

21  
Ref.



# Universidad Nacional Autónoma de México

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
ZARAGOZA

## Determinación de la Calidad Microbiológica de la Leche en Polvo de Tipo Industrial.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
GENOVEVA MONTIEL ORTIZ

MEXICO, D.F.

1989



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

INDICE DE CUADROS .....	1
RESUMEN .....	1
INTRODUCCION .....	3
ANTECEDENTES .....	6
OBJETIVOS .....	19
HIPOTESIS .....	20
MATERIAL Y METODOS .....	21
RESULTADOS .....	32
ANALISIS DE RESULTADOS .....	43
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	50
BIBLIOGRAFIA .....	53
ANEXO No. 1 .....	55
ANEXO No. 2 .....	56
ANEXO No. 3 .....	57
ANEXO No. 4 .....	58
ANEXO No. 5 .....	59
ANEXO No. 6 .....	70
ANEXO No. 7 .....	72
ANEXO No. 8 .....	75

## INDICE DE CUADROS

### CUADRO No. 1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MICROBIOLOGICAS PRESUNTIVA Y CONFIRMATIVA PARA ORGANISMOS COLIFORMES (NMP) .....	33
---	----

### CUADRO No. 2

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS PARA <i>Salmonella</i> sp .....	35
--	----

### CUADRO No. 3

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE: AISLAMIENTO, AISLAMIENTO SELECTIVO Y CONFIRMACION BIOQUIMICA PARA <i>Bacillus cereus</i> .....	37
--	----

### CUADRO No. 4

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS PARA <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
--	----

### CUADRO No. 5

RESULTADOS DE LAS PARAMETROS FISICOS-QUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS EN LAS 3 INDUSTRIAS .....	42
--	----

## R E S U M E N

Si bien es cierto que la leche en polvo está siendo utilizada cada día más y ésta sustituye en una buena parte a la leche líquida, no siempre la leche en polvo está libre de contaminación, ya que ésta mantiene la mayoría de sus nutrientes principales los cuales podrían ser utilizados por microorganismos, ocasionando problemas de salud igual o mayores que una leche líquida en mal estado.

El presente trabajo pretende aportar mayor información con respecto a la calidad microbiológica de la leche en polvo utilizada en las industrias procesadoras de alimentos; en las cuales es la materia prima principal o un ingrediente secundario.

Debido a las características físicas y químicas que presenta la leche en polvo, el crecimiento de microorganismos se ve disminuido; sin embargo estos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y activos siempre que las condiciones lo permitan.

Las características más importantes que condicionan el crecimiento de los microorganismos son: La humedad, La acidez y el pH (potencial de hidrogeno); asimismo éstas determinan el tipo de microorganismos que pueden desarrollarse.

Dentro de los microorganismos que se consideran de importancia en el presente estudio, por ser de peligro para la salud se encuentran Hongos, Levaduras y Coliformes, además de las principales bacterias patógenas como son: Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Salmonella. Por lo que a efecto de conocer cuales de éstos microorganismos presentan una mayor incidencia en la leche en polvo; el desarrollo de ésta investigación se orienta a la cuantificación y/o identificación de éstos. Para éstos fines se mostraron tres industrias procesadoras de alimentos, de las cuales se obtuvieron 15 muestra en total, realizando por triplicado el análisis de cada uno de los parámetros, tanto físicos y químicos (pH, Humedad y acidez), como microbiológicos (cuenta de microorganismos mesofílicos aerobios, hongos, levaduras, coliformes, S. aureus, B. cereus y Salmonella).

Finalmente se obtuvieron resultados que permiten ampliar el -- panorama sobre la calidad microbiológica de la leche en polvo, ya que se analizaron 4 parámetros más de los especificados en la Norma oficial de calidad para la leche en polvo F-26-1982 de la Dirección General de Normas (D.G.N), perteneciente a la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. Los parámetros incluidos -- son : Cuenta de hongos, levaduras y Bacillus cereus, así como pH.

Los resultados indican que un 50% de la leche analizada cumple con las especificaciones establecidas en la Norma, sin embargo -- algunas de las muestras (pertenecientes al 50%), presentan -- cuentas altas de los microorganismos que no se especifican en dicha norma. Por otro lado, el 50% restante presenta serios problemas , en algunos de los análisis microbiológicos, ya que sobre -- pasa los límites establecidos por la Norma Oficial Mexicana

En conclusión se propone que las pruebas de hongos, levaduras y B.cereus se incluyan en los análisis de rutina practicados a la -- leche en polvo utilizada en los procesos industriales , ya que -- estos amplían el panorama sobre su calidad, manejo, almacenamiento -- y utilización.

Es conveniente puntualizar que en base a los análisis realiza -- dos se observó que la humedad es el parámetro que tiene una rela -- ción más directa con el crecimiento microbiano.

## I N T R O D U C C I O N

Generalmente la leche se considera como uno de los alimentos mas completos y nutritivos, sin embargo, debido a la gran cantidad de hidratos de carbono , proteínas, grasas y otros componentes contenidos en la leche fresca, ésta se hace mas susceptible a la degradación por microorganismos. ( 11 )

Tomando como base lo anterior, se hizo necesario adoptar técnicas que permitieran, además de la conservación en un periodo -- de tiempo mas largo (almacenamiento), un manejo eficiente, así como una calidad nutritiva y la seguridad de no provocar daños de salud pública. Originalmente la técnica de pasteurización ayudó mucho a resolver parte de estas necesidades; en la actualidad las -- Industrias procesadoras de alimentos requieren que las técnicas -- de almacenamiento y manejo sean óptimas así como el transporte mas económico.

En virtud de que la deshidratación de la leche reduce y margina el crecimiento de microorganismos, ya que modifica el medio en el que éstos se desarrollan, se obtiene un mejor y más prolongado almacenamiento y por sus características , es muy sencillo -- manejarla y transportarla; sin embargo requiere de buenas prácticas de manufactura e higiene para todas las fases del proceso; -- puesto que los microorganismos, generalmente las bacterias, invaden la leche como contaminantes provenientes del polvo ( 12 ).

Considerando que la leche deshidratada o en polvo representa una gran ventaja en los aspectos ya mencionados, es necesario conocer sus características tanto físicas , químicas y bacteriológicas, para así determinar su calidad.

Generalmente se hace una clasificación de la leche en polvo que se basa en la composición final de la leche deshidratada (26), ésta es :

- 1) Leche entera en polvo.
- 2) Leche parcialmente descremada en polvo
- 3) Leche descremada en polvo

Esta clasificación es en sí un reglamento para evitar la adulteración de los alimentos lácteos y se reconocen además dos tipos de acuerdo al uso dado ( 5 ) y estos son :

- 1) Para alimentación humana directa .
- 2) Para materia prima de la industria alimentaria

La mayor parte de la leche en polvo se elabora a partir de la leche descremada, ya que el porcentaje de grasa contenida en la leche entera, dificulta la fabricación de productos de buena calidad, debido a la oxidación de ésta, lo cual confiere enranciamiento a los productos durante la conservación ( 19 ) ; además de ser difícil de disolver (26) .

Las características de la leche en polvo dependen también del método de desecación; actualmante existen dos métodos de desecación; el de tambor o cilindros y el de aspersión o atomización. El método de tambor somete a la leche a un tratamiento térmico tal que modifica su composición físico-química y la hace difícil de disolver. Por éste motivo es que la leche obtenida por este método , se destina para la alimentación de ganado (19). Por otro lado, el método de atomización es el más utilizado para obtener una buena calidad, ya que por éste proceso casi no se altera la composición físico-química; por lo que se consigue una leche estructuralmente poco modificada y de buena solubilidad (19).

En general existen normas para la leche en polvo entera y leche en polvo descremada ; sin embargo para la leche en polvo semi descremada, es en cierta forma difícil de crear, ya que existen varios niveles de desnatamiento (7).

La técnica de deshidratación de la leche ha proporcionado a las industrias grandes beneficios de manejo y almacenamiento, por lo que actualmente se deshidratan grandes cantidades que se conservan en buen estado por mucho tiempo, dada la restricción de humedad, la cual afecta el contenido microbiológico.

Debido a que los microorganismos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y que los productos alimenticios en un momento o en otro están en contacto con el suelo , el polvo se anticipa que éstos estarán activos siempre que las condiciones lo permitan, sin embargo un método obvio de control es la restricción de humedad para su crecimiento. La cantidad de humedad en el alimento establece cuales microorganismos tendrán oportunidad de crecer ; así se tiene que los hongos pueden crecer en los substratos alimenticios con una humedad tan baja de aproximadamente 12% y se conocen algunos que crecen en alimentos, con menos de 5% de humedad. Las bacterias y las levaduras requieren de un nivel más alto de humedad, generalmente 30% (16).



Las bacterias patógenas sólo ocasionalmente son capaces de resistir el medio circundante desfavorable, aunque algunas sobreviven a los procesos de deshidratación creando entonces, un peligro potencial a la salud pública (13).

## A N T E C E D E N T E S

Se han realizado diversas investigaciones para conocer los diferentes factores que influyen en el desarrollo de las bacterias de la leche en polvo, ante todo se han estudiado por medio de la técnica de placa el desarrollo de las bacterias y tipos de organismos presentes (6).

Se sabe que la carga microbiana de los productos lácteos deshidratados por calor, dependen del contenido de microorganismos del producto líquido que se deshidrata, así como de su procesado (contaminación y proliferación microbiana de las tuberías y depósitos, así como del aire utilizado). Sin embargo el contenido de agua de los productos lácteos deshidratados es tan bajo que impide el crecimiento microbiano, no obstante las posibilidades de supervivencia de los microorganismos en los productos lácteos es variable (7).

Actualmente se sabe que las bacterias termofílicas están presentes en la leche en polvo, ya que éstas tienen la capacidad de sobrevivir el proceso de pasteurización (7).

Recientemente la leche en polvo sin grasa se ha empleado para la propagación de cultivos iniciadores, así como para la preparación de leches con cultivos y esto ha dado lugar al planteamiento de varios problemas (16).

1) Si la leche en polvo descremada ha sido preparada con leche bronca de mala calidad, pueden encontrarse residuos de antibióticos que pueden impedir que los cultivos iniciadores se desarrollen.

2) Pueden encontrarse presentes ciertas sustancias inhibitorias producidas por la proliferación bacteriana antes del secado, lo cual inhibe la propagación de los cultivos iniciadores.

Otro estudio de gran interés realizado por Reddy y cols. (22) demuestra que existe una relación estrecha entre la calidad de la leche que se utiliza para preparar la leche en polvo y el producto deshidratado, ya que cuando se obtienen cuentas altas de bacterias termofílicas y esporas en la materia prima, se encuentran también en la leche en polvo.

El auge que ha tomado actualmente la utilización de la leche en polvo es tan importante que se han llevado a cabo diversas investigaciones para la elaboración de nuevos productos. Así por ejemplo en 1982 se realizó un estudio para conocer la factibilidad tecnológica para la elaboración de queso fresco a partir de la leche en polvo y grasa butírica y/o vegetal (25). En dicho estudio se utilizó leche en polvo descremada y se obtuvo el siguiente análisis microbiológico del producto elaborado comparando con las normas que marca la S.S.A.

COMPARACION MICROBIOLOGICA DEL QUESO ELABORADO, CON LAS ESPECIFICACIONES ESTABLECIDAS POR LA S.S.A. (23)

ANALISIS	NORMA DE LA S.S.A.	QUESO ELABORADO
Coliformes	5000 col/g max.	2000 col/g
Hongos	20 col/g max.	0 col/g
<u>S. aureus</u>	1000 col/g max.	0 col/g
<u>E. coli</u>	< 10 col/g	0 col/g
<u>Salmonella</u>	Negativo	Negativo

Esta tabla nos muestra una disminución en el contenido microbiológico del producto elaborado comparado con el que establece la norma para un queso elaborado con leche fresca. (23)

En 1986 se realizó un estudio sobre la manufactura y algunos aspectos de control en la elaboración de yogurt, (23); en dicho estudio se utilizó como materia prima leche en polvo y se observó que como materia prima, la leche en polvo presenta cierto grado de contaminación, por lo que se hizo necesario practicar la pasteurización a la leche reconstituida; esto se reflejó en el producto obtenido, ya que éste presentó buenas cualidades sensoriales y buena calidad microbiológica; cabe mencionar que la textura y sabor se distorsionan cuando se utiliza leche en polvo con problemas microbiológicos (24).

EVALUACIONES BACTERIOLÓGICAS DE LA LECHE RECONSTITUIDA  
 ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE PASTEURIZACIÓN (24)

MUESTRA	CUENTA TOTAL	COLIFORMES	HONGOS	LEVADURAS
leche en polvo sin pasteurizar	300 col/ml	0 col/ml	10 col/ml	0 col/ml
leche en polvo pasteurizada	5 col/ml	0 col/ml	10 col/ml	0 col/ml

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL YOGURT ELABORADO

PRODUCTO	HONGOS	LEVADURAS	COLIFORMES
YOGURT ELABORADO	0 col/ml	0 col/ml	0 col/ml

En el trabajo realizado por Gómez Velázquez (13) ; se menciona que una materia prima de mala calidad origina un producto de mala calidad y que es en la leche y crema utilizada en donde se encuentran una mayor contaminación microbiológica. Dicha contaminación aporta organismos tales como Staphylococcus aureus y varios patógenos intestinales, incluyendo Salmonella sp. y Micrococcus, además de esporas de bacterias, Escherichia Coli, hongos y levaduras (13).

CONTAMINACION MICROBIANA PRESENTE EN LA MATERIA PRIMA  
 UTILIZADA EN LA ELABORACION DE UN CONCENTRADO DE HELADO.  
 (13).

	CUENTA TOTAL	COLIFORMES	HONGOS
LECHE EN POLVO	4680 col/g	0 col/g	990 col/g

Como se puede observar, en el cuadro anterior se muestra contaminación por hongos, además de una cuenta total que sobrepasa los límites establecidos por la S.S.A.

EVALUACIONES BACTERIOLÓGICAS DE LA LECHE RECONSTITUIDA  
 ANTES Y DESPUES DEL PROCESO DE PASTEURIZACION (24)

MUESTRA	CUENTA TOTAL	COLIFORMES	HONGOS	LEVADURAS
leche en polvo sin pasteurizar	300 col/ml	0 col/ml	10 col/ml	0 col/ml
leche en polvo pasteurizada	5 col/ml	0 col/ml	10 col/ml	0 col/ml

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL YOGURT ELABORADO

PRODUCTO	HONGOS	LEVADURAS	COLIFORMES
YOGURT ELABORADO	0 col/ml	0 col/ml	0 col/ml

En el trabajo realizado por Gómez Velázquez (13) ; se menciona que una materia prima de mala calidad origina un producto de mala calidad y que es en la leche y crema utilizada en donde se encuen tra una mayor contaminación microbiológica. Dicha contaminación - aporta organismos tales como Staphylococcus aureus y varios pató- genos intestinales, incluyendo Salmonella sp. y micrococcus, ade- mas de esporas de bacterias, Escherichia coli, hongos y levaduras (13).

CONTAMINACION MICROBIANA PRESENTE EN LA MATERIA PRIMA UTILIZADA EN LA ELABORACION DE UN CONCENTRADO DE HELADO. (13).

	CUENTA TOTAL	COLIFORMES	HONGOS
LECHE EN POLVO	4680 col/g	0 col/g	990 col/g

Como se puede observar, en el cuadro anterior se muestra conta- minación por hongos, además de una cuenta total que sobrepasa - los límites establecidos por la S.S.A.

De los estudios anteriores se puede observar que la incidencia de ciertos microorganismos es constante, siendo de especial interés la presencia de organismos patógenos tales como: S. aureus, B. cereus y coliformes, así como Salmonella; debido a que su presencia representa además de cambios en las características físicas y organolépticas del producto que los contiene, un peligro para la salud pública.

A continuación se describen algunos datos sobre éstos microorganismos, los que ponen de manifiesto su carácter patógeno.

### Staphylococcus aureus

Son bacterias de forma esférica agrupadas en forma de racimo generalmente aeróbicas, pero pueden ser anaeróbicas facultativas, - tienen la característica de ser Gram positivas. Son productoras de enterotoxinas altamente peligrosas para la salud humana, se sabe además que dicha enterotoxina es termoestable y que no es precisamente una gran cantidad de S. aureus lo que provoca daños; sino la enterotoxina producida por estos y que en grandes cantidades produce la muerte.

Se ha comprobado que la enterotoxina producida por los S. aureus es además productora de coagulasa (+ o -) lo que en un momento dado se toma como base para determinar la presencia de dicha enterotoxina, sin embargo muchas cepas de coagulasa positiva no son tóxicas y algunas coagulasa positiva no son tóxicas y algunas coagulasa negativas producen enterotoxina.

Por lo que se hizo necesario practicar otra prueba que fuera más confiable en la investigación de cepas enterotoxigenicas, encontrándose una nucleasa termoestable. (termonucleasa). (20)

En la actualidad se ha relacionado la producción de termonucleasa con la capacidad de producir enterotoxina por cepas de Staphylococcus aureus, se ha encontrado una relación muy aceptable entre los dos (20).

Los síntomas más frecuentes causados por ingestión de esta enterotoxina son los siguientes: Vómito, Diarrea, Abatimiento y Espasmo Abdominal; éstos síntomas aparecen luego de transcurrir de 3 a 8 horas de ingerido el alimento contaminado.

### Bacillus cereus

Las bacterias de este género son aerobios o anaerobios facultativos, dichos bacillus son capaces de esporular, son todos móviles con flagelos peritricos, poseen una catalasa y son resistentes gracias a sus esporas. La temperatura mínima de crecimiento es de 11 a 20 °C, la óptima es de 30 a 35 °C y la máxima de 35 a 45 °C, crece en un rango de pH de 4.9 a 9.3.

Este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra en el suelo y en el pollo y por lo tanto todo lo que esté en contacto con él, puede contenerlo.

COLONIAS POR PROBAR DE *Staphylococcus aureus*  
EN LA PRUEBA DE AISLAMIENTO SELECTIVO.

Número de colonias sospechosas en placa	Número de colonias por probar
menos de 50	tres
51 - 100	cinco
101 - 150	siete

Bacillus cereus se ha declarado como importante causante de gastroenteritis, aunque en nuestro país se carecen de datos en cuanto a la frecuencia con la que se aísla de alimentos, así como de que sea causante importante de brotes de gastroenteritis, ya que la alta endemicidad de otras enfermedades entericas dificulta el estudio, aunque no por ello deja de ser importante.

En su aislamiento y estudio es importante considerar que B. cereus produce en los medios de cultivo con yema de huevo una enzima llamada lecitina o fosfolipasa que también se denomina factor yema de huevo que proporciona turbidez alrededor de la colonia.

Otra característica importante es que es resistente a la polimixina B. Sin embargo es necesario practicar una confirmación bioquímica a las colonias sospechosas de ser de B. cereus, tales como: fermentación de algunos azúcares, Reducción de Nitratos, licuefacción de la gelatina, hidrólisis de almidón, la peptonización con o sin coagulación de la leche tornasolada, así como la prueba de Voges Proskauer. (20)

Los síntomas más comunes al haber ingerido alimentos contaminados con B. cereus son:

Trastorno gastrointestinal, que se caracteriza en ciertos casos por la manifestación repentina de náuseas y vómito y en otro por cólicos abdominales intensos y diarrea comúnmente no persistente más de 24 horas y rara vez es mortal.

#### Salmonella sp.

Son bacilos inmóviles o móviles peritricos, no esporulados, anaeróbicos facultativos, fermentan la glucosa con o sin producción de gas, reducen los nitratos a nitritos y no poseen oxidasa.

Estos microorganismos pueden causar una severa enfermedad -- que es Salmonellosis en seres humanos, la cual puede ser mortal, los desórdenes gastrointestinales son los más comunes. Los animales también pueden contaminarse. Animales para consumo humano -- que estén infectados pueden transmitir la enfermedad a través de carne contaminada.

Los síntomas más comunes son náuseas, fiebre, espasmos, diarrea y vómito.

La determinación de éstos microorganismos requiere técnicas de aislamiento diferentes según el alimento en que se encuentren; el tratamiento al cual ha estado sujeto durante su procesamiento y la carga microbiana del producto final. Por estas razones son utilizados diferentes medios de enriquecimiento y enriquecimiento, en general la metodología sigue los siguientes pasos:

- a) Pre-enriquecimiento para el cual se usa :  
Caldo lactosado
- b) Enriquecimiento en medio de cultivo (prueba presuntiva)  
Caldo selenito cistina  
Caldo tetratioato



- c) Aislamiento en medios de agar selectivo.
  - Agar xilosa lisina desoxicolato ( X.L.D.)
  - Agar enterico de Hektoen
  - Agar sulfito y bismuto
  - Agar MacConkey
- d) Prueba bioquímica presuntiva
  - Agar de hierro y lisina
  - Agar hierro triple azucar
- e) Prueba bioquímica confirmativa.
  - Medio Sim
  - Caldo Malonato
  - Agar Citrato de Simon's
  - Rm-vp
  - Caldo Urea
  - Caldo Lactosa
  - Caldo Manitol
  - Caldo Lisina
  - DNPG.

A continuación se muestran las reacciones características en los medios descritos de Salmonella, Shigella y Arizona.

Dado que en la prueba de enriquecimiento se espera crecimiento de colonias es necesario observar solo si hay colonias, lo cual hace la prueba positiva para continuar con el aislamiento selectivo.

En el aislamiento selectivo se observan características típicas en el color y desarrollo de las colonias para el medio específico en que se encuentran así para:

XLD.- deben observarse colonias transparentes u opacas de 0.5 a 1.5mm de diametro, las colonias de microorganismos coliformes se encuentran rodeadas de color amarillo.

AGAR SULFITO-BISMUTO.- son colonias café grisáceas o negras, algunas cepas de Salmonella o Arizona desarrollan con un color verde, que es color más característico en este medio de coliformes.

ENTERICO DE HEKTOEN.- Son colonias verde azules algunas con centro negro y borde blanco en este medio los coliformes son color salmon o naranja, proteus puede producir colonias verdes amarillentas.

AGAR-MAC CONKEY.- Son colonias incoloras o transparentes, los coliformes precipitan en el medio las sales biliares.

CARACTERISTICAS DE Salmonella, Arizona y Shigella.

Prueba o sustrato	<u>Salmonella</u>	<u>Arizona</u>	<u>Shigella</u>
Urea	-	-	-
lisina descarboxilasa	+ alcalina	+ alcalina	-
Malonato	-	+	-
Indol	-	-	- o +
Lactosa	-	v	a o +
Movilidad	+	+	-
H <sub>2</sub> O en TSI	+	+	-
VP	-	-	-
Citrato de Simmons	+	+	-
Manitol	+	+	+ o v b
Glucosa (gas)	+	+	- o -
Sorbitol	+	+	- o v

- a = La mayoría de las cepas de S. sonnei son positivas lentas  
v = Del 10 al 89.9% de las cepas son positivas a las 48 horas.  
b = Algunos biotipos de S. flexneri producen gas.  
+ = El 90% o más dan positiva la prueba dentro de las 48 horas de incubación.  
- = El 90% o más dan negativa la prueba.

REACCIONES DE ENTEROBACTERIAS PATOGENAS EN TSI.

Genero y especie	Agar inclinado	Fondo	Gas	H <sub>2</sub> S
<u>Shigella</u>	K	A	-	-
<u>Salmonella typhi</u>	K	A	-	- (-)
Otras <u>Salmonellas</u> sp	K	A	+	+ + + (-)
<u>Arizona</u>	K (A)	A	+	+ + +

K = alcalina

A = acida

Simbolos entre parentesis indican reacciones ocasionales.

REACCIONES DE ENTEROBACTERIAS PATOGENAS EN LIA.

Genero y especie	Agar inclinado	Fondo	Gas	H <sub>2</sub> S
<u>Shigella</u>	K	A	-	-
<u>Salmonella</u> sp	K	K o N b	-	- (+)
<u>Salmonella typhi</u>	K	K	-	+ o -
Bioserotipo Paratyphi	K	A	+ o -	- o +
<u>Arizona</u>	K	K o N	-	+ (-)

K = alcalina

A = acida

N = neutra

b = algunos cultivos raros de S. typhi pueden no descarboxilar la lisina.

(-) o (+) = reacciones ocasionales

NOTA : Una reacción alcalina en este medio indica descarboxilación.

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE E. cereus

P R U E B A	COMPORTAMIENTO
Catalasa	+
Movilidad	+
Reducción de nitratos	+ C
Hidrólisis del almidon	+
Reacción de la yema de huevo	+
VP (Voges - Proskauer)	+
Licuefacción de la gelatina	+
Glucosa	A
Sacarosa	A
Glicerol	A
Salicina	A
Manitol	-
Leche peptonada	Peptonización

A = Producción de ácido sin gas.

C = Del 10 al 50 % de las cepas son positivas.

#### ORGANISMOS COLIFORMES

Son bacilos Gram negativos no esporulados, aerobios o facultativamente anaerobios, que fermentan la lactosa con producción de gas en 48 horas de incubación a 35 °C, los organismos coliformes constituyen un grupo heterogeneo con hábitat primordialmente intestinal.

La investigación de coliformes en alimentos es un indicador de contaminación fecal o en algunos casos de practicas higienicas inadecuadas.

Dado que la leche en polvo tiene un procesamiento con alta temperatura el número de bacterias coliformes esperado es mínimo y para poner en evidencia la presencia de organismos coliformes se hace necesario usar una prueba presuntiva con caldo lactosado y una confirmativa con caldo lactosa bilis verde brillante al 2 %

Esta técnica tiene una base estadística en la cual se consideran 5 tubos con caldo lactosado de concentración doble y 2 tubos con caldo lactosado de concentración sencilla para la prueba presuntiva, posteriormente se consideran 7 tubos con caldo lactosa bilis verde brillante y se contrastan los resultados con la siguiente información.

**NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS  
LIMITE PARA VARIAS COMBINACIONES DE RESULTADOS  
POSITIVOS Y NEGATIVOS**

Numero de tubos positivos			NMP x 100 ml	Limites de NMP	
cinco tubos de 10 ml	un tubo de 1 ml	un tubo de 0.1 ml		Inferior	Superior
0	0	0	0.0		5.9
0	1	0	2.0	0.05	13.0
1	0	1	2.2	0.05	13.0
1	1	0	4.4	0.52	14.0
2	0	0	5.0	0.54	19.0
2	1	0	7.6	1.5	19.0
3	0	0	8.8	1.6	29.0
3	1	0	12.0	3.1	30.0
4	0	1	15.0	3.3	46.0
4	0	0	20.0	5.9	46.0
4	1	0	21.0	6.0	53.0
5	0	0	38.0	6.4	330.0
5	0	1	96.0	12.0	370.0
5	1	0	240.0	12.0	3700.0
5	1	1		88.0	

Limites para cuando son usados cinco tubos con 10 ml, un tubo con 1 ml y un tubo con 0.1 ml de muestra.

## ORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS

Son aquellos microorganismos que proliferan cuando se incuban los medios de cultivo a temperaturas definidas entre un rango de 20 a 45 oC en aerobiosis.

La técnica comunmente analizada es el recuento en placa, que constituye una estimación de la cantidad realmente presente.

## HONGOS Y LEVADURAS

Los hongos y levaduras son microorganismos que tienen interés como causa de alteración; ciertos hongos pueden producir al desarrollarse en el alimento micotoxinas con efecto en el hombre.

El proposito primario de su investigación consiste en descubrir la exposición a fuentes de contaminación y defectuosa conservación de los alimentos, es por ello que en los análisis realiza dos interesa su abundancia, más que su sola presencia.

Con base en lo anterior y dado el creciente uso de la leche en polvo en la industria alimentaria, este trabajo pretende aportar mayor información sobre la calidad microbiologica de la misma en ciertas industrias de alimentos en Mexico.

## O B J E T I V O S

### GENERAL.

- 1.0 Determinar la calidad microbiológica de la leche en polvo de tres industrias en las que se utiliza dicho producto.

### PARTICULARES.

- 1.1 Determinar por medio de las técnicas microbiológicas : Cuenta de bacterias mesofílicas aerobias, organismos coliformes, cuenta de hongos y levaduras, Salmonella sp , Staphylococcus aureus así como Bacillus cereus y comparar si estas corresponden a las establecidas por la Norma Oficial Mexicana vigente.
- 1.2 Determinar el contenido de humedad y acidez así como el valor de pH de la leche en polvo industrial para su comparación con la Norma Oficial y establecer la posible correlación con las cuentas microbianas obtenidas.
- 1.3 Evaluar la calidad de la leche analizada en base a los resultados obtenidos y comentar sobre su posible utilización industrial.



## H I P O T E S I S

Puesto que se tienen pruebas efectivas de la deficiente calidad microbiológica en la leche en polvo de tipo industrial, luego entonces en el desarrollo del presente trabajo se realizará un conteo de los microorganismos más importantes desde el punto de vista de la salud y de esta manera rechazar o aceptar la calidad microbiológica de la leche en polvo, en base a las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana Vigente F-26-1982.

M E T O D O L O G I A .

Antes de iniciar cualquier técnica de análisis microbiológico, es necesario preparar todo el el material a utilizar, además de preparar el lugar en donde se va a trabajar, todo el material de vidrio así; como los medios de cultivo, deben ser esterilizados con el método más conveniente, para ampliar la información Ver anexo No. 1.

La cantidad de la muestra a utilizar lo define cada técnica, según el análisis a realizar, sin embargo es general para el pasado de las muestras el observar riguroso cuidado en no contaminarlas, atendiendo en extremo esta acción y cuidando además la exactitud del peso, dichas observaciones y cuidados se detallan en el anexo No. 2

Dado que la muestra a manejar (leche en polvo) requiere de un medio de dilución, en todas las técnicas se maneja como tal -- una solución de fosfatos estéril a la que se llama solución diluyente su preparación puede encontrarse en el anexo No. 3

La preparación de los medios de cultivo utilizados en el desarrollo del presente trabajo se realizó según indicaciones anotadas para los medios de cultivo Bioxon (1980), en el anexo No. 5 se indican los componentes y forma de preparación de cada uno de los medios de cultivo.

Una vez planteadas las consideraciones anteriores, la metodología se inicia con el muestreo en la industria y posteriormente continua con el trabajo realizado en el laboratorio.

A continuación se describen las técnicas a desarrollar en cada uno de éstos lugares.

## MUESTREO EN LAS INDUSTRIAS

Las muestras se colectaron en cada una de las industrias, - utilizando bolsas de plástico estériles y una cucharilla metálica.

En la industria No. 1 y 3 no se permitió el muestreo personal sin embargo se les proporcionó el material ya mencionado para obtener las muestras, obteniendo así cinco muestras en cada una de las industrias, las cuales pertenecieron a lotes y marcas diferentes a dichas muestras se les rotulo como muestras A, B, C, D y E para cada una de las industrias, rotuladas como industria No. 1, No.2 y No. 3

En la industria rotulada como No. 2 las muestras se tomaron - de la siguiente manera.

1.- Cerca del saco que contiene la leche en polvo, se coloca la - bolsa estéril ligeramente abierta, lo necesario para introducir la muestra.

2.- Con una cucharilla estéril se toma la muestra y se introduce a la bolsa de plástico. Este procedimiento se realizó hasta obtener una muestra de aproximadamente 200 g .

Se tomaron cinco muestras de diferentes lotes, cabe mencionar que solo se permitió muestrear tres sacos de cada lote.

3.- Entre el muestreo de un lote y otro la cucharilla se limpio - con una solución de alcohol al 70 % .

Las muestras así obtenidas se llevaron al laboratorio para practicarles las siguientes pruebas.

## RECUESTO DE BACTERIAS MESOFILICAS AEROBIAS.

- 1.- Pesar 10g de muestra.
- 2.- Adicionar la muestra a un frasco de dilución que contenga 90 ml de solución reguladora de fosfatos (solución diluyente).
- 3.- Preparar diluciones en tubos con 9 ml de solución diluyente. Ver anexo No. 3.
- 4.- Al concluir cada dilución inocular 1 ml de cada una de éstas en cajas Petri, previamente estériles y rotuladas. Ver anexo
- 5.- Adicionar a cada caja de 12 a 15 ml de agar cuenta estandar.
- 6.- Incorporar la muestra al medio de cultivo por medio de rotación de las cajas Petri en una superficie lisa.
- 7.- Dejar solidificar e incubar a 35 oC durante 48 h.
- 8.- Observar las cajas que contengan entre 30 y 300 colonias. Ver anexo No. 6; multiplicar los resultados por la inversa de la dilución correspondiente y reportar colonias por gramo de muestra (col/g). (10)

### NOTA:

Actualmente los resultados se expresan como UFC (Unidades formado ras de colonias), sin embargo con motivo de la comparación de los resultados obtenidos con los de la Norma Oficial, se expresan en colonias por gramo .

## RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS.

- 1.- Pesar 10g de muestra.
- 2.- Adicionar la muestra a un frasco de dilución que contenga 90 ml de solución diluyente.
- 3.- Agitar vigorosamente por varios segundos y dejar reposar por 10 min.
- 4.- Preparar el medio agar papa dextrosa (PDA), acidificarlo con ácido tartárico estéril al 10 % hasta obtener un pH de 3.5 y vaciar en cajas Petri estériles de 15 a 20 ml y esperar que solidifique.
- 5.- Inocular 1 ml de muestra a cada caja con el medio ya sólido y extenderla con varilla codada estéril.
- 6.- Incubar las cajas en posición invertida a temperatura ambiente durante 3 días sin destapar, efectuar un recuento presuntivo de las colonias de hongos desarrolladas si éstas ya se hicieran muy evidentes; en caso contrario incubar las cajas 24 horas más y entonces proceder al recuento final.
- 7.- Multiplicar la cifra obtenida por la inversa de la dilución correspondiente y reportar las colonias de hongos por gramo de muestra (col/g). Ver anexo No. 5
- 8.- Para el recuento de levaduras, sembrar 1 ml de la dilución y adicionar de 12 a 15 ml de medio agar papa dextrosa; incorporar la muestra con el medio haciendo rotaciones de izquierda a derecha y viceversa. Esperar a que solidifique e incubar a  $35 \pm 2$  °C por 24 h  $\pm$  3.
- 9.- Contar el número de levaduras en las placas y reportar colonias de levaduras por gramo de muestra (col/g). (10)

## ORGANISMOS COLIFORMES (N.M.P)

### PRUEBA PRESUNTIVA

- 1.- Pesar 10 g de muestra.
- 2.- Adicionar la muestra a un frasco que contenga 90 ml de solución diluyente .
- 3.- Inocular con 10 ml de muestra cada uno de los 5 tubos de fermentación, que contengan caldo lactosado de concentración doble; un tubo con 1 ml de muestra y un tubo con 0.1 ml en tubos con caldo lactosado de concentración sencilla.
- 4.- Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante  $48 \pm 3$  h.
- 5.- Observar cuidadosamente cada tubo. La presencia de gas en cualquier cantidad dentro de la campana de fermentación (Tubo de Durham) hace la prueba positiva.

### PRUEBA CONFIRMATIVA

- 1.- Transferir individualmente de cada tubo positivo a un tubo de fermentación con caldo bilis verde brillante al 2 %, de 2 a 3 asadas
- 2.- Incubar a  $35 \pm 2$  °C durante  $48 \pm 3$  h.
- 3.- La formación de gas en cualquier cantidad dentro de la campana, hace positiva la prueba.
- 4.- Determinar el Número Mas Probable de organismos coliformes en la muestra;
- 5.- Reportar como: N.M.P. de organismos coliformes en 10 g de muestra. (20)

A I S L A M I E N T O     D E     Salmonella sp

- 1.- Pesar 25 g de muestra y adicionarlos a 225 ml de caldo lactosado y homogenizar .
- 2.- Incubar a 35 oC durante 24 h .
- 3.- Inocular 1 ml de la muestra incubada , en 10 ml de caldo selenito - cistina e inocular 1 ml de la muestra incubada en 10 ml de caldo tetratonato.
- 4.- Inocular a partir de los tubos de caldo selenito - cistina y caldo tetratonato una placa de agar bilis verde brillante, agar sulfito y bismuto, agar XLD y agar Mac Conkey. Utilizar de dos a tres asadas para inocular cada placa y sembrar de manera que puedan obtenerse colonias bien aisladas.
- 5.- Incubar a 35 oC durante 24 h y observar cuidadosamente las - colonias desarrolladas.
- 6.- Seleccionar colonias sospechosas de pertenecer al genero Salmonella o Arizona.
- 7.- Si no se observan colonias sugestivas del genero y no hay desarrollo , proseguir la incubación 24 h más.
- 8.- Inocular a partir de una colonia característica proveniente del caldo selenito - cistina y otra del caldo tetratonato en los medios TSI (Hierro Triple Azúcar) y en el medio LIA -- (Agar Hierro Lisina) .
- 9.- Incubar a 35 ± 2 oC de 18 a 24 h .
- 10.- Inocular los cultivos con reacciones típicas de Salmonella y/o Arizona en los medios adecuados para las siguientes pruebas bioquímicas : Producción de Indol, Movilidad, Urea, Malonato, Rojo de metilo, Voges - Proskauer, DNPG, Citrato, Lisina Lactosa y manitol. (10)



REC U E N T O D E Staphylococcus aureus

- 1.- Pesar 10 g de muestra y adicionarlos a 90 ml de solución diluyente.
- 2.- Preparar diluciones en tubos con 9 ml de solución diluyente
- 3.- Preparar cajas Petri estériles con 15 O 20 ml de Agar Baird - Parker y esperar a que solidifique.
- 4.- adicionar 0.1 ml de las diluciones elegidas sobre Agar Baird Parker y extenderla con varilla de vidrio en toda la superficie del medio, usar una varilla para cada dilución.
- 5.- Incubar las placas invertidas a  $25 \pm 2$  oC durante 24 - 48 h despues de 24 h seleccionar las placas que contengan de 50 - 150 colonias aisladas. Contar y marcar todas aquellas que - aparezcan negras y brillantes con o sin ligero borde blanco y rodeadas por zona clara. Incubar las placas por 24 h más e incluir en el computo final las colonias nuevas que reunan - las características ya señaladas.
- 6.- Seleccionar las cajas que contengan entre 50 y 150 colonias típicas, efectuar un frote y teñir con la técnica de Gram, - Ver anexo No. 10 , observar su movilidad y efectuar las pruebas de fermentación de manitol en anaerobiosis, coagulasa y termonucleasa.
- 7.- Sembrar las colonias escogidas en el caldo Infusión Cerebro corazón, en dos tubos diferentes ,Uno destinado a la técnica coagulasa y otro para Termonucleasa, incubar a 35 oC durante 18 - 24 h. (20)

#### PRUEBA DE COAGULASA

- A) A una serie de tubos adicionar 0.5 ml de plasma
- B) Incubar en baño de agua a 35 oC y observar a las 2 y 4 h, los negativos descartarlos a las 24 h.
- C) Reportar positiva la prueba si hay formación de coagulo pequeño pero bien constituido o una coagulación total de la mezcla (20).

#### PRUEBA DE TERMONUCLEASA

- A) A la otra serie de tubos sembrada en caldo infusión cerebro - corazón practicarle la siguiente prueba.
- B) En una caja petri desechable con 10 ml de medio de cultivo Agar azul de toluidina DNA. Se hacen orificios de 2 mm de diametro.
- C) Colocar una gota del cultivo obtenido e incubar a 37 oC durante 4 h . Se da como positiva la prueba con la presencia de un halo color rosa alrededor de los orificios, que indican hidrolisis del DNA.
- D) Computar el numero de microorganismos en el producto, tomando en cuenta el numero de colonias, la dilución seleccionada así como el volumen inoculado. Ver anexo No 6 (20).

## RECUESTO DE Bacillus cereus.

- 1.-Pesar 10g de muestra y adicionarlos a 90 ml de solución diluyente y agitar vigorosamente por varios segundos.
- 2.-Preparar las soluciones convenientes en tubos con 9 ml de solución diluyente.
- 3.-Inocular 0.1 ml de cada dilución sobre la superficie de las cajas que contienen medio KB solidificado y extender con varilla de vidrio.
- 4.-Incubar a 30 oC durante 24 h.
- 5.-Seleccionar para el recuento las placas que contengan un número de colonias que permitan observarlas con claridad, así como los halos turbios característicos de este microorganismo.
- 6.-Contar las colonias típicas de B. cereus las cuales son redondas, planas, secas, translúcidas, cremosas, rodeadas por un halo denso de precipitación sobre el fondo rojo violeta del medio.
- 7.-Confirmar la presencia de microorganismos de la siguiente manera:
  - a) Transferir de 5 - 10 colonias sospechosas de la placa seleccionada ( Que contenga alrededor de 100 col ), cada una a un tubo de gelosa nutritiva inclinado.  
e incubar a 30 oC durante 24 h.
  - b) preparar un frotis y teñirlo por la técnica de Gram, para observar la pureza del cultivo. ver anexo No.10
  - c) Preparar una suspensión en solución salina y observar al microorganismo al microscopio para determinar su movilidad que debe ser del 50 - 90 % de las cepas.
  - d) Si el cultivo esta puro y es móvil, continuar con el estudio inocular tubos de fermentación con: caldo glucosa, caldo sa carosa, caldo manitol, caldo glicerol, caldo salicilina, - caldo nitrato, leche tornasolada, gelatina nutritiva, gelosa almidón, caldo Voges-Proskauer.
  - e) Incubar a 30 oC durante 24 h. excepto el ultimo caldo que - requiere de 48 h.
  - f) Comparar los resultados de las pruebas de fermentación de - los azúcares, VP, leche tornasolada y licuefacción de la gelatina con las características bioquímicas de B. cereus.
  - g) A partir del porcentaje de colonias confirmadas de B. cereus calcular el número de colonias por gramo de muestra. (20)

## DETERMINACION DE HUMEDAD

- 1.- Pesar con exactitud 4 g de muestra en una cápsula de níquel o acero inoxidable previamente desecada, extendiendo la muestra en una capa lo más fina posible sobre la base de la cápsula.
- 2.- Colocar la cápsula con su contenido en la estufa a 105 °C y - desecar durante 4 h.
- 3.- Retirar la cápsula, enfriar en desecador y pesar.
- 4.- Volver a colocar la cápsula en la estufa y desecar nuevamente durante unos 30 min, retirar, enfriar y pesar.
- 5.- Continuar la desecación hasta alcanzar peso constante.
- 6.- Calcular el contenido en humedad a partir de la pérdida de peso de la muestra. (17)

$$\% \text{ HUMEDAD} = \frac{(P_m - P_s)}{M} \times 100$$

DONDE :

P<sub>m</sub> = Peso de la cápsula con la muestra aun húmeda.

P<sub>s</sub> = Peso de la cápsula con la muestra seca.

M = Peso de la muestra en gramos.

## D E T E R M I N A C I O N   D E   A C I D E Z

- 1.- Pesar 10 g de muestra
- 2.- Añadir 50 ml de agua destilada medida con una bureta.
- 3.- Hervir durante 5 minutos y despues enfriar antes de titular.
- 4.- Titular con hidroxido de sodio 0.1 N usando fenofaleina como indicador
- 5.- Cuando se aproxime al punto final, añadir la solución de hidroxido de sodio gota a gota, cerciorandose de que la coloración final no desaparezca. (17)
- 6.- Calcular el porcentaje de acidez con la siguiente expresión :

$$\text{Acidez} = \frac{\text{ml NaOH} \times N \times 0.09 \times 100}{M} = \text{g \% de acido lactico}$$

DDNDE:

- N = Normalidad del NaOH  
M = mililitros de muestra  
0.09 = miliequivalentes del acido lactico

## M E D I C I O N   D E   p H

- 1.- Pesar 10 g de muestra.
- 2.- Añadir 50 ml de agua destilada.
- 3.- Hervir durante 5 min y despues enfriar a temperatura ambiente
- 4.- Calibrar el potenciómetro e introducir el electródo a la muestra, leer en la escala correspondiente a pH.
- 5.- Reportar pH de la muestra. (9)

## R E S U L T A D O S

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los análisis microbiológicos y físico-químicos practicados a las 15 muestras obtenidas en las tres industrias.

#### PRUEBAS DE COLIFORMES (N.M.P.)

El cuadro No. 1 nos muestra los resultados obtenidos en las pruebas presuntiva y confirmativa practicadas a cada una de las muestras proporcionadas por las 3 industrias.

Como se puede observar en la prueba presuntiva, se inoculan 7 tubos con caldo lactosado; 5 de concentración doble y dos de concentración sencilla; si se obtienen resultados positivos (formación de gas) se realiza la prueba confirmativa inoculando en caldo lactosa bilis verde brillante al 2 %, si se obtienen resultados negativos la prueba confirmativa no se realiza, tal es el caso de las muestras A y E de la industria 3.

La expresión (X) corresponde a los casos en los que existe crecimiento de microorganismos mas no presenta formación de gas - en la campana de Durham, sin embargo se practica la prueba confirmativa, para asegurarse de que dichos microorganismos no son coliformes.

C U A D R O No. 1

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PRESUNTIVAS Y CONFIRMATIVA PARA ORGANISMOS COLIFORMES .  
(N. M. P.)

PRUEBA	MEDIO DE CULTIVO	INDUSTRIA 1					INDUSTRIA 2					INDUSTRIA 3				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
PRESUNTIVA	CALDO LACTOSADO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+D	-	+D	+D	+D	-
	DE CONCENTRACION DOBLE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+D	-	+D	+	+D	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+D	-	+D	+	+D	-
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+D	-	+D	+	+D	-
CONFIRMATIVA	CALDO LACTOSADO	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+D	+	+D	-
	DE CONCENTRACION SENCILLA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+D	+	+D	-
		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	^	+D	-	-	^
	CALDO LACTOSA	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	^	+D	-	-	^
CONFIRMATIVA	BILIS VERDE	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	^	+D	-	-	^
	BRILLANTE 2X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	^	+D	-	-	^
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	^	+D	-	-	^
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	^	+D	-	-	^

ESTA PRUEBA SE PRACTICO POR TRIPlicADO PARA CADA UNA DE LAS MUESTRAS DE LAS DIFERENTES INDUSTRIAS, ANOTANDO EN EL CUADRO EL RESULTADO PROMEDIO.

NOTA:

- +D No presentaron gas, solo crecimiento
- ^ Dados los resultados anteriores, no se practicó la prueba



### Salmonella sp.

El análisis practicado en la prueba de Salmonella sp. a la leche en polvo se resume en el cuadro No. 2 en el que se observan las pruebas realizadas, los medios de cultivo utilizados en cada prueba así como los resultados para cada una de las muestras proporcionadas por las tres industrias.

Analizando el seguimiento de las pruebas practicadas a cada muestra se nota que para cada medio de cultivo se tiene un resultado que puede ser (+) o (-), lo que indica la presencia o ausencia de crecimiento, sin embargo éstos signos (+) o (-) no tienen el mismo significado en la prueba bioquímica confirmativa, pues en estas denotan reacciones de metabolismo, las cuales se comparan con el cuadro típico de reacciones específicas de Salmonella.

El símbolo (a) representa crecimiento de colonias no típicas a las esperadas en el medio de cultivo en el que se encuentran, y el símbolo (?) indica que no se realizó la prueba, dado que los resultados anteriores son negativos.

Es importante observar la muestra E de la industria 2 que -- presenta positivas las pruebas; presuntiva, aislamiento selectivo y bioquímica presuntiva, además la prueba bioquímica confirmativa no corresponde al comportamiento de Salmonella, comparando las características bioquímicas obtenidas con las ya mencionadas en los antecedentes su comportamiento corresponde al de Shigella, que -- es también un organismo patógeno importante.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AISLAMIENTO SELECTIVO Y PRUEBAS BIODUIMICAS PARA *Salmonella* sp

PRUEBA	MEDIOS DE CULTIVO	INDUSTRIA 1					INDUSTRIA 2					INDUSTRIA 3				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
PRESUNTIVA	CALDO LACTOSADO SELENITO-CISTINA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CALDO TETRATINATO	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⓪	⓪	⓪	-	-
AISLAMIENTO SELECTIVO	AGAR SULFITO DE BISMUTO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	AGAR ENTERICO DE HEKTOEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⓪	⓪	⓪	-	-
	AGAR MAC-CONKEY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	⓪	⓪	-	-	-
BIOQUIMICA PRESUNTIVA	AGAR DE HIERRO LISINA (LIA)	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	-	-	-	-	-
	AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR (TSI)	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	-	-	-	-
	MEDIO SIM	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	⓪	^	^	^	^
BIOQUIMICA CONFIRMATIVA	CALDO MALONATO	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^
	AGAR CITRATO DE SIMON'S	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^
	RH - VP	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	-	^	^	^	^
	CALDO UREA	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	-	^	^	^	^
	CALDO LACTOSA	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^
	CALDO MANITOL	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^
	CALDO LISINA	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^
ONPG	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	+	^	^	^	^	

EL ANALISIS SE REALIZO POR TRIPPLICADO Y SOLO SE OBTUVIERON RESULTADOS POSITIVOS EN LA PRUEBA BIODUIMICA CONFIRMATIVA EN LA MUESTRA "E" DE LA INDUSTRIA 2.

NOTA :

^ = Dados los resultados anteriores, no se practicó la prueba

⓪ = Crecimiento de colonias no tíficas de *Salmonella* sp, *Shigella* y *Arizona*.



RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE: AISLAMIENTO, AISLAMIENTO SELECTIVO Y CONFIRMACION BIOQUIMICA PARA *Bacillus cereus*.

INDUSTRIA	MUESTRA	AISLAMIENTO		CONFIRMACION BIOQUIMICA											
		AGAR KB (KIM-DEOPFERT)	SELECTIVO	GELOSA NUTRITIVA	REDUCCION DE NITRATOS	HI-DROLISIS DE ALMIDON	REACCION DE LA YERBA DE HUEVO	RH-VP	LITUEFACCION DE LA GELATINA	CALDO GLUCOSA	CALDO SACAROSA	CALDO GLICEROL	CALDO SALTICINA	CALDO MANITO	LECHE TOPASOLANA
1	A	80 +	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	B	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	C	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	D	2 +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	E	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
2	A	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	B	231 +	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	C	32 +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	D	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	E	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
3	A	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	B	21 +	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	C	70 +	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	D	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^
	E	-	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^	^

NOTA:  
 ^ Datos los resultados anteriores, no se practicó la prueba.  
 N + Número total de colonias de *Bacillus cereus* en agar KB (Kim-Deopfert).

Staphylococcus aureus

En el cuadro No. 4 se observan los análisis realizados para la prueba de Staphylococcus aureus. Cada muestra se inoculara en agar Baird Parker obteniendo cierto número de colonias, por lo que se considera positiva la prueba, mientras que las muestras que no se obtuvo crecimiento de colonias la prueba se considera negativa.

De acuerdo a la cantidad de colonias obtenidas en el agar -- Baird Parker se toma un número de colonias por probar como se mencionan en los antecedentes y se realiza la prueba de fermentación de manitol, que se caracteriza por el desprendimiento de gas, -- siendo positivos los resultados cuando existe la presencia de gas y negativos cuando hay ausencia de éste.

Ordinariamente a las colonias que son positivas en la prueba de fermentación de manitol se les inocula en caldo (B H I), sin embargo en este estudio también se inocularon las colonias que -- dieron negativa esta prueba y así comprobar que los microorganismos presentes no son Staphylococcus aureus; una vez inoculados en ( B H I) se les practica la prueba de Coagulasa y Termocleasa que son las pruebas mas importantes para determinar su patogenicidad.

Para obtener un número real de Staphylococcus aureus totales, Staphylococcus aureus coagulasa positivo y Staphylococcus aureus termocleasa positiva se realizan los siguientes calculos :

Staphylococcus aureus totales:

Se considera el número de colonias encontradas en las placas de agar Baird Parker, la dilución utilizada y el volumen inoculado

Así para la muestra D de la industria No. 1 se encontraron 7 colonias en la dilución  $10^{-1}$ , inoculando 0.1 ml de muestra; cabe señalar que para que los resultados se expresen en colonias por -- mililitro de muestra es necesario multiplicar  $0.1 \times 10 = 1$  ml

$$( 7 ) ( 1 ) ( 1/10 ) = ( 7 ) ( 1 ) ( 10 ) = 70 \text{ col/ml.}$$

Staphylococcus aureus termonucleasa positiva

Para esta misma muestra de la misma industria se probaron -- bioquímicamente 3 colonias, de las cuales 1 resultado positiva por lo que los cálculos se hacen de la siguiente manera:

Colonias probadas 3 ----- 1 resultado positiva  
Colonias en total 7 ----- X total de colonias positivas

$$X = ( 7 ) ( 1 ) / 3 = 2.33 \text{ ----} = 2$$

Tomando en cuenta la dilución utilizada, así como el volumen inoculado se tiene:

$$( 2 ) ( 0.1 ) ( 10 ) ( 1/10^1 ) = 2 ( 1 ) ( 10 ) = 20 \text{ col/ml}$$

Staphylococcus aureus coagulasa positiva

Esta cuenta se calcula de igual manera que termonucleasa -- positiva.

RESULTADOS DE LAS PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS PARA *Staphylococcus aureus*.

INDUSTRIA	MUESTRA	AGAR DAIRD PARKER	FERMENTACION DE MANITOL	(B H I) INFUSION CEREBRO CORAZON	PRUEBA DE COAGULASA	PRUEBA DE TERMONUCLEASA
1	A	19 +	+ - +	+ + +	- - -	- - -
	B	-	-	-	-	-
	C	-	-	-	-	-
	D	7 +	- + -	+ + +	- - -	+ - -
	E	8 +	- - -	+ + +	- - -	+ + -
2	A	-	-	-	-	-
	B	299 +	+ + + + +	+ + + + +	- - - - -	+ - - - +
	C	54 +	+ + + + +	+ + + + +	- - - - -	+ - - - +
	D	50x10 <sup>5</sup>	+ + +	+ + +	- - -	+ + +
	E	107x10 <sup>4</sup>	- + - +	+ + + + +	+ + + + +	- - - - -
3	A	-	-	-	-	-
	B	-	-	-	-	-
	C	332 +	- + - - -	+ + + + +	+ + + + +	+ - + + -
	D	-	-	-	-	-
	E	-	-	-	-	-

NOTA: - Dado los resultados anteriores, no se practicó la prueba.

CUADRO No 5

A continuación se muestra el cuadro No 5 que contiene todos los resultados de las pruebas tanto microbiológicas como físicas y químicas así como también las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana.

En este cuadro se manejan solo los resultados finales obtenidos de las pruebas antes mencionadas, de manera que puede apreciarse la situación de cada muestra en todas las pruebas realizadas.



## ANALISIS DE RESULTADOS



El análisis de los resultados se inicia con los cuadros referentes a las pruebas microbiológicas de los microorganismos que desde el punto de vista de la salud son más importantes.

#### ORGANISMOS COLIFORMES

En el cuadro No. 1 se observan los resultados de las pruebas presuntiva y confirmativa para organismos coliformes, para la industria No.1 se obtuvieron en la prueba presuntiva para todas las muestras (A, B, C, D y E) resultados positivos en el caldo lactosado de concentración doble, lo que pudiera indicar la presencia de organismos coliformes en las muestras. (20),, en el caldo lactosado de concentración sencilla solo una muestra, la E, presenta resultados positivos, sin embargo al practicarle la prueba confirmativa en el caldo lactosa bilis verde brillante se observa que ninguna de las muestras presenta crecimiento de microorganismos ni formación de gas, esto demuestra que los microorganismos detectados en la prueba presuntiva no pertenecen al grupo coliforme, pues en este grupo se incluyen otros bacilos gram negativos esporulados que fermentan la lactosa con producción de gas como lo hacen los organismos del grupo coliforme, así también se incluyen ciertas bacterias propias del suelo y vegetales que fermentan la lactosa sin ser del grupo coliforme. (20)

Para la industria No. 2 en el cuadro No.1 se observa crecimiento y formación de gas en las muestras A, B, C y D para la prueba presuntiva, mientras que la muestra E solo presenta crecimiento de microorganismos, sin formación de gas, lo que indica que la muestra E no contiene microorganismos del grupo coliforme; no así para la muestra C que al practicarle la prueba confirmativa, presenta crecimiento y formación de gas, dando así positiva la prueba de organismos coliformes. Por otro lado las muestras A, B y D presentan resultados negativos en la prueba confirmativa.

En el caso de la industria No. 3, las muestra A y E no presentan crecimiento de microorganismos ni formación de gas en la prueba presuntiva, por lo que no se practico la prueba confirmativa, puese da por hecho que no existen microorganismos coliformes La muestra B presenta desde la prueba presuntiva crecimiento sin formación de gas y al practicarle la prueba confirmativa se tienen los mismos resultados; por lo que se deduce que los microorganismos son del grupo coliforme. (20). La muestra D presenta el mismo caso en la prueba presuntiva, solo que se obtienen resultados negativos en la prueba confirmativa; por lo que se deduce que en esta muestra no están presentes organismos coliformes.

La muestra C de esta industria presenta resultados interesantes, pues en la prueba presuntiva existe un ensayo que solo presenta crecimiento sin formación de gas y los demás presentan crecimiento y formación de gas, lo que indica presencia de organismos coliformes, esto se comprueba al practicar la prueba confirmativa, -- pues dos ensayos con caldo lactosa bilis verde brillante resultan positivos es decir, presentan crecimiento de microorganismos y -- formación de gas, por lo tanto existen coliformes, aunque en bajas concentraciones.

#### Salmonella sp.

En el cuadro No. 2 se muestran los resultados de las pruebas presuntiva, aislamiento selectivo, bioquímica presuntiva y bioquímica confirmativa, que son esenciales en la determinación de Salmonella o. dada la importancia que tiene por su toxicidad al estar presente en los alimentos. Como puede observarse en la industria No. 1 la muestra B y D denotan resultados positivos en caldo lactosado, caldo selenito-cistina y caldo tetratronato, que con forman la prueba presuntiva y que tiene como proposito facilitar a las Salmonellas presentes en el alimento una recuperación del estado en que se encuentran, sin embargo, estos medios no contienen sustancias inhibitorias por lo que no impide a los demás microorganismos desarrollarse, de allí que sea necesario practicar un aislamiento selectivo (3). En las muestras A, C y E se presentan resultados positivos para algunos de los medios de la prueba presuntiva y por lo tanto se les practico la prueba de aislamiento selectivo para tener una visión más amplia de los microorganismos detectados.

Para el aislamiento selectivo practicado en agar xilosa lisa de desoxicolato (X L D), agar sulfito de bismuto, agar entérico de Hektoen y agar Mac-Conkey todas las muestras de esta industria presentan resultados negativos, ya que no se observó ningún tipo de crecimiento y por lo tanto no se practicaron las pruebas bioquímicas presuntiva y confirmativa.

En la industria No. 2 se observa que en la prueba presuntiva las muestras A, B, C y D solo presentan resultados positivos en caldo lactosado, mientras que en el caldo selenito-cistina y en el caldo tetratronato los resultados son negativos, así también en el aislamiento selectivo las muestras A, B, C y D resultan negativas, por lo que no se practicó la prueba bioquímica presuntiva ni la confirmativa. No así para la muestra E, que desde la prueba presuntiva presenta resultados positivos, los cuales se confirman en el aislamiento selectivo, ya que hubo crecimiento de colonias bien definidas y típicas en el agar entérico de Hektoen, en el XLD y en el agar MacConkey, ver anexo No. B. Dados los resultados en esta prueba se practicó la prueba bioquímica presuntiva en medio agar hierro triple azúcar (T S I), que se utiliza para determinar la capacidad de un microorganismo para atacar los carbohidratos con o sin producción de  $H_2S$ . (20),, Para esta prueba se uso tam bien agar hierro listina, que se utiliza para medir la capacidad enzimática de un organismo para descarboxilar este aminoácido y formar una amina dando por resultado una alcalinidad en el medio (25). ver Anexo No. B

Dado que en la prueba bioquímica presuntiva se obtuvieron resultados positivos, se practicó la prueba bioquímica confirmativa. Como puede observarse en el cuadro No. 2 en esta prueba se obtienen también resultados positivos en caldo malonato, agar citrato de Simons y en caldo lactosa, manitol y lisina así como en el DNPG, sin embargo estos no son típicos de Salmonella, por lo que se descarta esa posibilidad; más al analizar su comportamiento bioquímico de este microorganismo se observa que presenta características más semejantes a Shigella, pues los resultados en medio SIM, caldo malonato, agar citrato de Simons, RM-VF, caldo urea, caldo lactosa, caldo manitol, caldo lisina y DNPG, son típicos del comportamiento bioquímico de Shigella. Ver anexo No. 8

En la industria No. 3 se observa que para todos los medios utilizados en la prueba presuntiva todas las muestras presentan crecimiento, y en el aislamiento selectivo todas las muestras presentan resultados negativos en el agar sulfito y bismuto y en los medios de agar XLD y agar enterico de Hektoen las muestras A, B, C y D presentan crecimiento de colonias no típicas de este grupo, y las muestras D y E presentan resultados negativos en este medio así mismo existe crecimiento en el agar Mac Conkey para las muestras A y B y las muestras C, D y E denotan resultados negativos.

Dado que el crecimiento presentado por algunas de las muestras en el aislamiento selectivo no es típico del grupo en cuestión y que otras de las muestras se presentan con resultados negativos, no es práctico hacerles la prueba bioquímica presuntiva, para tener la plena seguridad de que las colonias encontradas como no típicas, no son Salmonellas sp., se practicó la prueba bioquímica presuntiva; obteniendo para ésta resultados negativos.

### Bacillus cereus.

Este microorganismo ha sido de poco interés sanitario hasta hace pocos años en América, sin embargo en Europa es uno de los principales microorganismos causantes de gastroenteritis. (20)

En nuestro país se carece de datos en cuanto a la frecuencia con que se aísla de los alimentos; incluso aún no se especifican normas en cuanto al contenido de este microorganismo en los alimentos, éste es el caso para la leche en polvo. Sin embargo se ha visto que se requiere de un número elevado de microorganismos viables para causar enfermedad, que va de  $10^6$  a  $10^9$  col/g. (14)

En el presente trabajo se realizaron pruebas de aislamiento, aislamiento selectivo y confirmación bioquímica para Bacillus cereus. Ver cuadro No. 3

En el cuadro No. 3 se puede observar en la industria No. 1 crecimiento positivo en las muestras A y D en el agar Kim - Geopfert (KG) que contiene una emulsión de yema de huevo, además de polimixina B; lo cual significa que son positivas a la reacción yema de huevo y resistentes a la polimixina B, por lo que se continúa el análisis y se practicó un aislamiento selectivo. Para esta prueba se toman en cuenta el número de colonias observadas en el agar KG y se eligen las colonias por probar y con este mismo número se continúa la confirmación bioquímica.

Así para la muestra A se practica un aislamiento selectivo y confirmación bioquímica a cinco colonias y los resultados se comparan con la información antes mencionada (comportamiento bioquímico) y al realizar los cálculos se toma en cuenta además del tamaño de la muestra el volumen inoculado como se indica en los resultados obteniendo así para la muestra A 640 col/g

Para la muestra D se probaron tres colonias en el aislamiento selectivo y en la confirmación bioquímica; obteniendo finalmente 20 col/g.

En la industria No. 2 se observó la presencia de B. cereus en dos muestras, la muestra B y la muestra C, siendo la muestra B la que obtuvo mayor número de colonias 700 col/g que es la cifra mayor encontrada en todas las muestras de las tres industrias, mientras que de la muestra C se obtuvieron 320 col/g.

En la industria No. 3 se observa que dos muestras contienen B. cereus, las muestras B y C, que presentan las cuentas más bajas comparadas con las industrias No. 1 y 2, pues presentan 70 col/g y 130 col/g respectivamente como se indica en el cuadro No. 5

### Staphylococcus aureus

La presencia de S. aureus en ciertos alimentos es de gran importancia, por tratarse de un microorganismo habitual del hombre y de animales superiores.

Por su capacidad para producir, en determinadas condiciones, una poderosa enterotoxina es un microorganismo muy importante. La situación adquiere mayor significado conforme el número encontrado se eleva por arriba de 100 y 1000 col/g o col/ml de alimento.

En el cuadro No. 4 se observa que en la industria No. 1 y 2 existe una mayor incidencia de estos microorganismos, mientras que la industria No. 3 presenta cuenta de Staphylococcus aureus solo en una muestra, se observa también que en la industria No. 2 en las muestras D y E se presentan las cuentas más altas localizadas en las tres industrias.

Aunque este análisis presenta cuentas altas así como cuentas relativamente bajas de éstos microorganismo y que en su confirmación bioquímica algunas dan resultados de coagulasa negativa y/o termonucleasa negativa no se debe olvidar que en la norma oficial mexicana se especifica que esta prueba debe ser negativa.

En el mismo cuadro se observa también que casi la mitad de las muestras presentan Staphylococcus aureus. Cabe hacer notar -- que la muestra A aunque presenta en agar baird parker una cuenta de 19 colonias, en el cuadro No. 5 se reporta como negativa ya -- que las pruebas de coagulasa y termonucleasa son negativas.

#### ORGANISMOS MESOFILICOS AEROBIOS

Con la cuenta total o cuenta estandar se pretende investigar el contenido de microorganismos vivos, (mesofilicos aerobios); que son aquellos que crecen en el intervalo de 20 a 35 oC. (10)

En si esta técnica no pretende poner en evidencia a todos -- los microorganismos presentes, dada la variedad de especies y tipos diferentes por sus distintas necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible etc. Sin embargo hace que el número de colonias encontradas constituyan -- una estimación aceptable de la cifra presente. (21)

En el cuadro No. 5 se puede observar que todas las muestras analizadas, presentan cuentas de organismos mesofilicos aerobios, sin embargo la industria No. 2 presenta las cuentas más altas de éstos microorganismos, e incluso la muestra D y la muestra E sobrepasan los límites establecidos por la norma oficial. En segundo lugar tenemos a la industria No. 1 que presenta cuentas un poco más bajas que la industria No. 2 y que son menores a la cantidad establecida por la norma, finalmente la industria No. 3 presenta -- las cuentas más bajas encontradas en este trabajo.

## HONGOS Y LEVADURAS

Los hongos y levaduras son microorganismos que tienen interés como causa de alteración y como elementos biológicos utilizados en algunos alimentos sin embargo ciertos hongos pueden producir ciertas toxinas al desarrollarse en el alimento, las que generalmente reciben el nombre de micotoxinas. Los hongos tienen una gran ubicuidad en la naturaleza, siendo muy comunes en el polvo y equipo defectuosamente lavados. (10)

En el cuadro No. 5 se observa que la prueba de hongos en todas las muestras presenta resultados negativos, de hecho este tipo de análisis no lo marca la Norma Oficial Mexicana.

En cuanto las levaduras se observa su presencia en dos de las muestras de la industria No. 2 muestras D y E. Sin embargo sus cuentas son altas en relación a otros productos elaborados con leche es el caso de la crema y el queso así como de la margarina de mesa según la norma NOM-F-16-S-1979 que especifica como cuenta de hongos y levaduras 20 col/g. (8)



## PARAMETROS FISICO - QUIMICOS

### HUMEDAD

La humedad es uno de los factores que determinan en un momento dado la viabilidad de los microorganismos, así el agua es tan indispensable para el crecimiento de las bacterias como el suministro de substancias nutritivas, pues las bacterias no pueden alimentarse sin agua debido a que los elementos nutritivos deben estar disueltos antes de que puedan ser absorbidos a través de las paredes celulares de los microorganismos. (2)

Es por ello que el análisis de la humedad representa un dato muy importante en el presente estudio.

En el cuadro No. 5 se observa que la mayoría de las muestras sobrepasa el límite establecido por la norma oficial (max 3.2) y se observa que solo cinco muestras, la A de la industria No. 2 y la A, C, D y E de la industria No. 3 se apegan más a lo establecido por la norma, esto explica los bajos números de microorganismos mesofílicos aerobios encontrados, de hecho en los resultados presentados en el cuadro No. 5, se observa que la mayor humedad - mayor cuenta de organismos mesofílicos aerobios.

### ACIDEZ Y Ph

El grado de acidez o alcalinidad de soluciones acuosas, como los medios de cultivo, se expresa en términos de concentración de hidrogeniones [OH], y el grado de acidez o alcalinidad se determina por la concentración de hidrogeniones en el medio, y una manera de expresar la concentración de hidrogeniones es en términos de normalidad (N), sin embargo sería muy engorroso expresar en términos de la concentración real de hidrogeniones la acidez o alcalinidad de alguna solución, en lugar de ello los científicos -- utilizan el término pH. Se define el pH de una solución, como el recíproco del logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones. (2)

La mayoría de las bacterias son muy sensibles al pH del medio en que se desarrollan, y cada especie prefiere la reacción característica de su hábitat natural. (2)

En el caso de la acidez, presentada por las muestras analizadas se observa que solo tres están dentro de las especificaciones que marca la norma (de 0.1 a 0.2); estas son la A, B y E de la industria No. 3. Todas las demás muestras están por arriba del intervalo que marca la Norma.

Del cuadro No. 5 se observa que el pH de las muestras analizadas va del 6.31 a 6.56 y que prácticamente no varía mucho entre las muestras analizadas, este es uno de los parámetros que no se especifican en la Norma.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como se puede apreciar en el cuadro No. 5 en general la leche en polvo analizada no presenta problemas de coliformes, sin embargo sus cuentas cuando estan presentes, estan por abajo de las establecidas en la Norma Oficial Mexicana.

Dado que la presencia de organismos coliformes en la leche en polvo tiene gran importancia como indicador de contaminación, es necesario que esta se apege estrictamente a la Norma Oficial Mexicana (8). En conclusion, se puede decir que la calidad en cuanto a organismos coliformes es aceptable en las tres industrias, ya que más del 80 % de las muestras estan exentas de organismos coliformes.

Para la prueba de Salmonella podemos observar en el cuadro No. 5 que todas las muestras analizadas resultaron negativas como lo especifica la Norma Oficial Mexicana y que por ese lado no se puede objetar nada sobre la calidad de la leche analizada. sin embargo, como lo muestra el análisis de resultados de la industria No. 2 en la muestra E se encontro la presencia de Shigella sp. que es una bacteria que afecta principalmente a los niños y que presenta una alta peligrosidad, pues la enfermedad producida por este microorganismo es de tipo infeccioso. (20)

Para Bacillus cereus en conclusion se puede decir que su incidencia en la leche en polvo manejada es considerable, pues de quince muestras, seis de ellas contienen este microorganismo, aunque las muestras obtenidas son en algunos casos relativamente bajas, debe tomarse en cuenta su presencia, pues como sabemos el nivel toxico rebasa en gran medida las cuentas obtenidas en estas muestras, mas no se debe olvidar que lo realmente peligroso son las esporas de estos microorganismos que al resistir los procesos de desecacion en la leche en polvo se vuelven activas en cuanto a las circunstancias lo permiten.

En cuanto a Staphylococcus aureus se refiere se concluye que estos microorganismos tienen una incidencia muy alta en la leche en polvo analizada, pues el 46.66 % de las muestras analizadas muestran su presencia; cuando la leche en polvo debe reportar negativa la prueba, según lo marca la Norma Oficial Mexicana, mas aun que algunas de las cuentas obtenidas presentan a éstos organismos como formadores de enterotoxinas.

En general la leche en polvo analizada en cuanto a organismos mesofílicos aerobios se refiere es aceptable, pues solo dos muestras, la D y la E de la industria No. 2 presentan cuentas de éstos microorganismos más altas a lo establecido por la Norma.

En cuanto a la presencia de hongos y levaduras podemos concluir que la leche analizada es aceptable y que la presencia de levaduras en las muestras D y E de la industria No. 2 se deben principalmente al manejo o almacenamiento que se le da a la leche en polvo, y no al proceso de secado.

En general se puede observar que de la leche analizada, -- aproximadamente la mitad presenta buenas características, pues -- ocho de las quince muestras cumplen casi en su totalidad con lo especificado por la Norma Oficial Mexicana, mientras que relativamente la otra mitad de las muestras presentan problemas al presentar cuentas altas en uno o más análisis microbiológicos, ver cuadro No.5

Dado lo anterior no se puede afirmar que toda la leche en polvo de tipo industrial es de buena calidad ni toda esta es de mala calidad, pues en gran parte la presencia de microorganismos se debe al mal manejo y almacenamiento que se le da a la leche en polvo, mas que a un procesado deficiente, eso se menciona ya que dos de las industrias No. 1 y 3 presentan en si resultados adecuados.

Relacionando los análisis físicos y químicos practicados a las muestras con los análisis bacteriológicos se observa que en la mayoría de las muestras en las que la humedad sobrepasa el límite establecido por la norma se presenta una mayor incidencia de microorganismos, originando generalmente aumento en la cuenta de mesofílicos aerobios, así como la presencia de levaduras y de *S. aureus* en las muestras D y E de la industria No. 2 ; aunque esta relación no es estrictamente proporcional, si se observan los resultados del cuadro No. 5 podemos concluir que la humedad aumenta en buena medida el contenido de microorganismos .

En cuanto al pH y la acidez detectada en las muestras analizadas podemos concluir que dado a la mínima variación encontrada en estos parámetros no se puede afirmar que tengan una influencia directa o inversamente proporcional en el crecimiento de los microorganismos contenidos en las muestras.

Aunque de la bibliografía sabemos que el pH y la acidez son factores que influyen en el crecimiento de los microorganismos, en los resultados obtenidos no se logra apreciar bien esta relación.

Al observar el estado actual de la leche en polvo, es pertinente sugerir su uso con base en los conocimientos que se tienen sobre su utilización, es decir, se recomienda que en los procesos en los cuales se elabora un producto con leche y se involucre -- una pasteurización, hornado u otro proceso que limite o elimine -- el contenido microbiológico se utilice la leche con mayor humedad a la establecida por la norma.

En los procesos en los que se utiliza la leche como un ingrediente de una mezcla que no sufre ningún tratamiento térmico, (tal es el caso de las bebidas con chocolate o las mezclas preparadas para helado) debe utilizarse leche con una humedad menor o igual a la establecida por la Norma Oficial Mexicana vigente, cuidando además en extremo su almacenamiento, así como su manejo.

Así mismo se recomienda que la leche utilizada en cualquier proceso sea analizada microbiológica y físico-químicamente, y en base al uso que se desee dar y al análisis obtenido, se exija a los proveedores la calidad que en la Norma Oficial Mexicana se especifica.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alais, C. (1980) Ciencia de la leche, Edit. C.E.C.S.A. México D. F. pp (223-303), 594
- 2.- Burdon, K,L y Reid, R.D. (1977) Microbiología. Edit. Mc Graw-Hill México, D. F. pp(534-554), 803
- 3.- Bioxon. (1980) Manual de medios de cultivo y reactivos de -- diagnostico. Daxaca Dax-México. pp(2-32), (103-201),283
- 4.- Daguet, G.L (1977).Técnicas en bacteriología. Edit. Jims Barcelona-España pp. (57-88) 320
- 5.- Desrosier, N.W. (1985) Elementos de tecnología de alimentos. Edit. C. E. C. S. A. México, D. F. pp (436-440), 760
- 6.- Desrosier, N. W. (1985) Conservación de alimentos. Edit. C.-- E. C. S. A. México, D. F. pp(183-189), 360
- 7.- Direccion General de Normas, (1982) Norma oficial de calidad-para la leche en polvo. NDM-F-26-1982, Secretaría de patrimonio y Fomento Industrial. México, D. F.
- 8.- Dirección General de Normas, (1976) Norma oficial de calidad-para margarina de mesa. NDM-f-16-B-1976. Secretaria de Patrimonio y Fomento Industrial. México D. F
- 9.- Dirección General de Salud Pública (1976). Técnicas para el - análisis Físico-Químico de alimentos. Secretaría de Salubridad y Asistencia. México D. F
- 10.- Dirección General de Salud Pública (1976). Técnicas para el muestreo y análisis microbiológico de alimentos. Secretaria - de Salubridad y Asistencia. México D. F
- 11.-Foster, E.W (1965). Microbiología de la leche. Edit. Centro-de ayuda técnica. México, D. F. pp (98-113), 205
- 12.-Frazier, W, C y westhoff D. C (1978) Microbiología de los -- alimentos,Edit. Acribia. S. A. Zaragoza-España pp (139-150), (274-301), 582
- 13.-Gómez, V. Ma L. (1980) Contaminación microbiana en una planta elaboradora de productos derivados de leche. Tesis profesional, I B Q. ENCB (IPN). México, D.F
- 14.-Hobbs, B. C. and Chistian, J. H (1973) the microbiological - safety of food.Edit. Academic Press,Inc London pp (57-88),300
- 15.-Jamienson, J. M. y Jobber, P.(1974) Manejo de los alimentos, técnicas de conservación. Edit. C. E. C. S. A. Mexico. D. F - pp(183-189), 394

- 16.-Jawetz, E. (1975) Manual de microbiología. Médica. Edit. El manual moderno S. A. México D.F pp(102-104), 1748
- 17.-Lees, R. (1985) Análisis de los alimentos, métodos analíticos y de control de calidad. Edit. Acribia Zaragoza-España pp (35-48) 288
- 18.-Macfadin, J. (1980) Biochemical tests for Identification of medical bacterial. Edit. Williams and Wilkins, Baltimore, U.S. A pp (26-42), 330
- 19.-Manual de Educación Agropecuaria, S. E. P (1982) Elaboración de productos lácteos. Edit. Trillas México D. F pp(41-44)111
- 20.-Manual de laboratorio de microbiología sanitaria (1983), Departamento de microbiología, E.N.C.B I.P.N México D. F
- 21.-Pelckzar, M.J y Reid R.D.(1977) Microbiología. Edit, Mac -- Graw-hill, México D.F pp(534-544), 903
- 22.-Reddy, N.S. Jaswanterab, V. and Venlaya W.(1984) Studies on bacteriological quality of dried whole milk in relation to the initial quality of raw milk, J food sci. tech. 21:14-17
- 23.-Rosas, C. (1982) Tecnología de queso fresco a partir de leche en polvo, Grasa butírica y/o vegetal. tesis profesional - I.B.Q E.N.C.B, (I.P.N), Mexico, D. F
- 24.-Sanperio, J.J(1986) Estudio sobre la manufactura y algunos aspectos en la elaboración de yogurt. Tesis profesional I.B.Q E.N.C.B, (I.P.N). Mexico D> F
- 25.-Subdirección General de Abastecimiento (1983) Norma para la leche entera en polvo. JCC 01/MS.001.0001 CPM. CLAVE: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- 26.-Warner, N.J.91980) Principios de la tecnología de lácteos. - A. G. T Editor, S.A. México D. F pp(189-195), 231

A N E X O      N o . 1

ESTERILIZACION Y PREPARACION DEL MATERIAL



Antes de empezar a trabajar, debe estimarse la cantidad de material y utensilios que se utilizarán durante el muestreo, preparación de la muestra, diluciones y siembra y es muy importante que todo el material que se utilice sea estéril, los métodos generalmente utilizados son :

#### EXPOSICION AL AIRE CALIENTE ( HORNO DE CALOR SECO )

Por éste método pueden esterilizarse, tubos de ensayo, frascos, cajas de petri y otros objetos vacíos de vidrio; éste método requiere de una exposición de por lo menos una hora a una temperatura de 160 - 170 oC . (9)

#### ESTERILIZACION POR PRESION DE VAPOR

Este tipo de esterilización se realiza con una autoclave. Los objetos que se esterilizan por éste método generalmente se someten a una presión de vapor de 15 lb que equivalen a una temperatura de aproximadamente 121 oC por 20 o 30 minutos. El tiempo de exposición depende en parte de la naturaleza del material, los objetos o paquetes muy grandes o apretados requieren mayor tiempo y temperatura.

De éste modo pueden esterilizarse medios de cultivo, soluciones, cultivos desechados, etc. (9)

#### ROTULADO DEL MATERIAL

En el rotulado del material es muy importante anotar en cada caja clave, fecha y toda información necesaria para tener un seguimiento de los resultados; las anotaciones deben hacerse en la tapa de la caja, éstas deben ser las mínimas necesarias. (20)

A N E X O      N o . 2

P E S O   D E   L A   M U E S T R A

La medición o peso de la muestra debe hacerse en la mesa de trabajo completamente limpia y esterilizada con fenol al 5% con el mechero encendido a unos 30 cm de distancia y dentro de un orden extremo, cuidando de reducir al mínimo cualquier contaminación al producto. El sobrante de éste conviene conservarlo en refrigeración hasta llevar las placas a la incubadora.

Antes de realizar la medición o pesada de la muestra, debe - calibrarse la balanza; ésta debe tener una sensibilidad de 0.01 g

Sobre la balanza se coloca un frasco de dilución con 90 ml de solución diluyente, ver ANEXO No. 3 ; se tara la balanza y se procede del siguiente modo.

Tomar la muestra con una cucharilla estéril y adicionarla al frasco de dilución, repetir la operación, hasta completar 10 g.  
(9)

**A N E X O   N o . 3**

**S O L U C I O N  R E G U L A D O R A  D E  F O S F A T O  
( S O L U C I O N  D I L U Y E N T E )**

#### SOLUCION PATRON

Pesar 34 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y disolver en 500 ml de agua destilada, ajustar el pH a 7.2 con hidroxido de sodio (NaOH) 1.0 N; y llevar a un litro con agua destilada. Esterilizar a 121 °C por 20 min. Conservar en refrigeración. ( 10 )

#### SOLUCION DILUYENTE:

Tomar 1.25 ml de solución patron y llevar a un litro con agua destilada; esta es la solución de trabajo, la cual es colocada en volúmenes de 90 ml y/o 9 ml según lo requiera la técnica, antes debe esterilizarse a 121 °C por 20 min y enfriarse a temperatura ambiente. (10)

**ANEXO No. 4**

**PREPARACION DE LAS DILUCIONES**

El peso de 10 g de muestra en 90 ml de solución diluyente - constituye la primera dilución de la muestra ( 1:10 )

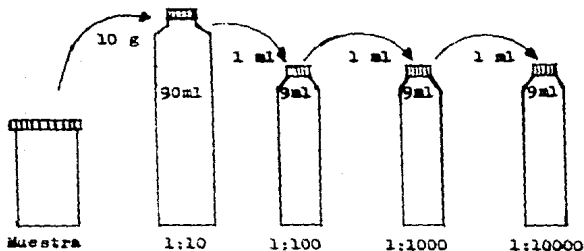
Para preparar las soluciones siguientes, se colocan 9 ml de solución diluyente en tubos con tapon de rosca previamente esterilizados.

Se utilizará una pipeta diferente para cada dilución; el volumen que se transfiere nunca será menor del 10 % de la capacidad total de la pipeta.

Antes de inocular cualquier tubo, el anterior debe ser agitado, siempre de la misma manera ( 25 movimientos de abajo a arriba en un arco de 30 ca, completando 7 segundos.)

Es conveniente transferir la muestra de cada dilución a las cajas petri destinadas para ello a fin de evitar confusiones. (10)

#### PREPARACION DE DILUCIONES



ANEXO No. 5  
MEDIOS DE CULTIVO  
(BIOXON, 1980)



#### AGAR CUENTA ESTANDAR

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseina	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
pH final	7.0 $\pm$ 0.1

##### PREPARACION:

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, disolver hasta obtener una suspensión homogénea. Caliente y hierva durante un minuto, esterilice a 121 oC durante 15 minutos. Enfríe a 43 o 45 oC antes de usarlo. ( 3 )

#### AGAR PAPA DEXTROSA

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA.

Infusión de papa	200
Dextrosa	20
Agar	15
pH final	5.6 $\pm$ 0.2

##### PREPARACION:

Disolver y mezclar los componentes agitando frecuentemente hervir por un minuto y esterilizar a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos. ajustar el pH añadiendo 14 ml de ácido tartárico al 10 % estéril y enfriado. (3)

#### CALDO LACTOSADO

##### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	5.0
extracto de carne de res	3.0
Lactosa	5.0
pH final	6.9 $\pm$ 0.1

##### PREPARACION:

Disolver los componentes en el agua destilada y esterilizar en autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos. Después de la esterilización enfriar tan rápido como se pueda. (3)

### CALDO LACTOSA BILIS VERDE BRILLANTE

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Bilis de buey deshidratada	20.0
Lactosa	10.0
Peptona de gelatina	10.0
Verde brillante	0.0029
pH final	7.2 ± 0.2

#### PREPARACION

Disolver los componentes en agua destilada. Distribuir volúmenes de 10 ml en tubos de ensayo con campanas de Durham. Esterilizar en autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 min (3).

### CALDO SELENITO CISTINA

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	5.0
Lactosa	4.0
Fosfato de sodio	10.0
Selenito acido sodico	4.0
L-Cistina	0.01
pH final	7.0 ± 0.2

#### PREPARACION

Suspender los componentes en un litro de agua destilada y calentar hasta tener una buena disolución. Distribuir y esterilizar exponiendo el medio al flujo de vapor durante 15 minutos.

si el caldo se va a utilizar inmediatamente no necesita ser esterilizado.

El caldo esterilizado puede conservarse varios meses en refrigeración, tomando precauciones para evitar su evaporación. (3)

### CALDO NITRATO

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Nitrato de potasio	1.0

#### PREPARACION

Disolver y distribuir en tubos de cultivo y esterilizar a - 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos. (3)

## CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON (B H I)

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de cerebro de vacuno	250.0
Peptona o proteasa peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
Dextrosa	2.0
pH 7.4 ± 0.2	

#### PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, distribuir en volúmenes de 5 ml y esterilizar en autoclave a 121 °C (15 libras de presión) durante 15 minutos. (3)

## CALDO PARA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona	10.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	7.2 (ml, 0.25%)
Carbohidrato	10.0
pH final 7.3 ± 0.1	

#### PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, distribuir en tubos con campanas Durham y esterilizar a 118 °C durante 10 minutos. Algunos carbohidratos como el manitol, la celobiosa y la salicina pueden usarse en cantidad de 5 g. (3)

## BASE DE CALDO ROJO DE FENOL

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseina	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Rojo de fenol	0.018

#### PREPARACION

Se disuelven los componentes en un litro de agua destilada, adicionar de 5 a 10 gramos del carbohidrato que se necesite.

Se pueden adicionar 0.5 a 1.0 gramos de agar si el medio va a ser destinado al cultivo de organismos anaerobios.

Si se desea investigar la formación de gases, emplear campanas de Durham.

Esterilizar de 116 a 118 °C (no mas de 12 libras de presión) durante 15 minutos. (3)

## BASE PARA AGAR BAIRD PARKER

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseina	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de litio	5.0
Agar	17.0
Glicina	12.0
Piruvato sodico	10.0
pH final 6.8	

### PREPARACION

Disuelva los componentes en un litro de agua destilada. Caliente agitando frecuentemente y hierva un minuto. Distribuya y coloque en el autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos, enfrie a 45 a 50 oC y agregue 10 ml de solución de telurito de potasio al 1 % y 50 ml de emulsión de yema de huevo.

Homogeneizar poco a poco y verter en placas. Si se refrigera en recipientes sellados, en frascos o tubos con tapones de rosca cerrados, la base puede conservarse durante grandes periodos de tiempo y puede volverse a fundir y emplearse a medida que se necesite. (3)

## A B A R K B

### FORMULA EN GRAMOS

Peptona	1.0
Extracto de levadura	0.5
Rojo de fenol	0.025
Agar	18.0
Agua destilada	900.0 ml

### PREPARACION

Disolver los componentes en 900 ml de agua destilada y ajustar a pH 6.8 y esterilizar el medio base a 121 oC (15 libras de presión) durante 20 min, enfriar a 50 oC y adicionar 100 ml de la solución B y 1 ml de la solución C y distribuir en cajas Petri. Las cajas pueden almacenarse durante 7 días a 4 oC. (3)

### SOLUCION B

Preparar una emulsión de yema de huevo estéril, y de ésta - emulsión adicionar 100 ml por cada 900 ml del medio base.

### SOLUCION C

Sulfato de polimixina B : a una ampollita que contenga 500,000 U.I. o 50 mg por vial, adicionar en condiciones asepticas 5 ml de agua destilada estéril y de esta solución tomar 1 ml para cada litro de medio. (3)

## AGAR CITRATO DE SIMONS

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato de amonio	1.00
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.20
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.08
pH final 6.9 ± 0.2	

### PREPARACION

Suspender los ingredientes en un litro de agua destilada y remojar de 5 a 10 min, mezclar y calentar suavemente hasta hervir durante un minuto.

Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 min. Dejar enfriar en posición inclinada, también puede usarse como medio en placa. (3)

## CALDO MALONATO

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de levadura	1.00
Sulfato de amonio	2.0
Fosfato dipotásico	0.60
Fosfato monopotásico	0.40
Cloruro de sodio	2.0
Malonato de sodio	3.0
Dextrosa	0.25
Azul de bromotimol	0.025
pH final 6.7	

### PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, distribuir y esterilizar en autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos. (3)

### C A L D O U R E A

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Fosfato monopotásico	9.1
Fosfato disódico	9.5
Extracto de levadura	0.1
Urea	20.0
Rojo de fenol	0.01

#### PREPARACION

Disolver los componentes en agua destilada y pasarlo a través de un filtro bacteriológico estéril, también se puede esterilizar en autoclave a 5 u 8 libras de presión durante 15 min. (3)

### AGAR HIERRO LISINA ( L I A )

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
Dextrosa	1.0
L - lisina	10.0
Citrato de hierro y amonio	0.50
Tiosulfato de amonio	0.04
Purpura de bromocresol	0.02
Agar	13.50

#### PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, calentar para disolver y hervir durante un minuto, distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 oC durante 12 minutos. Enfriar en posición inclinada. (3)

### M E D I O D E S I M

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
pH final	7.3 + 0.2

#### PREPARACION

Disolver los componentes, calentar y hervir durante un minuto, - distribuir y esterilizar en autoclave a 121 oC por 15 minutos. (3)

M E D I O T S I

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa	1.0
Sulfato de amonio ferrico	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13.0
pH final 7.3 + 2	

PREPARACION

Suspender los componentes en un litro de agua destilada, calentar agitando frecuentemente hasta ebullición. Distribuir en tubos y esterilizar a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 min.

Los tubos se deben enfriar en posición inclinada, de manera que el medio de cultivo en el fondo del tubo alcance una profundidad de 1.5 a 2.0 cm. (3)

A G A R M A C C O N K E Y

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona de gelatina	17.0
Mezcla de peptonas	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar bacteriológico	13.5
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.001
pH final 7.1 + 0.2	

PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, mezclar y agitar frecuentemente y hervir durante un minuto.

Esterilizar en autoclave a 121 oC (15 libras de presión) durante 15 minutos. Enfriar a 45 - 50 oC y distribuir en cajas de petri estériles. (3)

## AGAR ENTERICO DE HEKTOEN

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Peptona	12.0
Extracto de levadura	3.0
Salas biliares	9.0
Lactosa	12.0
Sacarosa	12.0
Salicina	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Tiosulfato de sodio	5.0
Citrato de hierro y amonio	1.5
Agar	14.0
Azul de bromotimol	0.065
Fucsina acida	0.1
pH final	7.5 ± 2

### PREPARACION

Suspender los componentes en un litro de agua destilada, calentar y hervir hasta disolver completamente por 1 o 2 minutos. No esterilizar en autoclave. Enfriar a 50 °C y vaciar en cajas de petri estériles. (3)

## MEDIO DE LECHE TORNABOLADA

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Leche descremada en polvo	100.0
Tornasol	0.75
pH final	6.8

### PREPARACION

Disolver y distribuir en tubos y esterilizar a 121 °C (15-17 libras de presión) durante 15 minutos. (3)



### AGAR SULFITO DE BISMUTO

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	10.0
Extracto de carne	5.0
Dextrosa	5.0
Fosfato disodico	4.0
Sulfato ferroso	0.3
Indicador sulfito bismuto	8.0
Verde brillante	0.025
Agar	20.0
pH final	7.5

#### PREPARACION

Disolver los ingredientes en un litro de agua destilada, mezclar bien hasta lograr una suspensión uniforme, calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Dejar enfriar a 45 °C agitar y rotar el recipiente para dispersar el precipitado y verter en placas. Las placas deben estar parcialmente descubiertas hasta que se seque la superficie del medio. El medio en las placas debe usarse el mismo día de su preparación. (3)

### G E L O S A   N U T R I T I V A

#### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Agar	15.0
pH final	7.0 ± 0.2

#### PREPARACION

Disolver y calentar a ebullición, distribuir y esterilizar a 121 °C ( 15 libras de presión ) durante 15 minutos. (3)

A G A R            X L D

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Xilosa	3.5
L -lisina	5.0
Lactosa	7.5
Bacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Rojo fenol	0.08
Agar	13.5
De-oxicolato de sodio	2.5
Tiosulfato de sodio	6.8
Citrato de hierro y amonio	0.80
pH final 7.4	

PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada y calentar agitando frecuentemente, justamente hasta que hierva el medio. Transferir inmediatamente a baño maria a 50 oC, vertir en placas tan pronto como se halla enfriado el medio, el medio debe tener color rojizo y estar transparente, el calentamiento excesivo o la prolongada estancia en el baño maria produce precipitación.

(3)

BASE DE CALDO TETRATONATO

FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Mezcla de peptonas	5.0
Mezcla de sales biliares	1.0
Tiosulfato de sodio	30.0
Carbonato de calcio	10.0

PREPARACION

Disolver los componentes en un litro de agua destilada, mezclar y calentar hasta ebullición. Enfriar a 45 oC y adicionar 20 ml de solución de yoduro. Mezclar y distribuir en porciones de - 10 ml en tubos estériles. No calentar despues de haber adicionado la solución de yoduro.

La base de caldo tetratonato se puede guardar durante algún tiempo, pero el medio completo debe emplearse el mismo dia de su preparación. (3)

SOLUCION YODO - YODURADA

Yodo	6.0
Yoduro de potasio	5.0
Agua destilada	20.0

Disolver primero el yoduro de potasio y en ésta solución disolver el yodo. (20)

## MEDIO DE NITRATOS Y MOVILIDAD

### FORMULA EN GRAMOS POR LITRO DE AGUA DESTILADA

Extracto de carne	3.0
Peptona	5.0
Nitrato de potasio	1.0
Agar	3.0

### PREPARACION

Disolver los componentes por calentamiento en un litro de -- agua destilada, hasta que la mezcla tenga una apariencia cristalina . Ajustar el pH a  $7.6 \pm 0.1$

Distribuir en porciones de 5 ml en tubos de 13 x 100 con tapon de rosca, esterilizar a 121 °C ( 15 libras de presión) durante 15 minutos. (20)

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**A N E X O   N o .   6**

**RECUESTO DE COLONIAS EN LAS PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS**

## CUENTA ESTANDAR, HONGOS Y LEVADURAS

Una vez terminado el análisis se procede a contar todas las colonias en aquellas cajas que contengan menos de 300; una mitad representativa de las cajas si contienen aproximadamente entre 301 - 500 colonias y multiplicar el resultado por 2; una cuarta - parte representativa de la caja, si el número en toda la placa es de aproximadamente de 501 - 800 colonias y multiplicar por 4; contar los cuadros mayores de la cuadrícula del contador al azar y sacar la media aritmética, multiplicar por 65 el total contado si el número es mayor de 800. (10)

Al resultado final de los recuentos, multiplicarlo en cada caso por la inversa de la dilución correspondiente. (10).

### COLIFORMES TOTALES

Esta técnica esta basada en un procedimiento estadístico y matemático que expresa en forma cuantitativa la densidad de microorganismos contenidos en una muestra. La prueba consiste en inocular series de tubos con algún medio nutritivo y un dispositivo indicador que permita poner de manifiesto a un microorganismo o grupo particular de ellos. Después de la incubación es de esperarse si la distribución de germenés viables es homogéneo en la muestra original, un número de tubos positivos en proporción directa al contenido microbiano de la muestra. Para cada combinación de tubos positivos, con respecto a los inoculados, existe un número que puede consultarse en una tabla que para tal efecto acompañan al método. (10)

### Salmonella

En este análisis solo se reporta, de acuerdo a la presencia o ausencia de Salmonella como positiva o negativa la prueba en 25 g de muestra. (20)

### Staphylococcus aureus

Calcular el contenido de microorganismos en la muestra, tomando en cuenta el número de colonias, la dilución seleccionada para el recuento y el volumen inoculado; (20). como en el ejemplo siguiente :

Si la dilución seleccionada para el calculo final es 10 y se encontraron 148 colonias. probar 7, si de ellas, 5 resultan positivas a la prueba de coagulasa y termonucleasa el calculo final sera :

- a) Total de colonias coagulasa positiva y termonucleasa positiva en la placa.

7 colonias ----- 5 positivas  
148 colonias ----- X

X = 105 colonias positivas en la dilución  
10 de la placa inoculada con 0.1 ml

b) Redondeando la cifra a dos dígitos significativos:

105 ----- 100

c) Como 0.1 ml de la dilución  $10^{-3}$  corresponden a 1 ml de la dilución  $10^{-4}$ , multiplicar el número de colonias por la inversa de esta dilución.

$$100 \times \frac{1}{10^{-4}} = 100 \times 10^4 = 1000000$$

d) Reportar Staphylococcus aureus coagulasa positiva y termoneucleasa positiva col/g de alimento.

Si la prueba de coagulasa resulta negativa en todas las colonias probadas reportar 0 col/g.

#### Bacillus cereus

A partir del porcentaje de colonias confirmadas de B. cereus calcular el número de germenés por gramo de muestra (col/g). No olvidar que el volumen inoculado fue de 0.1 ml (20).

Ver inciso (a) del anexo No. B.

A N E X O No. 1

PRUEBAS BIOQUIMICAS

## FORMACION DE ACIDO SULFHIDRICO

Esta prueba se basa en la formación de ácido sulfhídrico por actividad bacteriana sobre un medio orgánico líquido, conteniendo cistina como compuesto, con azufre. Esta prueba depende de la solubilidad del  $H_2S$ , que determinará su liberación del medio, así mismo, influye el grado de anaerobiosis que se tenga ya que la producción del  $H_2S$  no ocurrirá si hay un alto grado de aereación.

Los tubos de ensaye se inoculan por punción hasta el fondo en medio SIM, se incuban a 30 oC durante 24 h. La prueba se considera positiva si en el medio aparece un color negruzco. (25)

## REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS

La prueba de reducción de nitratos a nitritos se lleva a cabo adicionando al caldo nitrato 0.5 ml de ácido sulfanílico y 0.5 ml de alfa naftilamina, se agita y se observa la presencia de una coloración rosa o rojo (prueba positiva).

Esta prueba se basa en que los organismos que reducen los nitratos a nitritos son estrictamente aerobios y autotrofos y que usan el nitrato como única fuente de nitrógeno. (25)

## PRODUCCION DE INDOLE

La formación de indol, se asocia con la presencia de la enzima triptofanasa, que degrada al aminoácido triptófano.

Para determinar la formación de ésta enzima, se inoculan -- tubos de ensaye conteniendo medio SIM (ver anexo No. 5) se incuban a 37 oC por 24 h, despues se adiciona al tubo 0.2 de reactivo de Kovacs y agitar suavemente; un color rojo hace la prueba positiva. (25)

## PRUEBA DE LA MOVILIDAD

Se basa en la movilidad o inmovilidad de un organismo. las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos, que se encuentran principalmente en los bacilos, sin embargo algunas formas de cocos son móviles.

Los organismos se inoculan por punción hasta el fondo, en -- tubos que contengan medio SIM y se incuban a 37 oC durante 24 h.

El microorganismo es móvil si se observa desarrollo (enturbiamiento) fuera de la picadura, son inmóviles si solo crecen a lo largo de la picadura. (25)

## PRUEBA DE LA UREA

Con esta prueba se determina la capacidad de un organismo -- para romper la urea, formando amoniaco por la acción de la enzima ureasa.

Los tubos inoculados para ésta prueba en caldo urea, (ver -- anexo No. 5) se incuban a 35 oC de 24 a 48 h.

La prueba es positiva si despues de la incubación se observa un intenso color rosa o rojo en todo el cultivo. (25)



## PRUEBA DEL MALONATO

Esta prueba es para determinar la capacidad de un organismo para utilizar el malonato de sodio como única fuente de carbono, produciendo alcalinidad en el medio.

Los microorganismos inoculados en caldo malonato (ver anexo No. 5) se incuban a  $35 \pm 2$  °C de 24 a 48 h.

La prueba es positiva si se observa un color azul brillante o azul de prusia en el medio. (25)

## CALDO ROJO O METILO ( RM )

Esta prueba mide la capacidad de un organismo para producir y mantener como producto final un ácido estable a partir de la fermentación de la glucosa; es una prueba cualitativa que mide la producción de ácido por medio de la variación del pH. (25)

Los microorganismos inoculados en caldo rojo de metilo, --- (ver anexo No. 5) se incuban a  $30$  °C  $\pm$   $5$  °C de 3 a 5 días.

Si el cultivo es suficientemente ácido, permite que el reactivo RM permanezca rojo (pH 4.4) en la superficie del medio.

La prueba es negativa cuando el medio permanece amarillo.

Si se observa un color naranja, la reacción es lenta y se debe continuar la incubación 4 días más y repetir la prueba. (25)

## PRUEBA EN CALDO VOGES-PROSKAUER

Esta prueba es para determinar la capacidad de algunos microorganismos para formar un producto final neutro, el acetil metil carbinol (acetoina) a partir de la fermentación de la glucosa.

Los microorganismos inoculados en el caldo Voges-Proskauer deben incubarse a  $35 \pm 2$  °C durante 24 a 48 h.

Antes de leer la prueba adicionar 0.6 ml de alfa naftol y 0.2 ml de KOH al 40 %, es importante agitar vigorosamente el tubo después de adicionar los reactivos para que el O<sub>2</sub> atmosférico puede oxidar la acetoina y se obtenga el color característico de la reacción, por lo menos deben pasar 15 minutos para proceder a leer la prueba.

Se da la prueba como positiva cuando se observa color rosa o rojo en la superficie del medio (acetoina presente). (25)

## AGAR CITRATO DE SIMMONS

Esta prueba es para determinar si un organismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para su crecimiento, produciendo alcalinidad en el medio.

Dejar los microorganismos inoculados en este agar por 24 a 48 h a  $35 \pm 2$  °C si la prueba es negativa en este tiempo, incubar por 3 días más.

La prueba es positiva si el crecimiento es de color azul intenso en el agar inclinado. La prueba es negativa si no hay cambio de color, ni crecimiento. (25)

#### CALDO ONPG

Esta prueba es para demostrar la presencia o ausencia de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, por medio de la utilización del compuesto orgánico orto-nitrofenil - $\beta$ -D- galactopiranosido (ONPG).

Los tubos de ONPG inoculados deben incubarse a  $35 \pm 2$  oC -- de 18 a 24 h.

La prueba se da como positiva con el cambio de color del medio, de incoloro a amarillo. (25)

#### CALDO LACTOSA Y CALDO MANITOL CON INDICADOR ROJO DE METILO

Las pruebas de fermentación o degradación de carbohidratos se utilizan para determinar la capacidad de un organismo para degradar u. carbohidrato específico incorporado a un medio basal, - por medio de la producción de ácido o ácido y gas.

PRUEBA POSITIVA .- Cuando hay cambio de coloración de rojo a amarillo, que indica cambio de pH, en esta prueba puede o no haber formación de gas.

PRUEBA NEGATIVA .- Cuando no existe cambio de coloración, el medio permanece rojo o rosa. (25)

#### HIDROLISIS DE ALMIDON

Para la prueba de hidrólisis del almidón, se cubre la placa con una solución de lugol y despues de 30 a 60 segundos se observa la formación de halos incoloros alrededor de las colonias amilolíticas (prueba positiva). (25)

#### PRUEBA DE LA CATALASA

La enzima catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.

La gran mayoría de los microorganismos aerobios, producen catalasa, que desdobra el peroxido de hidrogeno en agua oxigeno. (25)

Para esta prueba, basta añadir sobre las colonias de éstos microorganismos de dos a cuatro gotas de peróxido de hidrógeno al 30 % .

Se considera positiva la prueba si hay desprendimiento de gas sobre la colonia.

#### PRUEBA DE LA GELATINA

Esta prueba se basa en la capacidad de un organismo para -- producir enzima tipo proteolítico (gelatinasas) que licúan la gelatina.

Se inoculan por punción hasta el fondo de los tubos, conteniendo gelatina bacteriológica, (ver anexo No. 5 ) incubandose a temperatura ambiente durante 5 días aproximadamente.

La prueba se considera positiva si despues del tiempo propuesto la gelatina se licúa. (25)

**A N E X O N o. 8**

**REACTIVOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA COLORACION DE GRAM**

**REACTIVOS :**

**SOLUCION DE CRISTAL VIOLETA OXALATO DE AMONIO**

Solución A = 2.0 g de cristal violeta, disueltos en 20.0 ml de -- alcohol étílico al 95 % .

Solución B = 0.8 g de oxalato de amonio, disueltos en 80 ml de -- agua destilada.

Diluya la solución A en 4 partes de agua destilada y mez--- clar con una cantidad igual de solución B. (2)

**SOLUCION YODO-YODURADA DE LUGOL**

Disolver 1 g de yodo y de 2 a 5 g de yoduro de potasio en - 300 ml de agua destilada y dejar reposar 24 h. (2)

**AGENTE DECOLORANTE**

Alcohol étílico al 95 %

**COLORANTE DE CONTRASTE (SOLUCION DILUIDA DE SAFRANINA)**

Disolver 2.5 g de safranina en 100 ml de alcohol étílico al 95 % mezclar 25 ml de esta solución con 75 ml de agua destilada. (2)

**PROCEDIMIENTO PARA LA TINCION DE GRAM**

- 1.- Cubra el frotis con la solución de cristal violeta oxalato de amonio por 30 segundos.
- 2.- Enjuague el colorante con agua y aplique la solución yodo-yodurada de 30 a 60 segundos.
- 3.- Lave la solución yodada con agua y seque el exceso de agua.
- 4.- Decolorar mediante aplicación de alcohol al 95 % permitiendo que se seque y observando cuidadosamente.
- 5.- Cuando ya no se aprecie el color en el frotis, lavar lo inme-- diatamente (la coloración solo dura unos cuantos segundos).
- 6.- Cubra el frotis con un colorante de contraste (safranina) du-- rante un minuto.
- 7.- Lave el colorante de contraste con agua y seque el frotis. (2)