimentos

**Métodos de detección de
contaminación microbiana**

Facilitadoras


M.Sc. Flavia Andino Rugama

Ing. Jorling Castillo

Introducción

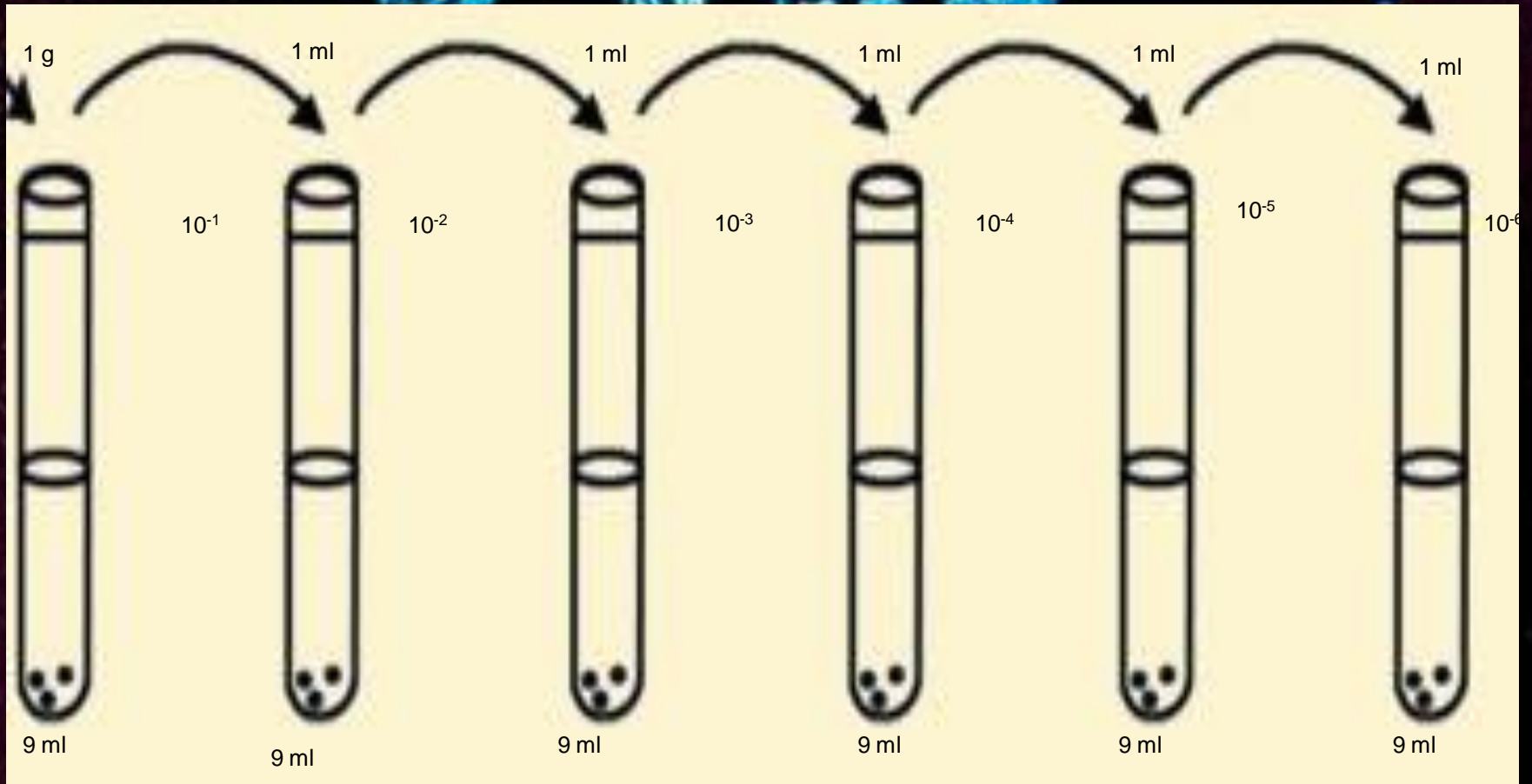
A microscopic image showing a large, green, rod-shaped bacterium with a textured surface. Numerous blue, filamentous structures are attached to the bacterium, extending outwards. The background is dark with some faint, scattered blue spots.

- Primeramente, para implementar cualquier método de detección, se requiere preparar las muestras del alimento, lo que generalmente consiste en la elaboración de diluciones que permitan disminuir la concentración del microorganismo en la muestra y poder observar mejor.

- 
- A microscopic image showing several green, rod-shaped bacteria. The bacteria are arranged in a cluster, with some showing a distinct constriction or division. The background is dark, and there are blue, filamentous structures scattered around the bacteria, possibly representing a network of fibers or a specific type of microorganism.
- Una vez que se han elaborado las diluciones se procede a la utilización de cualquiera que sea el método seleccionado, por esta razón, abordaremos primeramente cómo preparar estas diluciones y cómo trabajar las muestras de los microorganismos.


Diluciones de la muestra de alimento para detección de contaminación

- Cuando se tiene una muestra de alimento líquida y sólida se procede a elaborar una solución madre que consiste en colocar el material cubierto con el microorganismo en un recipiente que contiene 10 ml de agua destilada estéril con 0.01 % de Tween 80, solución salina, agua de peptona etc, cuya suspensión resultante se debe agitar por 1 minuto, para obtener la suspensión concentrada del inóculo.




Aislamiento de microorganismos

- El aislamiento es una etapa importante en el estudio de microorganismos y comprende la separación de aquel organismo de interés con respecto a otros que pueden estar presentes en la misma muestra de alimento.
- La tarea de aislamiento de microorganismos hay que plantearla considerando las características del producto y del proceso que se va a realizar ya que nos indicará dónde tomar las muestras.

A scanning electron micrograph (SEM) showing several green, rod-shaped bacteria. The bacteria are oriented horizontally and vertically. They have a textured surface and rounded ends. Interspersed among the bacteria are intricate, blue, filamentous structures that resemble a network of fine fibers or a complex web. The background is dark, making the green and blue structures stand out.

Para esto, se realizan una serie de pasos donde se aplican técnicas microbiológicas convencionales y comprende cuatro etapas.

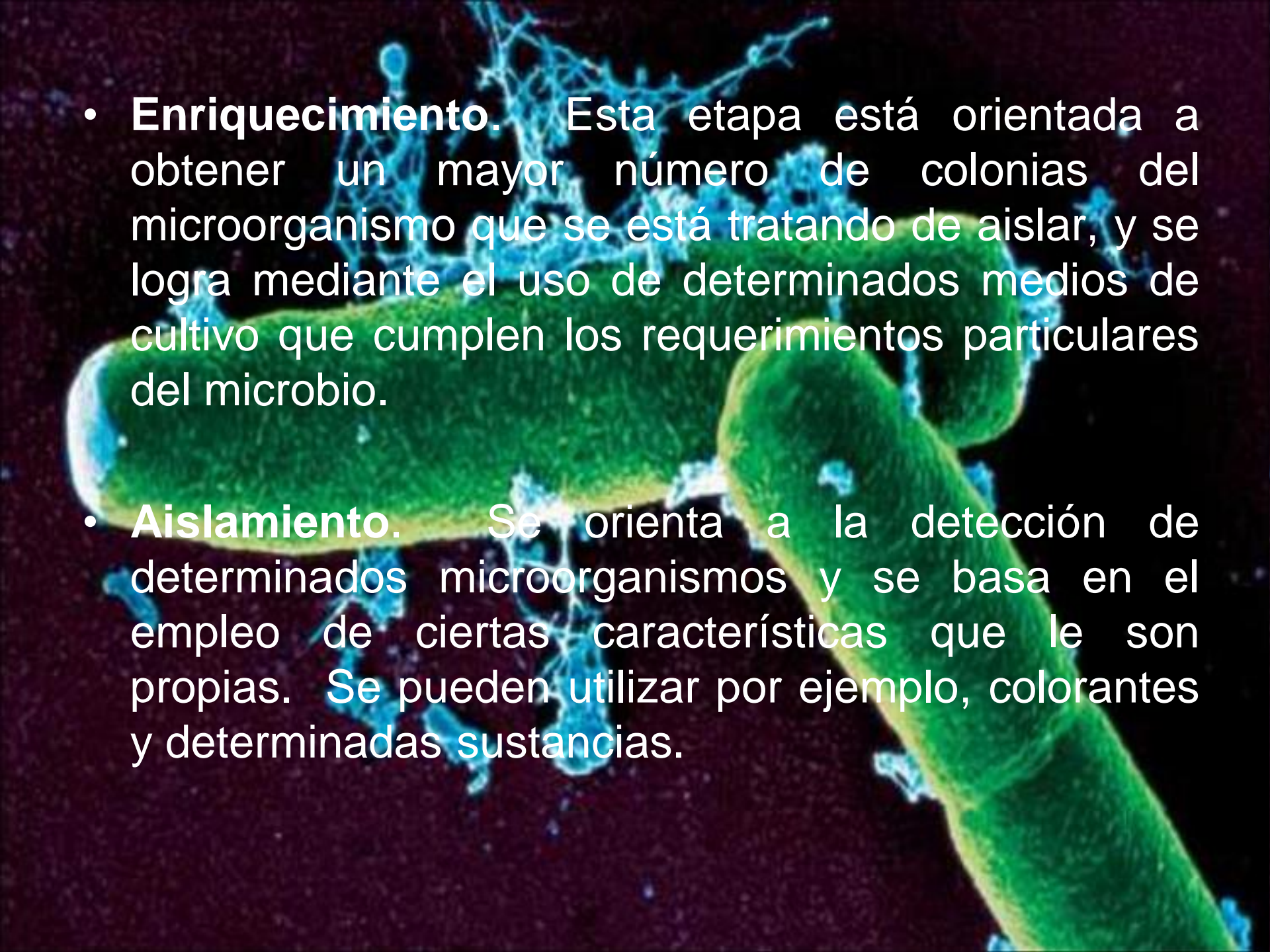
- Muestreo
- Tratamiento de la muestra
- Enriquecimiento
- Aislamiento
- Manutención y preservación de los microorganismos

- 
- **Muestreo:** Corresponde a la parte esencial que garantiza que contemos con el material más idóneo del microorganismo que estamos estudiando y consiste en la toma de muestra, garantizar los materiales necesarios y la preparación de las diluciones
 - **Tratamiento de la muestra.** Una vez que se tienen las diluciones de la muestra se procede a la siembra del microorganismo en medios de cultivos. Hay una gran variedad de medios y la selección de uno u otro dependerá del microorganismo o bien del interés particular sobre el microorganismo que se está estudiando.



Una vez que se tienen los resultados de la siembra se procede a la selección de colonias.

- Utilizando los medios de cultivo se procede a realizar el aislamiento de estas colonias, luego la resiembra de colonias para purificación y finalmente cuando ya se tienen los cultivos puros, éstos deben manejarse adecuadamente para no contaminarlos.

- 
- **Enriquecimiento.** Esta etapa está orientada a obtener un mayor número de colonias del microorganismo que se está tratando de aislar, y se logra mediante el uso de determinados medios de cultivo que cumplen los requerimientos particulares del microbio.
 - **Aislamiento.** Se orienta a la detección de determinados microorganismos y se basa en el empleo de ciertas características que le son propias. Se pueden utilizar por ejemplo, colorantes y determinadas sustancias.

- **Manutención y preservación de los microorganismos.**

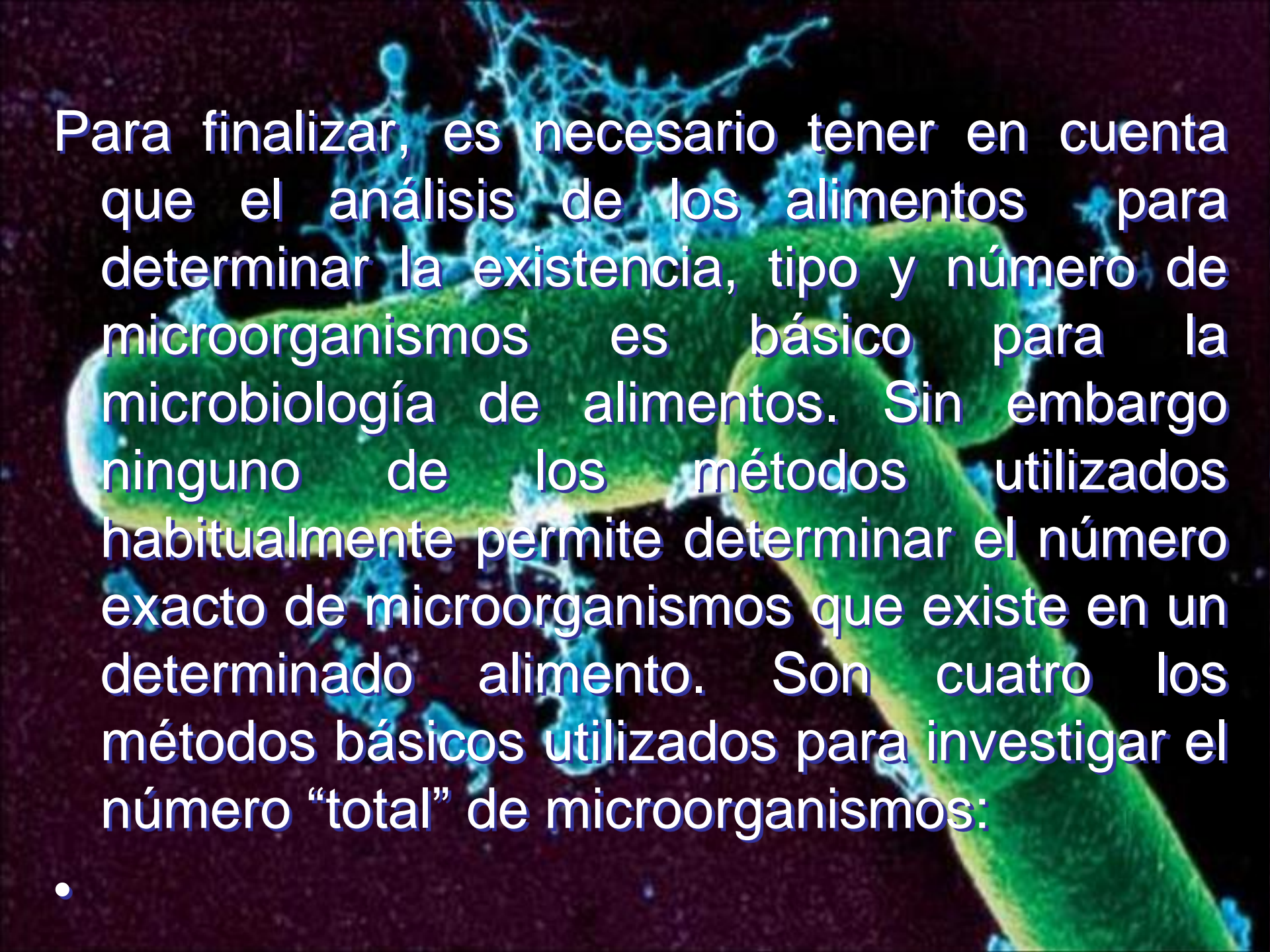
Este tiene el propósito de poder conservar los cultivos puros por algún tiempo y conlleva:

- Preservar la pureza genética del cultivo sin pérdida de ninguna de sus propiedades bioquímicas.
- Preservar los niveles de su productividad inicial.
- Lograr que el cultivo pueda ser transportado y manejado con facilidad

Técnicas de conservación de microorganismos

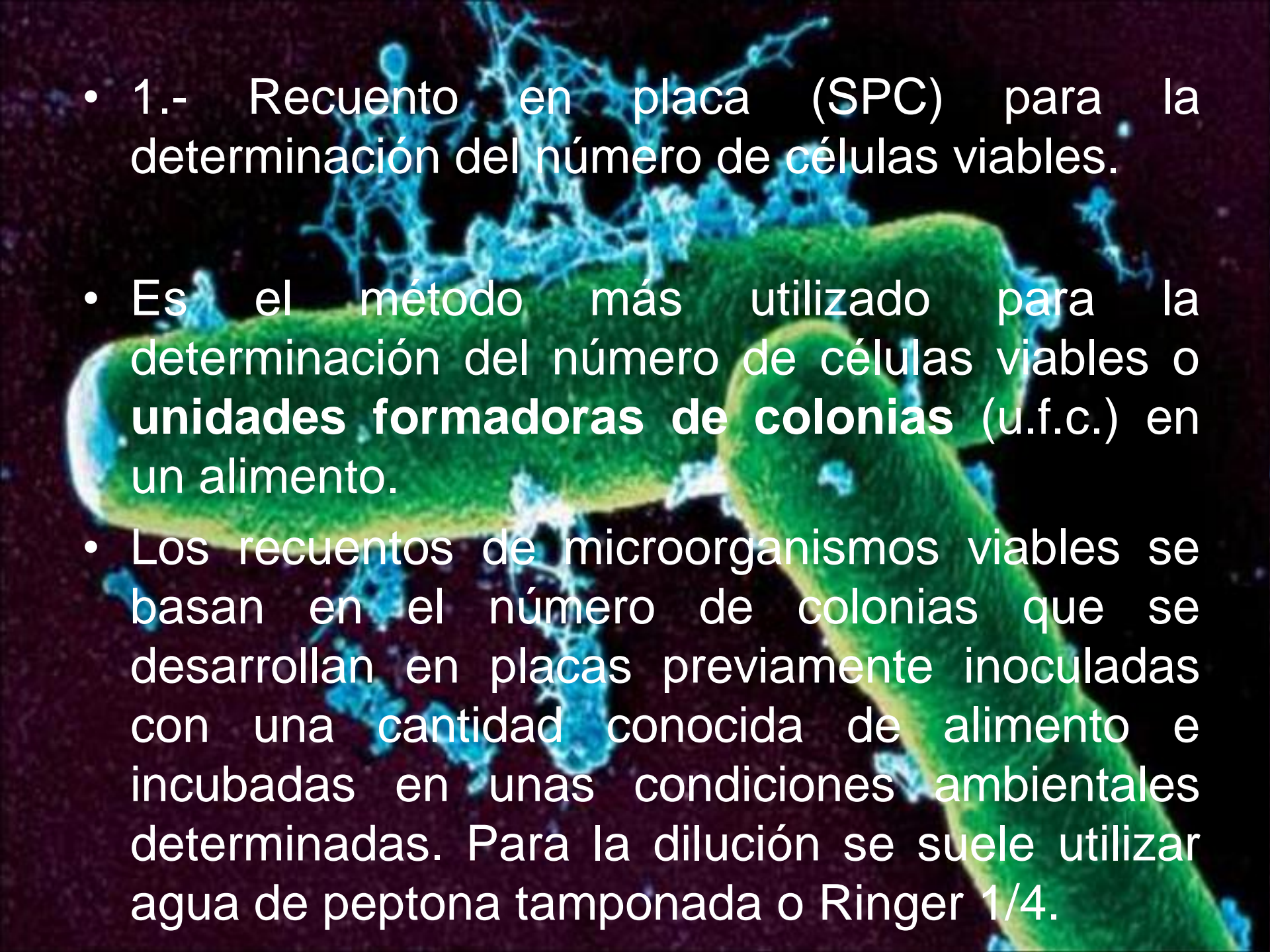
- Subcultivos
- Mantenimiento bajo capa de aceite
- Liofilización
- Congelamiento



A microscopic image showing several green, rod-shaped bacteria. Some of these rods are connected by thin, blue, filamentous structures, possibly representing a biofilm or a network of cells. The background is dark, making the green and blue structures stand out.

Para finalizar, es necesario tener en cuenta que el análisis de los alimentos para determinar la existencia, tipo y número de microorganismos es básico para la microbiología de alimentos. Sin embargo ninguno de los métodos utilizados habitualmente permite determinar el número exacto de microorganismos que existe en un determinado alimento. Son cuatro los métodos básicos utilizados para investigar el número “total” de microorganismos:

-

- 
- 1.- Recuento en placa (SPC) para la determinación del número de células viables.
 - Es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o **unidades formadoras de colonias (u.f.c.)** en un alimento.
 - Los recuentos de microorganismos viables se basan en el número de colonias que se desarrollan en placas previamente inoculadas con una cantidad conocida de alimento e incubadas en unas condiciones ambientales determinadas. Para la dilución se suele utilizar agua de peptona tamponada o Ringer 1/4.

- 2.- Método del número más probable (MPN) de gérmenes como cálculo estadístico del número de células viables

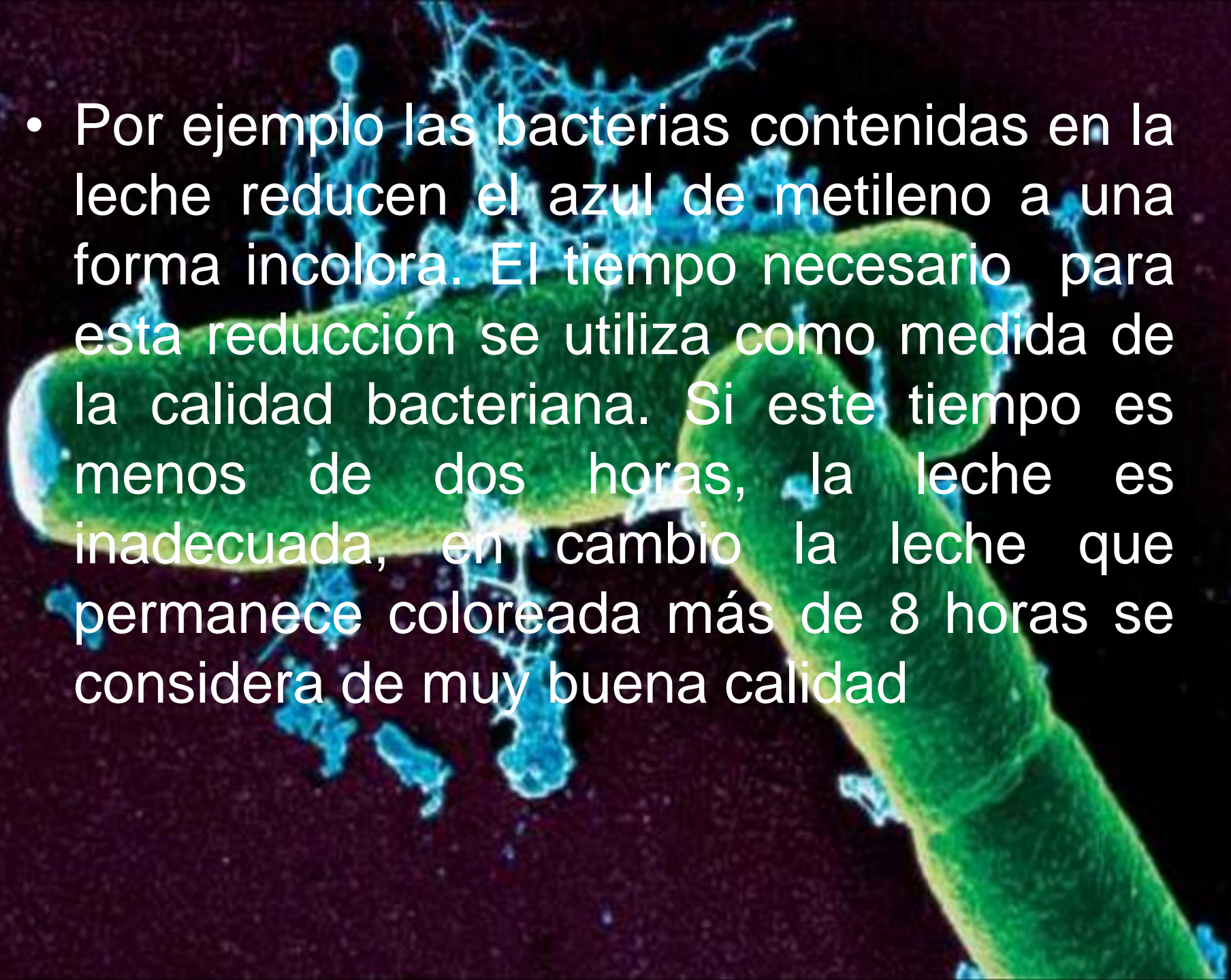
Se basa en la determinación de presencia o ausencias de un determinado tipo de m.o. (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio), en cantidades decrecientes de muestra. La muestra de alimento se procesa como en el caso anterior en tres diluciones proporcionales seriadas sembradas en 9 a 15 tubos del medio adecuado, para el método de los 3 ó 5 tubos respectivamente

3.- Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora

- Está basado en el uso de colorantes que pasan por un proceso de reducción. Al alimento adecuadamente preparado se añaden soluciones patrón de azul de metileno o de resazurina y se observa el proceso de la reducción del colorante (de azul a blanco para el azul de metileno; de azul apizarrado a rosa o blanco para la resazurina). El tiempo necesario para que se produzca la reducción del colorante está relacionado con el número de microorganismos de la muestra.

•

- Por ejemplo las bacterias contenidas en la leche reducen el azul de metileno a una forma incolora. El tiempo necesario para esta reducción se utiliza como medida de la calidad bacteriana. Si este tiempo es menos de dos horas, la leche es inadecuada, en cambio la leche que permanece coloreada más de 8 horas se considera de muy buena calidad




4. Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables

- Se prepara en portaobjetos corrientes, o especiales, se practican extensiones de la muestra de alimento (o diluciones bajas de él), se tiñen con un colorante adecuado y se cuentan las células microbianas (aisladas o en grupos) de un determinado número de campos microscópicos. Con estos datos se calcula el número de microorganismos por gramo usando el factor del microscopio.

- 
- A microscopic image showing several green, rod-shaped bacteria. Some of the bacteria are covered with a complex network of blue, fluorescent, branching structures, possibly representing a biofilm or a specific surface coating. The background is dark, making the green and blue structures stand out.
- Estos métodos se emplean como parte de los métodos de detección para un gran número de microorganismos, los que dependen de las características del microbio a estudiar. A continuación se explicarán los métodos de detección mayormente empleados para la gran mayoría de los alimentos y que se consideran básicos en el análisis de los mismos.

-

A microscopic image showing green, rod-shaped bacteria with a textured surface. Some bacteria are in the foreground, while others are in the background. There are also blue, filamentous structures scattered throughout the scene, possibly representing other microorganisms or a network of fibers.

- **4.3 Método de detección de mesófilos aerobios**

En este grupo se incluyen todas las bacterias, mohos y levaduras capaces de desarrollarse a 30° C en las condiciones establecidas.

En este recuento se estima la microflora total sin especificar tipos de microorganismos.

El método de detección de mesófilos aerobios indica el grado de contaminación de una muestra y las condiciones que han favorecido o reducido la carga microbiana. Desde luego, no se aplica a alimentos fermentados.


Uso de las Placas PetrifilmMR

- La Placa PetrifilmMR para Recuento de Aerobios Totales (Aerobic Count AC) es un sistema de medio de cultivo listo para ser empleado, que contiene nutrientes del Agar Standard Methods, un agente gelificante soluble en agua fría y un tinte indicador que facilita la enumeración de las colonias. Las Placas PetrifilmMR AC se utilizan en la enumeración de la población total existente de bacterias Aerobias en productos, superficies, etc.

Método de detección de coliforme fecales

Para el recuento de y coliforme también se utiliza la técnica de placas Petrifilm EC, el cual contiene nutrientes de Bilis Rojo Violeta (VRB), un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador que facilita la enumeración de las colonias.





Para realizar prueba de coliforme se usan dos procedimientos:

1.El de filtración a través de la membrana (MF)

2.El del número más probable (MPN) o bien el método de tubos múltiples.

Este método se basa en determinar la presencia o ausencia de un terminado MO



Este método se analiza en forma paralela por triplicado o quintuplicadas proporciones de la muestra cada vez menores en un medio líquido

Ejemplo: Se utiliza un total de nueve tubos con medio de cultivo, en tres de los cuales se siembra 0.1g de muestra, en tres 0.01g y en los otros tres 0.001g. Estos se incuban, se observan y cuenta el número de tubos positivos.

Ocasionalmente, es necesario subcultivar cada uno de los tubos positivos, o presuntamente positivos a placa, o a otro tubo (con el mismo u otro medio) a efectos de confirmarlo.

Prueba de coliformes totales

A scanning electron micrograph (SEM) of a green, rod-shaped bacterium, likely a coliform, with numerous blue flagella extending from its surface. The bacterium is shown in a three-dimensional perspective, with one end appearing rounded and the other more tapered. The background is dark, highlighting the intricate structure of the cell and its appendages.

1. Prueba presuntiva

- Caldo Lauril Triptosa (CLT).
- Caldo Mc. Conkey.
- Caldo lactosa.
- Medio EC.

2. Prueba confirmativa:

- Medio EC.
- Medio bilis lactosa (BLVB)

Día 1 (Prueba presuntiva)



1. Preparación del material.
2. Realizar diluciones seriadas de la muestra de agua hasta 10^{-3} en agua peptonada.
3. Realizar 5 pases de 1 ml. de cada una de las diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) a tubos con 9 ml. de caldo **Lauril sulfato** y campanas Durham.
4. Dejar incubando de 24 a 48 hrs. a 35°C .

Día 2 (prueba confirmativa)

A scanning electron micrograph (SEM) of a bacterium, likely a member of the genus Escherichia. The bacterium is shown in a longitudinal section, revealing its segmented structure. The surface is covered with numerous blue, filamentous structures, which are likely flagella or pili, extending outwards. The background is dark, highlighting the intricate details of the bacterial surface.

1. Realizar pases con alíquotas de 1ml. de cada los 5 tubos por dilución a tubos con medio EC y campanas Durham.
2. Dejar incubando de 24 a 48 hrs. a 35°C.

Procedimiento

PASO 1

1 ml



Muestra

10^{-1}



1 ml

1 ml



1 ml

10^{-2}

1 ml



1 ml

10^{-3}

Realizar diluciones hasta 10^{-3}

Sembrar de cada dilución por quintuplicado.

PASO 2

1

2

3

4

5



10^{-1}

1

2

3

4

5



10^{-2}

1

2

3

4

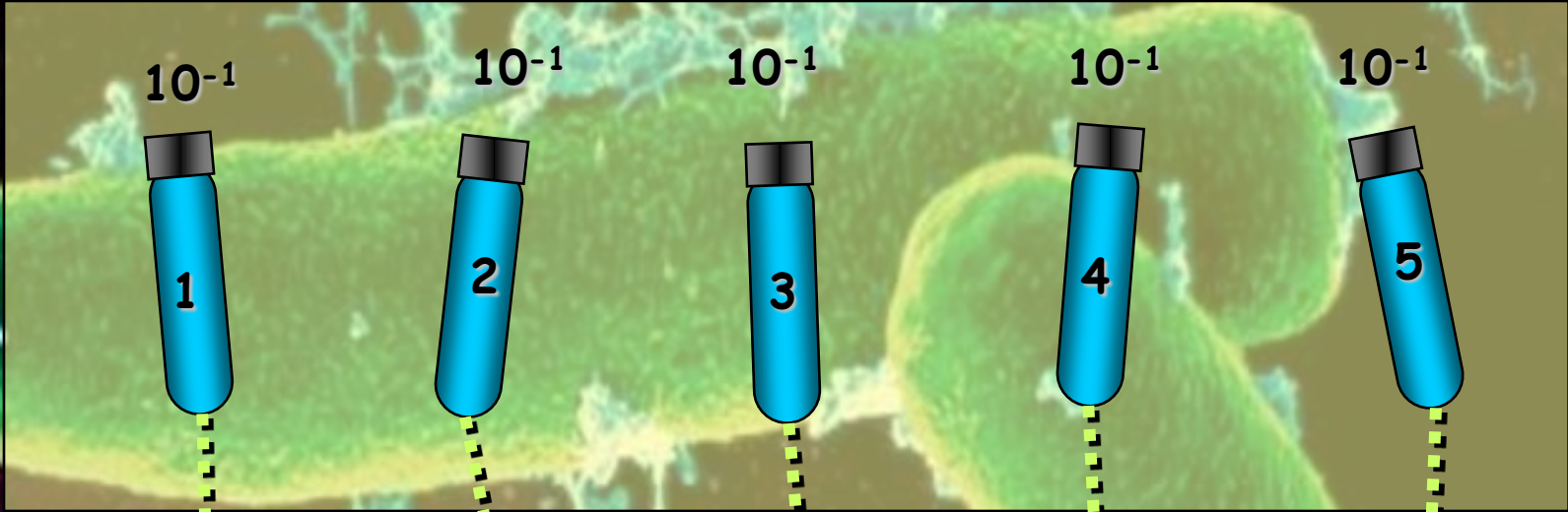
5



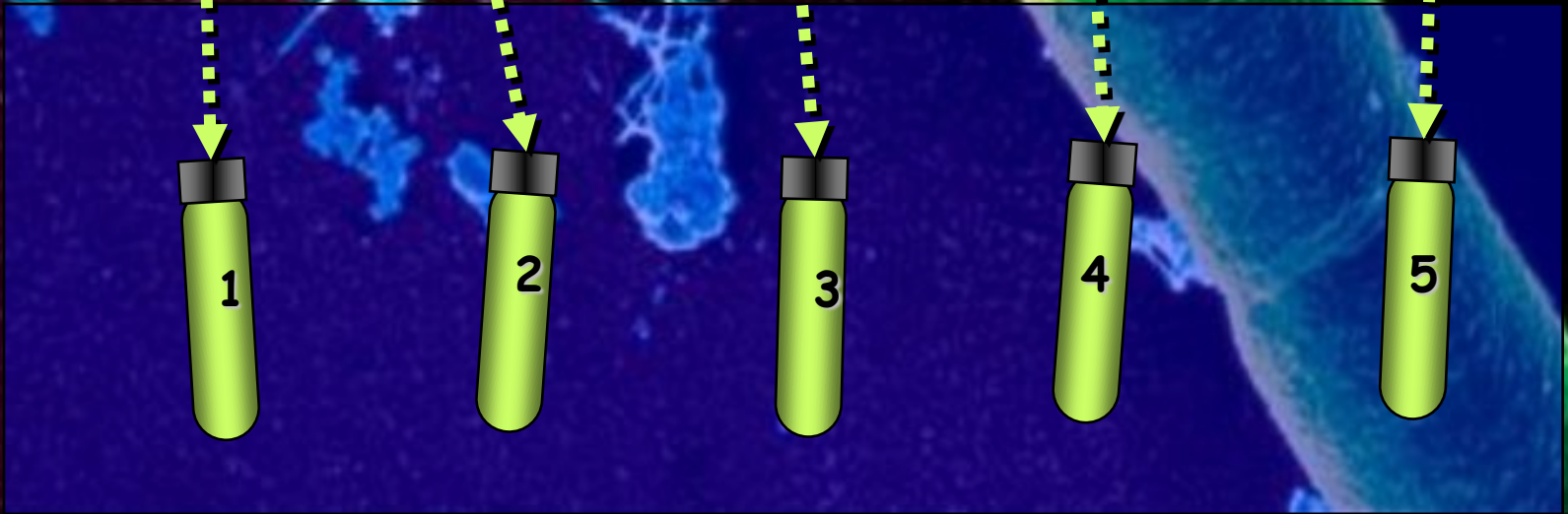
10^{-3}

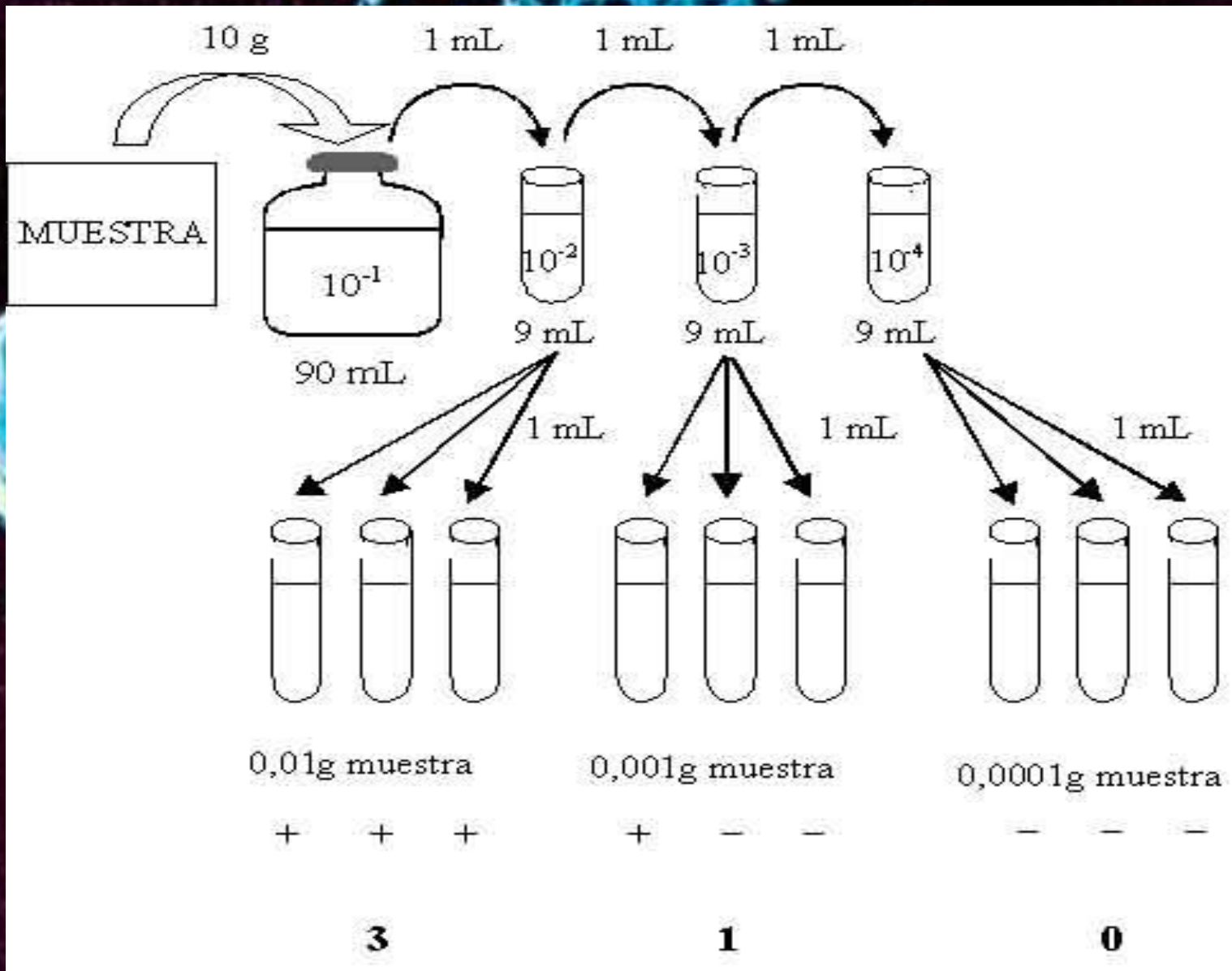
Transferir hacia tubos con caldo EC.

Caldo Lauril Sulfato

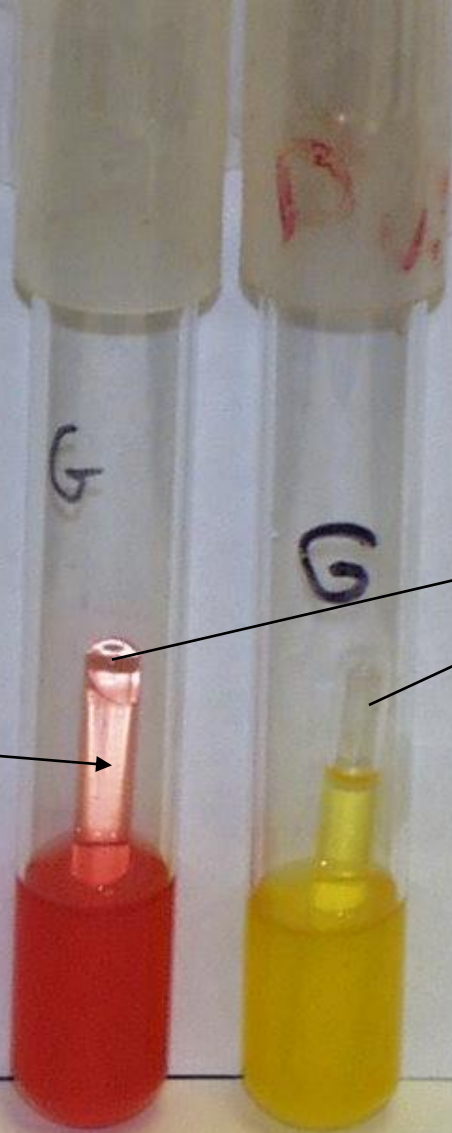


Caldo EC.





Producción de
Gas



Tubo Durham

Análisis de resultados MNP

Tubos

		Dilución		
		10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
1	✓	X	X	
2	✓	✓	X	
3	✓	✓	X	
4	X	X	X	
5	X	X	✓	
	3	2	1	

Pos*	MPN	Pos*
10;1;0,1		10;1;0,1
300	7.8	400
301	11	401
302	13	402
303	16	403
304	20	404
305	23	405
310	11	410
311	14	411
312	17	412
313	20	413
314	23	414
315	27	415
320	14	420
321	17	421
322	20	422
323	24	423
324	27	424
325	31	425
330	17	430
331	21	431
332	24	432
333	28	433
334	31	434

Método de detección Echerichia coli.

- Se utiliza el método NMP y el de *Petrifilm* que al igual que en el caso explicado anteriormente, es un método rápido (24 – 48 horas) de detección de este microorganismo



- Cuando el número de células de *E. coli* en los alimentos sea muy inferior al señalado más arriba, procede realizar las pruebas de presencia o ausencia o una determinación por el método del NMP. También en este caso se cuenta con una técnica fiable. Primero se lleva a cabo el enriquecimiento en el clásico caldo lactosado bilis verde brillante y después agar de MacConkey que se incuba a 44°C.

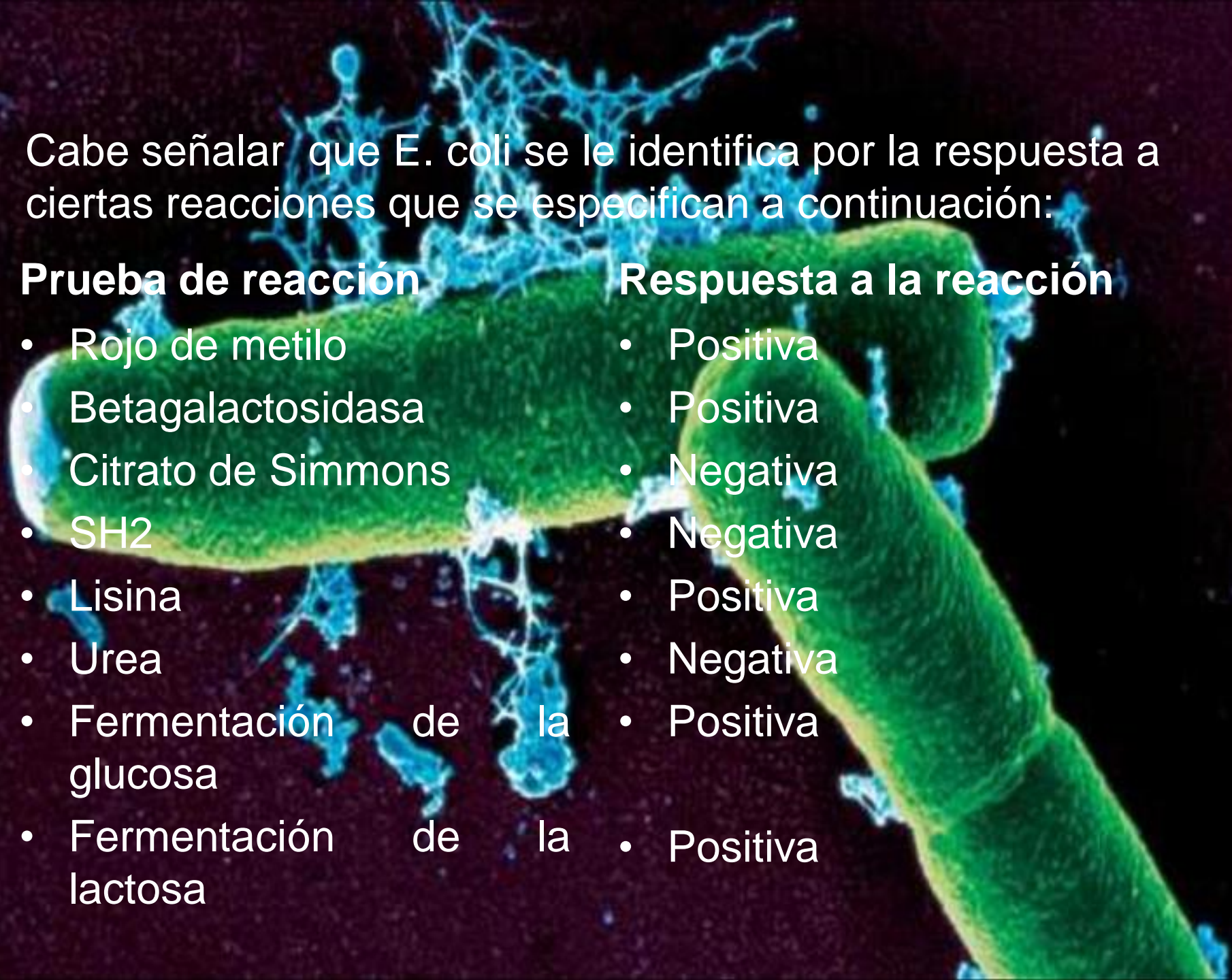
Cabe señalar que E. coli se le identifica por la respuesta a ciertas reacciones que se especifican a continuación:

Prueba de reacción

- Rojo de metilo
- Betagalactosidasa
- Citrato de Simmons
- SH2
- Lisina
- Urea
- Fermentación de la glucosa
- Fermentación de la lactosa

Respuesta a la reacción

- Positiva
- Positiva
- Negativa
- Negativa
- Positiva
- Negativa
- Positiva
- Positiva



Gracias por su
atención

