Universidad Simón Bolívar
Profra.: Mtra. Martha Flores
Materia: Microbiología de Alimentos
Alumno: Ana Anaya y Jorge A. Noguez

Practica 1

Recuento de Mesófilos Aerobios

Objetivo:

Describir la presencia Mesófilos Aerobios (MA) en alimentos utilizando las técnicas de vaciado en placa e inoculación en superficie.

Introducción

Recuento de Microorganismos

El análisis de los alimentos nos ayuda a determinar la existencia, tipo y número de microorganismos. Sin embargo ninguno de los métodos utilizados habitualmente permite determinar el número exacto de microorganismos que existe en un determinado alimento. Más que recuentos, estas técnicas proveen medios para estimar contenidos microbianos.

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
2. Método del número más probable (NMP) de gérmenes como cálculo estadístico del número de células viables
3. Técnicas de reducción de colorantes para el cálculo del número de células viables con capacidad reductora
4. Recuento microscópico directo (DMC) tanto para células viables como para las no viables

Estos recuentos no pueden considerarse como recuentos totales ya que solo son susceptibles del contaje aquellos microorganismos capaces de crecer en las condiciones establecidas. El **recuento en placa** es el método más utilizado para la determinación del número de células viables o unidades formadoras de colonias (UFC) en un alimento. Se basa 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.

El intervalo de temperaturas en el que crecen los microorganismos es muy amplio: de – 34° C a > 90° C. En función de esto se encuadra a los microorganismos en tres grupos (Ver Tabla 1):

Grupo	Temperatura de crecimiento (°C)
Psicótropos	<7
Mesófilos	20 – 37 Óptima entre 30 - 40
Termófilos	45° C<

Tabla 1. Agrupación de microorganismos dependiendo a su temperatura de crecimiento.

Mesófilos Aerobios

Conformación del grupo

Encontrarnos un grupo heterogéneo, teniendo en común el carácter aerobio y proliferación entre 20 y 37°C. Encontramos a Bacilos, cocos, formas intermedias, Gram positivos y Gram negativos

Significado de su presencia

- Indicador de presencia de gérmenes patógenos
- Indicador del valor comercial de un alimento
- Indicador de las condiciones higiénicas en que se ha sido manejado un producto
- Como un indicador de la idoneidad de un ingrediente crudo que se va a incorporar a un alimento
- Para verificar la eficiencia de un proceso germicida o de preservación
- Para predecir la vida de anaquel de un alimento.

Un recuento elevado puede significar:
Excesiva contaminación de la materia prima
Deficiente manipulación durante el proceso de elaboración
La posibilidad de que existan patógenos, pues estos son Mesófilos
La inmediata alteración del producto
El recuento de Mesófilos nos indica las condiciones de salubridad de algunos alimentos.

Un recuento bajo de aerobios Mesófilos no implica o no asegura la ausencia de patógenos o sus toxinas, de la misma manera un recuento elevado no significa presencia de flora patógena. Ahora bien, salvo en alimentos obtenidos por fermentación, no son recomendables recuentos elevados.

Recuento en el laboratorio

Se realiza a 35°C en lácteos para evaluar la calidad microbiológica de diferentes alimentos. Esto con el fin de obtener cifras máximas en los recuentos. No olvidar que el número de colonias finalmente contadas en las placas es el resultado del crecimiento de las bacterias afectado por diversos factores como:

- Estado fisiológico
- Disponibilidad d nutrientes específicos
- Antagonismo microbiano
- Presencia de inhibidores
- Preparación relativa de cada grupo o espacio
- pH
- Actividad del agua
- Temperatura de incubación
- Potencial de óxido-reducción del medio

Análisis Microbiológico

Para realizar los análisis microbiológicos se utilizó la siguiente metodología.

Material

- 4 matraces
- Erlenmeyer
- 20 frascos con tapa
- 25 tubos
- 4 agitadores
- 1 gradilla
- 2 vasos pp 1L
- 2 pipetas 10ml
- 2 probetas de 100ml
- 4 espátulas
- Balanza

Preparación

- Preparar 20 frascos cada uno con 90ml de agua peptonada.
- En 4 matraces de 500ml cada uno con 250ml de agar BHI
- En 2 matraces de 1000ml cada uno con 550 de agar de BHI
- En 25 tubos $^{16}/_{25}$ con 9ml de agua peptonada.

Técnica de vaciado en placa

- Homogenizar el cultivo agitando vigorosamente la muestra.

- Transferir 10ml. del cultivo a la botella conteniendo 90ml. de agua peptonada, agitar y transferir 1ml. a un tubo conteniendo 9ml. de agua peptonada, agitar y transferir 1ml. a otro tubo conteniendo 9ml. de agua peptonada.
- Agitar el contenido del tubo y transferir 1ml. a otro tubo como en el caso anterior (Dilución 10^{-3}), y transferir otro mililitro en caso de realizar la dilución 10^{-4} y así sucesivamente para otras diluciones.
- Proceder de igual manera para realizar la dilución 10^{-3}.
- Al concluir cada dilución inocular 1ml. en una caja de Petri, previamente marcada, indicando la dilución correspondiente, antes de preparar la siguiente dilución.,
- Agregar a cada caja 15ml. (en forma aproximada) de agar nutritivo, fundido y enfriado a 45°C.
- Incorporar el inóculo al medio por rotación de la caja sobre la mesa, procurando levantar ligeramente la tapa.
- Dejar solidificar las cajas.
- Incubar las cajas a 35°C por 48 horas.

Técnica de inoculación en superficie

- A partir de las 5 diluciones que se hicieron anteriormente se siembran 5 cajas de Petri conteniendo agar nutritivo, adicionando 0.1ml. de cada dilución en el contorno de la placa correspondiente.
- Introducir en alcohol la varilla de vidrio y flamearla, dejarla enfriar en un extremo de la caja.
- Extender con la varilla el inóculo en toda la superficie de la placa pasando la varilla repetidas veces. Utilizar la varilla flameada para cada dilución.
- Dejar secar la superficie de las cajas, aproximadamente 15 min.
- Invertir e introducir a 37°C por 48 horas., en el caso de levaduras, incubar a 28°C 24 horas

Tabla 2. Especificaciones microbiológicas de Mesófilos aerobios en UFC/g o UFC/ml establecidas para diversos alimentos.

Producto	Límite max. permisible
Ensaladas verdes, crudas o de frutas *	$1.5 * 10^5$
Salsas y purés cocidos *	$5 * 10^3$
Alimentos cocinados a base de carne de mamíferos, aves, pescados *	$1.5 * 10^5$
Aguas preparadas *	$1.5 * 10^5$
Zumos, néctares, bebidas a base de frutas y verduras no pasteurizadas **	$1 * 10^5$
Moluscos bivalvos frescos y refrigerados y congelados***	$5 * 10^5$
Leche pasteurizada de vaca ****	$3 * 10^4$
Helados y sorbetes*****	$2 * 10^5$

*NOM-093-SSA1-1994 ; ** Límites microbiológicos de la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods).
***NOM-031-SSA1-1993; ****NOM-091-SSA1-1994; *****NOM-243-SSA1-2010

Resultados:

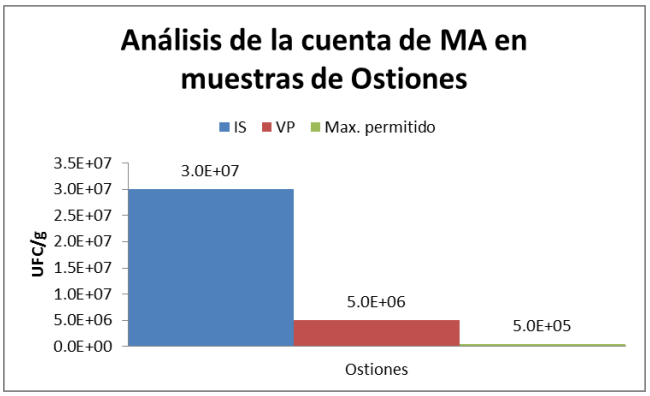
Tabla 3. Resultado de las cuenta de Mesófilos aerobios realizado a diferentes muestras de alimento (UFC/ml).

Equipo	Muestra	Vaciado en placa	Inoculación en superficie
1	Helado	$25 * 10^5$	$20 * 10^4$
2	Ostiones	$5 * 10^6$	$3 * 10^7$
3	Jugo de zanahoria	1.5	$10 * 10^6$
4	Leche "Santa Clara"	$1 * 10^5$	$4 * 10^5$
4	Leche "Lala"	-	-

Análisis de resultados:

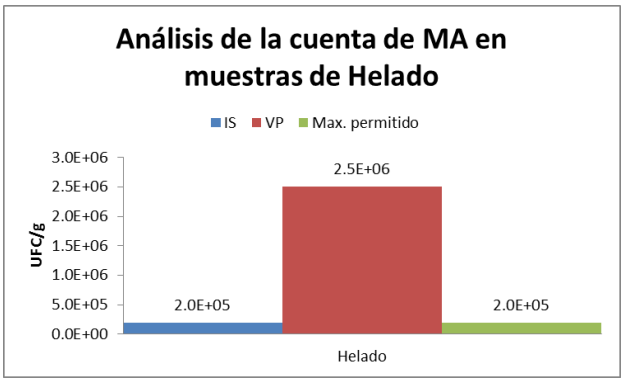
Utilizando los datos de las tablas 2 y 3 podemos compararlos y generar una discusión si cumplen los parámetros que marca la ley.

Ilustración 1. Análisis de la cuenta de MA en muestras de ostiones



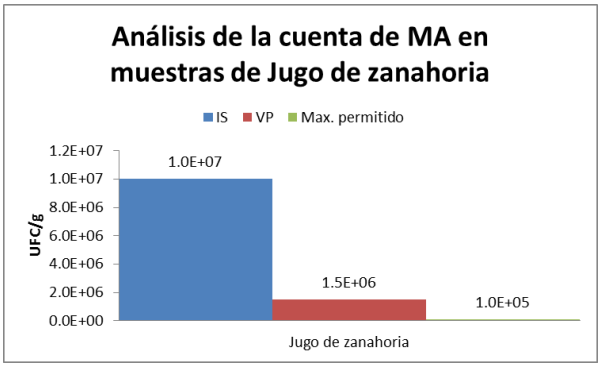
Como podemos constatar en en la Ilustración 1, podemos observar que los ostiones no cumplen con la Norma Oficial. Podemos concluir que hay contaminación en la muestra o que no se haya realizado su limpieza adecuadamente.

Ilustración 2. Análisis de la cuenta de MA en muestras de helado.



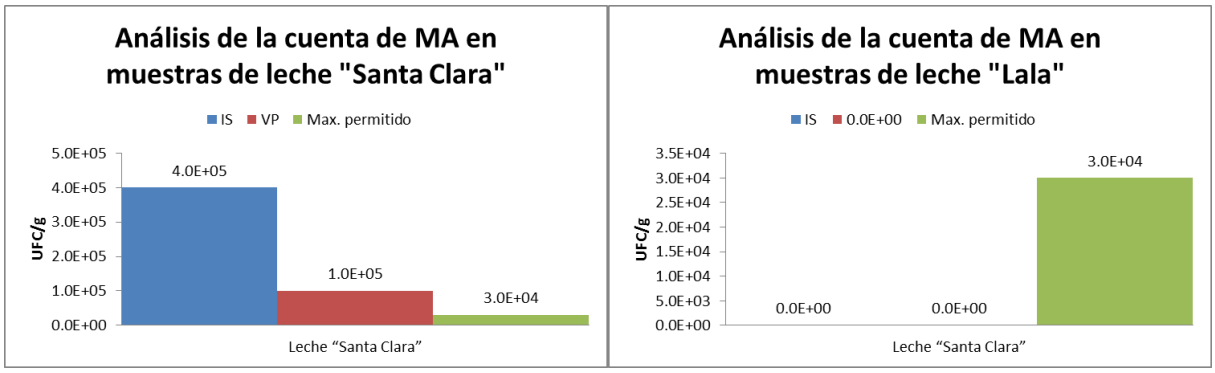
Aunque en el Vaciado en Placa se observe que no cumpla con la norma, en la Inoculación de superficie marca claramente que apenas cumple con la norma. Seguramente existe esta diferencia a una falla técnica por parte de los miembros del equipo.

Ilustración 3. Análisis de la cuenta de MA en muestras de jugo de zanahoria.



No existe la mayor duda que el jugo de zanahoria comprado en el mercado de Mixcoac no cumple con los máximos índices de Mesófilos permitidos. Seguramente existe una contaminación de la materia prima, o que exista una deficiente manipulación durante el proceso de elaboración.

Ilustración 4. Análisis de la cuenta de MA en muestras de leche "Santa clara" y "Lala"



Podemos observar que de ambas leches, la única que cumple con los máximos permisibles de Mesófilos aerobios es la leche Lala. Sin embargo el hecho que no presentara crecimiento sugiere que se utilice algún inhibidor o conservador.

Conclusiones

- Los resultados del presente estudio dan una idea del alto riesgo para los consumidores de contraer alguna enfermedad transmitida por los alimentos, y de su deficiente control sanitario.
- El único alimento que se cumple con la cuenta máxima permisible de Mesófilos aerobios fue la muestra de Helado.
- Fue sospechoso el notar que la leche "lala" no presentara ninguna cuenta para MA, sugiriéndonos que contenga algún inhibidor o conservador.
- Debido a que no se realizaron las pruebas por duplicado y debido a que estos estudios lo realizaron estudiantes de la carrera de Ingeniería en Alimentos, no son del todo concluyentes los resultados.Si se volviera a realizar las pruebas descritas, y dieran nuevamente los resultados presentados, será necesaria la participación de autoridades sanitarias, preparadores de alimentos y consumidores, además de mejorar la educación sanitaria en el manejo de alimentos, así como la implementación de programas y procedimientos de aseguramiento de la calidad.

Bibliografía

- Cano, S. (2006). *Metodos de Análisis Microbiológicos, Normas Iso, etc.* Consultora Analiza Calidad.
- Félix, A. (2005). Calidad Sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Salud Pública y Nutrición (RESPYN)*, http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm.
- Fernandez, E. (1981). *Microbiología Sanitaria agua y alimentos.* Guadalajara, México: Universidad de Guadalajara.
- SSA. (1993). *NOM-031-SSA1-1993.*
- SSA. (1994). *NOM-091-SSA1-1994.*
- SSA. (1994). *NOM-093-SSA1-1994.*
- SSA. (2010). *NOM-243-SSA1-2010.*
- Téllez, S. (1999). Evaulación de la calidad Microbiológica del ostión de la laguna madre de Tamaulipas (Mexico). *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 152-157.