



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CONTROL MICROBIOLÓGICO DE PRODUCTOS CONFITADOS, DE CHOCOLATE Y DERIVADOS.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

TRABAJO ESCRITO VIA EDUCACION CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MA. DE LOS DOLORES GLORIA SAUCEDO ARTEAGA



MEXICO, D. F.

1994



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.

Jurado asignado:

Presidente Prof. BISERKA SVESHTAROVA PEKARKOVA.

Vocal Prof. PEDRO VALLE VEGA.

Secretario Prof. BEATRIZ LUNA MILLAN.

1er. Suplente Prof. MARIA ELSA ESCUDERO GARCIA.

2do. Suplente Prof. AURORA IRMA ORTEGON AVILA.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Bibliotecas y Departamento de Aseguramiento de la Calidad de Ricolino S. A. de C. V.

Asesor del tema. M. en C. Biserka Sveshtarova Pekarkova.



Sustentante. Ma. de los Dolores G. Saucedo Arteaga.



RECONOCIMIENTOS:

GRACIAS A DIOS.

A mi madre y hermanos por su cariño, confianza y apoyo de toda la vida.

A los maestros de la Facultad que contribuyeron a mi formación profesional por su paciencia y dedicación a la Universidad.

A la empresa Ricolino S. A. de C. V. por permitirme aprovechar la oportunidad de obtener el grado de licenciatura, especialmente al Ingeniero Jorge Cebrenros Crespo.

A los queridos amigos y compañeros.

INDICE:**PAGINA:**

1. INTRODUCCION.	1
2. OBJETIVO.	2
3. GENERALIDADES.	2
3.1. FUENTES DE CONTAMINACION.	3
3.2. GRUPOS INDICADORES.	8
3.3. MUESTREO.	11
4. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS.	15
PREPARACION DEL MATERIAL Y EQUIPO.	15
RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.	16
MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES. (tabla 1).	
PREPARACION DE LA MUESTRA.	19
CUENTA DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS.	21
CUENTA DE COLIFORMES TOTALES.	22
CUENTA DE COLIFORMES FECALES.	24
ESQUEMA COLIFORMES TOTALES Y FECALES. N.M.P.	
NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS. (tabla 2).	
CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS.	25
HONGOS Y LEVADURAS XEROTOLERANTES.	26
COMPOSICION DE MEDIOS DE CULTIVO PARA H. Y L. XEROTOLERANTES.	27
CUENTA DE <u>Staphylococcus aureus</u> .	28
PRESENCIA DE <u>Salmonella sp.</u>	31
ANALISIS MICROBIOLOGICO DE AMBIENTE Y FLUJOS DE AIRE.	36
ANALISIS MICROBIOLOGICO DE MAQUINARIA Y EQUIPO.	37
5. HIGIENE.	39
6. CONCLUSIONES.	41
7. BIBLIOGRAFIA.	42

1. INTRODUCCION:

Los productos confitados, de chocolate y derivados considerados en el presente trabajo, comprenden alimentos elaborados a base de: cocoa, leche en polvo, floc de cacao, azúcar, gomas, frutos, cereales, jarabes, aromatizantes, colorantes, etc..

De acuerdo a su proceso de fabricación se dividen en:

COBERTURAS DE CHOCOLATE.

PRODUCTOS BAÑADOS CON CHOCOLATE.

PRODUCTOS CUBIERTOS CON CHOCOLATE.

PRODUCTOS CONFITADOS.

PRODUCTOS GRAGEADOS.

PRODUCTOS DE GOMA.

CHOCOLATE EN BARRA.

La actividad de agua de algunos productos como azúcar, cocoa, chocolate y confituras, es suficientemente baja como para prevenir el crecimiento de los microorganismos endógenos o de los contaminantes exógenos. Sin embargo durante la elaboración de los productos hay momentos en los que puede tener lugar la alteración, o que pueden introducirse gran número de bacterias, levaduras y hongos. (1)

Dependiendo del proceso de fabricación, esta contaminación puede mantenerse hasta el producto final o ser eliminada en el transcurso del mismo.

El análisis microbiológico practicado a la fecha a los productos mencionados, nos revela que existen posibilidades de contaminación específicas de los insumos, durante los procesos, e inclusive de los hábitos de higiene del personal, de la limpieza y sanitización de los equipos, que con frecuencia se creen controlados y su inspección es menos frecuente.

La diversidad de los insumos, de los procesos y las condiciones ambientales en la elaboración de estos productos, nos lleva a la necesidad de formular los pasos a seguir para lograr su control microbiológico

Para el análisis microbiológico de los alimentos, se encuentran técnicas generales y algunas específicas para detección e identificación de microorganismos, pero no se han establecido las condiciones para efectuar el control microbiológico de productos de confitería y chocolates.

El presente trabajo pretende demostrar los aspectos más importantes de considerar en la industria de confitería y chocolates para lograr el control microbiológico adecuado de sus productos.

2. OBJETIVO:

Justificar el control microbiológico de productos confitados, de chocolate y derivados.

3. GENERALIDADES:

Las coberturas de chocolate se elaboran a base de licor y manteca de cacao, azúcar, leche y otros materiales como emulsificantes y saborizantes. También pueden formularse con manteca vegetal que le permita solidificar a diferentes temperaturas y son aplicadas en productos bañados (proceso de trampado) y productos cubiertos (proceso de engrosado).

Los centros a bañar o cubrir pueden estar elaborados a base de malvavisco, fondant, frutos, cereales, pastelillos o galletas.

Los productos engrosados pueden llevar un recubrimiento de jarebe y laca (proceso de confitado) y brillados.

Utilizando como centros cristales de azúcar, engrosados y añadiendo color y sabor se obtienen los productos grajeados.

Los productos de goma son depositados en moldes de almidón y posteriormente azucarados o brillados

El chocolate en molde o barra, a base de coberturas es solidificado en túneles de enfriamiento.

Todos los productos son envasados en envase primario, secundario y manejados en cajas de cartón o bandejas de plástico para facilitar su transporte.

La calidad de estos alimentos, su periodo de conservación, los riesgos o peligros potenciales para la salud del consumidor, dependen del adecuado control microbiológico en cada una de las etapas del proceso. De esto se deriva la importancia de mencionar las posibles fuentes de contaminación.

3.1 FUENTES DE CONTAMINACION:

Cada una de éstas influye en el tipo y número de microorganismos presentes en el producto.

- *Materia prima.*
- *Higiene del equipo.*
- *Higiene del personal.*
- *Aire y agua suministrados.*
- *Tiempo de exposición o almacenamiento de los productos a temperatura y humedad que permitan la multiplicación de los microorganismos.*
- *Ambiente.*

MATERIA PRIMA.

Azúcar. Los contaminantes bacterianos más importantes son miembros de los géneros Bacillus y Clostridium, levaduras y hongos. El crecimiento de estos organismos dependerá de que consigan la humedad necesaria y los elementos nutritivos esenciales. (10)

Cocoa. La microflora del cacao consta principalmente de Bacillus sp. con un número variable de hongos y levaduras. Algunas muestras pueden presentar enterobacterias y otras bacterias no formadoras de esporas. Salmonella es el único microorganismo patógeno de importancia en el chocolate. (9)

La irradiación de la cocoa destruye los microorganismos pero afecta negativamente el aroma del producto. (17)

Frutos secos. cacahuete, almendras, nueces. Debido al alto contenido de grasas y a la escasa proporción de agua, estos productos son completamente refractarios a la acción de las bacterias.

En condiciones de humedad suficiente, pueden crecer hongos durante el almacenamiento. Aspergillus constituye parte de la microflora del aire y del suelo, se encuentra en plantas y animales y algunas cepas producen las llamadas aflatoxinas. (10)

Las aflatoxinas son incoloras, inodoras o inspidas, solubles en agua y disolventes como el metanol, insolubles en aceite, estables al calor, el frío y la luz. No se degradan naturalmente y no se destruyen con facilidad.

Las aflatoxinas se encuentran entre las sustancias químicas más tóxicas y carcinogénicas probadas. (10, 19)

Leche en polvo descremada. La carga microbiana de los productos lácteos desecados por calor depende del contenido bacteriano del producto líquido que se va a desecar, de la temperatura y tiempo de precalentamiento, del proceso de evaporación, de la contaminación y proliferación en tuberías y depósitos, del método de desecación y de su posible contaminación a partir del aire. Las bacterias termodúricas, en general, son más numerosas (estreptococos termorresistentes, micrococcos, esporulados aerobios y anaerobios). (6)

Cereales. Los factores más importantes que influyen en la alteración por hongos de los granos almacenados se refieren a niveles de humedad de 12 a 13%, lesiones físicas y temperaturas inadecuadas. Las especies más comunes corresponden a Aspergillus, Penicillium y Fusarium. Los granos deteriorados por hongos constituyen un peligro potencial sanitario, algunos relacionados con producción de micotoxinas. (8)

El procesamiento de los cereales para la producción de hojuela y arroz inflado, destruye la población bacteriana presente en el grano, aunque pueden contaminarse en el momento del envasado.

Fondant. Se atribuye el deterioro de cremas de fondant cubiertas de chocolate a Clostridium spp. de la albúmina del huevo y el azúcar, pero con las actuales prácticas de elaboración esto parece poco probable, porque la mayoría de las cremas de fondant contienen por lo menos 70% de sólidos disueltos y estos microorganismos no crecen por abajo de $a_w = 0.94$ que equivale a 48% de sacarosa. (17)

HIGIENE DEL EQUIPO.

La mayoría de los equipos son metálicos con algunas partes de material plástico. El equipo metálico no permite el desarrollo de microorganismos no tiene flora microbiana normal, sin embargo, las superficies y equipo en contacto con los alimentos es una de las mayores fuentes de contaminación. El equipo puede estar limpio y sanitizado, pero esto no quiere decir que sea estéril. Aún en superficies lavadas y visiblemente limpias, es posible la sobrevivencia y desarrollo de microorganismos. Si los residuos, películas de grasa, depósitos minerales, polvo y demás elementos son visibles uno puede estar seguro que un alto nivel de contaminación está presente.

Los residuos de confituras en el equipo son un riesgo para la selectividad de levaduras xerotolerantes. (17)

Se debe poner especial cuidado en eliminar residuos de humedad. Si se consigue mantener secas las superficies, el riesgo de proliferación microbiana es pequeño. (2, 8, 17)

HIGIENE DEL PERSONAL.

Las personas enfermas pueden transmitir por medio de los alimentos, los microorganismos causantes de su padecimiento.

El lavado de las manos es indispensable para evitar contaminaciones. Los hábitos poco higiénicos como introducirse el dedo a la nariz o boca, peinarse o fumar deben evitarse. (8)

Las bacterias predominantes de la piel son estafilococos y corinebacterias; menos frecuentes Micrococcus, Bacillus, Alcaligenes, Pseudomonas, Enterobacter, Klebsiella, Proteus, Escherichia y Citrobacter.

Las cepas de Staphylococcus habitan en garganta y nariz de muchos individuos sin causar daño aparente, pudiendo transferirse de los dedos y manos a los alimentos y desarrollarse con rapidez en ellos.

El pelo que cubre la piel es una fuente potencial de microorganismos. No existe flora normal del cabello, pero actúa como portador para transportar y difundir microorganismos. Usar barba, bigote y patillas resulta inadecuado en un área de manejo de alimentos. Además de los microorganismos, pueden depositarse cabellos que contaminan los alimentos. (2)

El cambio de ropa de calle por el uniforme limpio y planchado, reduce el número y clase de microorganismos que pueden desprenderse de la ropa exterior durante el trabajo. (8)

AIRE Y AGUA SUMINISTRADOS.

El agua es el ingrediente industrial número uno, interviene en el proceso de la mayoría de los alimentos, en la limpieza de equipo y áreas de proceso. (2)

El agua necesaria para los procesos puede estar contaminada por aguas residuales o por desechos humanos y animales que contienen microorganismos patógenos.

Uno de los servicios de infraestructura requeridos para conseguir mantener limpio un establecimiento de elaboración de alimentos, es un sistema de ventilación que distribuya aire limpio y templado que elimine pulverizaciones del interior. (8)

El aire en procesos de secado de producto, requiere de filtros adecuados para la eliminación de polvos y partículas que sirven de transporte a las esporas o células vegetativas que pueden encontrarse depositadas en el suelo.

paredes o los ductos mismos y que al ser arrastradas por el aire llegan a contaminar los productos, donde van a encontrar las condiciones de humedad y nutrición requeridas para su desarrollo.

El efecto que tenga el aire sobre los microorganismos en los alimentos, depende de los niveles de contaminación y del tiempo de contacto del aire con el alimento. (2)

El control microbiológico del aire y del agua permite garantizar su inocuidad para ser utilizados en los procesos.

ALMACENAMIENTO.

El control de la temperatura y humedad, proporciona condiciones de trabajo confortables y hace más difícil el desarrollo de los hongos en las capas superficiales húmedas, tanto de equipo como de productos.

La humedad relativa (RH) es importante desde el punto de vista de la actividad acuosa (Aw) del interior del alimento, así como del desarrollo de microorganismos en las superficies.

Si se almacenan alimentos con baja Aw en ambiente de RH elevada, éstos recobran humedad hasta establecer un equilibrio. De la misma forma, los alimentos con Aw alta, pierden humedad en ambiente de RH baja.

En general los ambientes de almacenamiento son; a RH escasa, temperaturas elevadas y viceversa. (10)

El tiempo que permanecen los alimentos en almacenamiento o durante los procesos, en ambientes favorables a la multiplicación de microorganismos es un factor que influye en la calidad microbiológica del producto final.

AMBIENTE.

Los microorganismos que se encuentran en el aire, no se multiplican en él, están dispersos o adheridos a partículas de polvo en la superficie de la tierra o son exhalados de las vías respiratorias del hombre y los animales. (20)

El suelo es el gran reservorio de microorganismos que contiene la población mas grande y la mayor variedad de especies. Organismos patógenos diversos, del intestino del hombre y animales viven en él. (2)

El hombre distribuye constantemente microorganismos en el aire, por descamación de la piel, por contaminaciones fecales imperceptibles de las manos y ropas, pero la mayoría proviene de las vías respiratorias superiores

En una conversación tranquila, se expulsa gran número de microorganismos, en la tos se incrementan y un estornudo dispersa hasta 20 000 gotitas, la mayoría de las cuales contienen bacterias o virus.

Las gotitas más grandes recorren una distancia de 5 metros antes de caer al suelo, donde se adhieren a partículas de polvo y al secarse dejan los organismos en estas partículas. Las gotitas más pequeñas permanecen suspendidas en el aire y se evaporan en menos de un segundo, dejando "núcleos de gotitas" de pocas micras de diámetro que pueden contener o no microorganismos. Estos "núcleos" se sedimentan muy lentamente o pueden permanecer suspendidos por las corrientes de aire en habitaciones muy concurridas. (20)

Los empaques sirven como una cubierta protectora para limitar o prevenir la contaminación microbiana, sin embargo, no previenen el desarrollo de los organismos ya presentes en el producto. (2)

La contaminación de los alimentos puede reducirse a un mínimo con la práctica de una limpieza y desinfección eficaces de la fábrica y con una higiene escrupulosa de los trabajadores.

3.2 GRUPOS INDICADORES:

No es posible examinar cada producto o alimento para investigar la presencia de organismos peligrosos. Una medida de control efectivo para detectar el peligro potencial o advertencia de riesgo de contaminación con microorganismos patógenos es utilizar indicadores.

Por medio de los organismos indicadores se pueden monitorear materias primas, condiciones y etapas del proceso o prevenir problemas de contaminación con patógenos.

Para definir un microorganismo como indicador se necesita conocer su fuente usual, la asociación con patógenos entéricos, los métodos de identificación, condiciones de crecimiento, sobrevivencia durante el almacenamiento y procesamiento, y la significancia de estos microorganismos en alimentos o en un material particular. (2)

En el control microbiológico se utilizan como indicadores:

Mesófilos aerobios.

Refleja las condiciones de los diferentes procesos. También está influenciado por el número de mesófilos aerobios contribuidos por los ingredientes y el ambiente.

Indican la calidad sanitaria de un alimento natural o procesado. Estiman la duración de la vida de anaquel de un producto.

Una cuenta elevada en productos del cacao indica una temperatura baja en el tostado del grano o un desajuste en el descascarado del grano tostado, lo que ocasiona contenido de cascara en la cocoa. (17)

Coliformes totales:

El grupo coliforme está conformado por cuatro géneros principalmente: Escherichia, Enterobacter, Citrobacter y Klebsiella.

El grupo coliforme es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal humana. Tiene sobrevivencia similar a la de los patógenos e incapacidad para multiplicarse fuera del intestino en aguas limpias. Por esto se utiliza como indicador de contaminación fecal en el agua. Cuanto mayor es el número de coliformes en una muestra de agua, mayor es la probabilidad de que la contaminación fecal sea reciente.

En un alimento los coliformes sobreviven y se multiplican. Pueden utilizarse como indicadores de prácticas higiénicas inadecuadas (5, 15).

Coliformes fecales:

Las bacterias intestinales patógenas como el bacilo tífico, los bacilos disentéricos y los vibriones del cólera sobreviven durante unas semanas en el agua y pueden iniciar una epidemia de gran importancia. Su aislamiento e identificación es complicada y tardada por lo que se utiliza como indicador Escherichia coli, ya que se considera el representante más genuino de la flora bacteriana intestinal humana y de muchos animales especialmente de sangre caliente.

Es un coliforme gramnegativo, capaz de fermentar la lactosa con producción de gas a 44,5 °C a 48 horas de incubación.

Se buscan como indicadores en agua, leche y productos donde se desea poner de manifiesto la contaminación fecal. (5, 15)

Hongos y levaduras:

Indican prácticas higiénicas inadecuadas en los procesos de elaboración o durante el almacenamiento.

Es probable la presencia de potentes toxinas producidas por los hongos que se han desarrollado.

Pueden propiciar cambios indeseables en el aspecto, consistencia y color de los alimentos. (5)

La cuenta de hongos y levaduras en cocoa envasada puede ser alta; los límites más recomendados son <50 UFC / g.

Las levaduras se desarrollan con facilidad en utensilios y equipo defectuosamente lavados

En confitures pueden encontrarse levaduras y hongos xerotolerantes. Se requieren diluyentes y medios de cultivo con elevada concentración de azúcar para reducir el shock osmótico en la detección de estos microorganismos.

Los hongos pueden causar daño en productos de confitería, cuando la humedad, empaque y condiciones de temperatura sean favorables. (2, 17)

Staphylococcus aureus.

Su presencia y número da un indicio de la calidad microbiológica y manejo sanitario de los alimentos.

Representa un peligro potencial para la salud de los consumidores ya que muchas cepas de éste microorganismo producen enterotoxinas, que son termorresistentes y al ser ingeridas con el alimento producen gastroenteritis en el hombre.

Se ha encontrado en la leche y productos lácteos.

La toxina se genera con mayor facilidad en alimentos procesados, donde se ha eliminado gran parte de la flora propia del alimento y S. aureus puede multiplicarse libremente produciendo la enterotoxina. (5)

Salmonella sp:

El nivel de contaminación es siempre bajo en los ingredientes y productos, por lo que es importante un muestreo adecuado para detectar pequeños números de salmonella.

El control de ingredientes es esencial para prevenir la contaminación de Salmonella en productos de chocolate, ya que no se utiliza algún proceso letal.

Las salmonellas no crecen a la aw de las confituras. Sin embargo si provienen de algún ingrediente, pueden sobrevivir a la etapa de calentamiento. Pueden provenir de leche, huevo, especias y grenetina. (17)

3.3. MUESTREO:

Cada tipo de alimento exige un procedimiento propio de toma de muestras, en el cual el número de muestras a analizar depende de la variación normal de la contaminación microbiana, de la homogeneidad del alimento y de la sensibilidad de los métodos de análisis utilizados para saber si el alimento se ajusta a la norma aplicada al mismo.

(18)

Una muestra debe ser representativa del lote donde proviene.

Las recomendaciones generales para obtener muestras son las siguientes:

- 1. Todo el material que se use, debe esterilizarse en horno o en autoclave, según el caso, envuelto con papel kraft para protegerlo de cualquier contaminación. Cucharas, cuchillos, tijeras, espátulas, bolsas, frascos, etc.*
 - 2. Al coleccionar la muestra, evitar contaminaciones del ambiente, tales como polvo, tierra, saliva, descargas nasofaríngeas, etc. El recipiente o bolsa se abrirá sólo lo necesario para introducir la muestra, se cierra y se cubre con el papel que la protege.*
 - 3. Es esencial que el recipiente y utensilios empleados para el muestreo no sólo se encuentren estériles, sino además limpios, libres de sustancias que afecten la viabilidad de los microorganismos.*
 - 4. Identificar claramente el recipiente antes de coleccionar la muestra con rótulo o etiqueta indeleble.*
 - 5. Anexar todos los datos importantes para la identificación de la muestra. Anotar defectos físicos observados y/o condiciones en las que se tomó la muestra.*
 - 6. En productos envasados, coleccionar las unidades requeridas de acuerdo con el propósito del análisis. Tomarlas al azar, al final o a lo largo de un proceso de envasado.*
 - 7. En productos a granel, bolsas o recipientes grandes como los insumos, obtener la muestra de diferentes partes del lote.*
 - 8. Conservar las muestras de alimentos perecederos en refrigeración si no se analizan de inmediato.*
- (15)

Muestreo del agua.

Considerar los resultados del análisis según la información de las condiciones sanitarias del lugar de donde proviene la muestra.

Las muestras se recogen en diferentes puntos representativos de todo el sistema de distribución. Examinar repetidas muestras de un punto determinado con intervalos de tiempo razonables y establecer la periodicidad del muestreo.

Es fundamental seguir estos pasos para obtener resultados confiables:

1. Preparar frascos.

Antes de esterilizar, se lavan perfectamente y se les agrega una solución de tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro que pudiera contener el agua. Para muestras de agua potable poner 0.1 ml de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 3% por cada 120 ml de agua.

Después se cubre el tapón y cuello con papel aluminio, para evitar contaminaciones posteriores que puedan transferirse a la muestra.

Se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos. En algunos casos pueden utilizarse bolsos de plástico preesterilizados.

2. Asepsia preliminar.

Lavar y desinfectar las manos y el grifo. Purgar la línea dejando correr el agua durante 2 a 3 minutos.

3. Toma de muestra.

Se destapa el frasco justo al momento del muestreo y se llena hasta dos tercios de su capacidad.

Para la toma de muestra en cuerpos receptores, se quita el papel, se introduce el frasco hasta 30 cm. de la superficie, se destapa dentro del agua, sosteniéndolo por la base y contra la corriente o empujándolo suavemente en dirección opuesta a la mano.

Para muestreo a profundidad se emplean aparatos especiales.

4. Las muestras deben analizarse antes de que pasen 5 horas desde el muestreo. (1)

Muestreo del aire.

Por lo general, los microorganismos se encuentran en el aire en cantidades pequeñas en comparación con el suelo y el agua y muy rara vez son metabólicamente activos debido a la poca agua y bajos niveles de nutrientes que hay en la atmósfera. En ella hay esporas de hongos, bacterias y algas así como quistes de protozoarios; también hay células vegetativas de todos los grupos pero mueren rápidamente a menos que estén protegidos contra las radiaciones ultravioleta y la desecación. Algunas partículas como las esporas, se sedimentan cuando el aire está tranquilo y, por lo tanto, dependen de la turbulencia y las corrientes de convección para permanecer en el aire.

El aire es principalmente importante como medio de transporte y dispersión de los microorganismos. (4)

Métodos de muestreo del aire.

Los microorganismos viables pueden determinarse cuantitativamente por varios métodos que incluyen el impacto en superficies sólidas, sedimentación, filtración, centrifugación y precipitación electrostática.

Los más usados son los de impacto en superficies sólidas y de sedimentación en cajas de cultivo.

Al utilizar equipos especiales para el muestreo del aire, deben seguirse las indicaciones del fabricante sobre manejo, operación y mantenimiento de los mismos. Generalmente utilizan medios no selectivos como agar cuenta estándar, agar soya triplicase, agar sangre y agar infusión cerebro-corazón. Una excepción sería utilizar medios selectivos para recuperación de hongos con la inhibición de crecimiento bacteriano. (17)

Diferentes tipos de muestreadores de aire:

Excepto en la técnica de sedimentación en placa, se muestrean volúmenes conocidos de aire con los diferentes equipos. (2)

Detector ambiental centrífugo:

Es un dispositivo portátil de operación manual. Los tiempos de muestreo son programables en intervalos de 30 segundos hasta 8 minutos. Tiene capacidad de 20 a 320 litros a una velocidad de 40 litros de aire por minuto.

El principio de operación es la impactación de los microorganismos en una tira de agar nutritivo, insertada en el cilindro superior. No requiere de diluciones y las partes que están en contacto con la muestra de aire, pueden desmontarse para su esterilización.

Las partículas contenidas en el aire se impactan en la tira de agar nutritivo mediante la fuerza centrífuga que se crea al girar el cilindro superior. Las tiras de agar se encuentran disponibles con medios para conteo total, levaduras y hongos, estafilococos y grupo coliforme. Las tiras se incuban y se pueden contar la UFC desarrolladas. (3)

Detector de tubo ranurado:

Es un dispositivo de impactación portátil, de forma cilíndrica, con un tubo ranurado en la parte superior. Por debajo de las ranuras y por dentro del cilindro, se coloca una caja de cultivo con agar que gira con una velocidad ajustable.

El aire que pasa por las ranuras, impacta las partículas suspendidas sobre la superficie del agar. La placa se quita y se incuba. Se cuentan las UFC / ft³ desarrolladas en el tiempo que se tomó la muestra. (17)

Muestrador de mallas Andersen:

Es un detector de impactación, en etapas múltiples. Cuenta con tamices arreglados en cascada de mayor a menor diámetro de abertura, en cada etapa se coloca una caja de cultivo con agar. Las partículas se impactan en la superficie del agar y son clasificadas por tamaños. Las cajas se incuban y se cuentan las UFC desarrolladas. (10)

4. TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS.

El desarrollo de las técnicas y la emisión de resultados dependen del cuidado y la higiene de las instalaciones, equipo y material con que se trabaja.

Es importante la desinfección de las áreas de trabajo con una solución preparada en forma adecuada:

Fenol al 5 % diluido en agua.

Yodo (KI) 2 a 7 % diluido con etanol.

Etolol al 70 % diluido en agua.

Cloruro de benzalconio al 1 % diluido en agua.

PREPARACION DEL MATERIAL.

Cualquier material que llegue a estar en contacto con la muestra, debe estar estéril.

El calor húmedo (autoclave) y el calor seco (horno) son los métodos de esterilización mas comunes.

El material que se esteriliza debe prepararse de tal manera que al retirarlo del equipo no se contamine de nuevo. (5)

MATERIAL UTILIZADO.

Espátulas, cucharas, cuchillos, tijeras.

Frascos de vidrio con tapón de rosca de 200 y 250 ml de capacidad.

Tubos de ensayo con tapón de rosca de 13 X 100, 16 X 150, 20 X 150 mm.

Pipetas serológicas con tapón de algodón de 10, 5 y 1 ml.

Graditas adecuadas a los tubos.

Cajas de petri estériles 100 X 10 mm.

Portaobjetos de vidrio lavados y desengrasados.

Asa de platino o nicromel de 3 mm. de diámetro y asa recia.

Aplicadores de madera.

Varilla de vidrio de 3.5 mm. de diámetro y 20 cm. de largo, con un doblez en ángulo recto de 4 cm.

EQUIPO.

Horno para esterilización a 180 °C

Autoclave con termómetro y manómetro.

Baño de agua con termómetro y termostato.

Motor y vasos de licuadora de 2 velocidades.

Agitador y barras magnéticos.

Balanza granataria con sensibilidad de 0.1 g.

Estufa de incubación a 35 °C con termostato.

Estufa de incubación a 30 °C con termostato.

Contador de colonias.

Contador manual.

Microscopio.

RECOMENDACIONES GENERALES PARA LA PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

Los medios de cultivo deshidratados de marcas comerciales, ya vienen preparados en forma de polvos o granulaciones y cada uno de ellos tiene las indicaciones sobre la forma de hidratar y esterilizar. Estas indicaciones deben seguirse al pie de la letra para el adecuado funcionamiento de los mismos.

DISOLUCION.

Utilizar agua limpia desafiada o desmineralizada, con pH cercano al neutro.

Utilizar recipientes escrupulosamente limpios, libres de residuos de otras sustancias. El tamaño de los recipientes debe ser suficiente para permitir la agitación.

Agregar una tercera parte del agua con la que se va a disolver el medio de cultivo pesado. Agitar para disolver y agregar el resto del agua, desprendiendo las partículas adheridas a la pared del recipiente.

Todo tipo de medio es sensible al calentamiento, por eso no debe calentarse más de lo estrictamente necesario.

La completa disolución de un medio que contiene agar puede observarse cuando, al agitar no se adhiere a la pared interna del recipiente ninguna partícula de agar y la solución viscosa, resbala libremente.

Algunos medios muestran turbidez inevitable; procurar que ésta turbidez sea homogénea, distribuyendo lo mejor posible las partes insolubles.

AJUSTE DE pH.

Los medios comerciales muestran el valor de pH indicado en la etiqueta. Es recomendable comprobarlo y corregirlo en caso necesario.

La medición se hace después de esterilizar, con el adecuado ajuste de temperatura del aparato. Para medios de cultivo sólidos, medir a 45 - 50 °C y medios líquidos a temperatura ambiente.

La corrección se logra por adición de solución estéril (1N o 0.1 N) de HCl o NaOH a una muestra del medio estéril.

Con el volumen que se adicionó para la corrección del pH de la muestra, se calcula el volumen requerido para ajustar el pH del total de medio preparado.

ESTERILIZACION.

El medio debe distribuirse en los recipientes en los que va a emplearse en las diferentes técnicas, antes de esterilizarse. Si no viene indicada otra cosa, se esterilizan en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Para asegurar la esterilidad, se deja fluir el vapor, manteniendo la válvula abierta, durante el comienzo de la fase de calentamiento del autoclave.

Al término de la esterilización, deben sacarse los recipientes y enfriarlos rápidamente.

Las temperaturas más altas y calentamientos prolongados perjudican la calidad del medio de cultivo.

VERTIDO EN PLACAS.

Para evitar la formación de gotitas de condensación de agua en las tapas de las placas, debe vertirse el medio de cultivo a una temperatura de 45 - 55 °C.

Previamente remover bien el medio haciendo oscilar en sentido circular el recipiente.

Antes de sembrar las placas, puede socarse la superficie húmeda del agar en estufa a 30 - 40 °C colocando en forma invertida y algo destapadas las placas durante 20 a 30 minutos.

TUBOS DE AGAR INCLINADO.

El medio de cultivo estéril todavía líquido, se coloca en posición inclinada, formando una superficie de aproximadamente 3 cm. Se deja solidificar en esta posición.

MEDIOS DE CULTIVO ACIDOS.

El agar se hidroliza al ser calentado en medio ácido, disminuyendo la estabilidad del gel. Debe evitarse el calentamiento, pero si fuera necesario, se recomienda agregar 5 g/l de agar antes de disolver el medio.

CONSERVACION DE MEDIOS DE CULTIVO LISTOS PARA EL USO.

Los medios que contienen agar, no deben guardarse por debajo de 0 °C, pues se altera la estructura del gel. Es posible conservarlos por 1 a 2 semanas a temperatura ambiente, protegidos de la luz.

Las placas de petri preparadas, con el medio de cultivo, se conservan durante cierto tiempo, protegidas para evitar la deshidratación del medio de cultivo que contienen, precintando con cinta adhesiva su borde lateral para impedir fugas, o guardándolas empaquetadas en varias bolsas de plástico impermeables al aire.

Los medios de cultivo líquidos, en tubos o matraces, deben cerrarse con capuchones impermeables al aire.

La deshidratación provoca precipitados, cristalización y grietas en los medios preparados en placas. (12)

MEDIOS DE CULTIVO COMERCIALES

NOMBRE/ MARCAS	MERCK	BBL	DIFCO	OXOID
	art. no.	cat. no.	code	order code
Agar bilis rojo violeta	1406	11807	'0012	CM107
Agar citrato de Simmons	2501	11620	'0091	CM155
Agar lisina hierro	11640	11363	'0849	CM381
Agar papa dextrosa	10130	11550	'0013	CM139
Agar para métodos estándar	5463	11638	'0479	CM325
Agar Soya tripticasa	5458	11043	'0369	CM131
Agar sulfito de bismuto	5418	11031	'0073	CM201
Agar triple azúcar hierro	3915	11749	265	CM277
Agar Verde Brillante	7232	11073	'0285	CM263
Agar XLD	5287	11838	'0788	CM469
Base de agar Baird Parker	5406	11023	'0768	CM275
Caldo EC	10765	11187	'0314	-
Caldo RM - VP	5712	11383	'0016	CM43
Caldo BHI	10493	11059	'0037	CM225
Caldo lactosa	5412	11333	'0004	CM137
Caldo lactosa bilis verde brillante al 2%	5454	11080	'0007	CM31
Caldo lauril sulfato triptosa	10286	11338	'0241	CM143
Caldo selenito-cistina	7709	11608	'0878	CM699B
Caldo tetrationalo	5285	11706	'0104	CM29
Medio de SIM	5470	11528	'0271	CM435

tabla 1

PREPARACION DE LA MUESTRA.

Una vez registrada la muestra, se obtiene una alícuota representativa y homogénea para ser sometida al análisis.

Cuando las muestras no pueden incorporarse al medio de cultivo o contienen una carga microbiana elevada, requieren la preparación de diluciones.

Algunas de las muestras como coberturas de chocolate y los productos que contienen grasa, dificultan la dispersión homogénea de los microorganismos. por lo que en estos casos se recomienda que para realizar la primera dilución, el diluyente se caliente ligeramente (40 °C) en un baño María para lograr la distribución de la grasa y con ello la dispersión de los microorganismos.

Para obtener datos reproducibles en los análisis, al realizar las diluciones es necesario estandarizar la agitación que se realice. El número de diluciones que se vayan a preparar depende del número de microorganismos esperados en la muestra.

En muestras sólidas se requiere el uso de licuadora para homogeneizarlas, en caso de polvos y muestras solubles, puede utilizarse agitador magnético, para lo cual se introduce una barra magnética al frasco que contiene la solución diluyente, antes de esterilizarlo.

SOLUCION BUFFER DILUYENTE.

1. Solución Stock:	KH_2PO_4	34 g
	Agua destilada	500 ml

Ajustar el pH a 7,2 con NaOH 1N. Aforar con agua destilada a un litro. Esterilizar a 121 °C / 20 min.

Conservar en refrigeración.

2. Solución diluyente:	Solución diluyente Stock	1.25 ml
	Agua destilada	llevar a 1000 ml

Distribuir en frascos 90 ml y en tubos 9 ml de esta solución. Esterilizar a 121 °C / 20 min.

3. Solución diluyente para organismos xerotolerantes

Se requiere un diluyente con baja aw para recuperación de levaduras xerotolerantes.

Se recomienda una concentración de 50 % p/p de hexosa. (glucosa o fructosa)

PROCEDIMIENTO.

- *En condiciones de esterilidad, pesar 10 g de la muestra (10 ml) en un vaso de Ecuadora estéril, utilizando espátula, cuchara o pipeta estériles.*
- *Vaciar 90 ml de solución diluyente al vaso de Ecuadora que contiene la muestra.*
- *Licuar durante 1 minuto. Vaciar nuevamente el frasco de dilución. Esta es la primera dilución de la muestra (10^{-1}).*
- *Continuar las diluciones de la muestra. Tomar 1 ml de la primera dilución y transferirlo a un tubo que contenga 9 ml de solución diluyente estéril y agitar vigorosamente. Esta es la segunda dilución (10^{-2}) y así sucesivamente hasta obtener la última dilución deseada.*
- *Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera no debe ser menor del 10 % de la capacidad total de la pipeta.*
- *Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, vaciar en 3 segundos. Al inocular la caja, aplicar la punta de la pipeta al fondo y dejar escurrir. En una zona sin líquido aplicar la punta de la pipeta una sola vez y retirarla.*
- *Mientras se afora el líquido dentro de la pipeta, la punta debe aplicarse en el interior del cuello del frasco o tubo y mantenerse en forma vertical, inclinando el frasco o tubo, lo necesario.*
- *Para aspirar el líquido de las muestras con la pipeta, sumergirla lo menos posible.*
- *Cada tubo con diluyente inoculado debe agitarse de la misma manera: 25 movimientos de abajo hacia arriba en un arco de 30 cm. durante 7 segundos. (15)*

CUENTA DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS.

Las bacterias mesófilas aerobias son todas las bacterias capaces de desarrollarse en un medio nutritivo incubado de 20 a 37 °C en condiciones aerobias.

Medios de cultivo:

Agar para métodos estándar.

PROCEDIMIENTO.

- *Distribuir y marcar las cajas estériles en la mesa de trabajo.*
- *Preparar las diluciones necesarias de la muestra según sea el caso.*
- *Transferir en condiciones de esterilidad un ml de cada una de las diluciones a las cajas de petri..*
- *Agregar de 12 a 15 ml de medio de cultivo fundido y mantenido de 45 a 48 °C en baño de agua. Incorporar la muestra al medio de cultivo efectuando 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 de atrás a adelante; sobre una superficie lisa y cuidando que el medio no moje la cubierta de la caja.*
- *Dejar solidificar el agar. Preparar testigos del medio en cajas sin inóculo.*
- *Invertir las cajas e introducir las a la estufa de incubación a 35 °C durante 48 horas.*
- *Seleccionar las cajas donde aparezcan entre 30 a 300 colonias para obtener menor error en el recuento.*
- *Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de hongos), incluyendo las colonias puntiformes. Distinguir las colonias de pequeñas partículas de alimento.*
- *Multiplicar el número de colonias por el inverso de la dilución.*
- *Redondear la cifra obtenida en el recuento a dos dígitos significativos.*
- *Reportar como UFC (unidades formadoras de colonias) mesófilas aerobias, por gramo o mililitro de muestra.*

(15)

CUENTA DE COLIFORMES TOTALES.

Bacterias gram negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a 35 °C a las 24 o 48 horas de incubación. Su recuento puede realizarse mediante el uso de medio sólido selectivo en placa o en tubos de fermentación por la técnica de Número mas probable.

Para decidir entre ambas técnicas, es necesario considerar el número de bacterias que se espera encontrar, además de la composición y naturaleza de la muestra.

Medios de cultivo:

Caldo lauril sulfato triptosa. En tubos de ensayo de 20 X 150 mm. con 10 ml de medio estéril y campana de fermentación.

Caldo lactosa biñis verde brillante. En tubos de ensayo de 20 X 150 mm. con 10 ml de medio estéril y campana de fermentación.

Agar biñis rojo violeta.

PROCEDIMIENTO:

RECuento EN TUBO

- *Distribuir y marcar los tubos con caldo lauril sulfato triptosa, tres tubos para cada dilución.*
- *Preparar las diluciones de la muestra.*

PRUEBA PRESUNTIVA:

- *Inocular 1 ml por dilución a cada uno de los tres tubos con caldo lauril sulfato triptosa.*
- *Incubar los tubos a 35 °C por 48 horas.*
- *Observar la presencia de gas a las 24 y 48 horas. Cualquier cantidad hace positiva la prueba.*

PRUEBA CONFIRMATIVA:

- Agitar suavemente los tubos positivos y transferir 3 asadas de cada tubo con gas a un tubo con caldo lactosa biñs verde brillante. Al introducir el asa, evitar la pelcula que se hubiera formado, inclinndo el tubo con cultivo de la prueba presuntiva.
- Incubar los tubos a 35°C por 48 horas.
- Observar la presencia de gas a las 24 y 48 horas. Contar los tubos positivos y anotar las diluciones correspondientes.
- Consultar la tabla para número mas probable y reportar NMP de coliformes totales por gramo o mililitro de muestra.

CUENTA EN PLACA.

- Distribuir y marcar las cajas estériles en la mesa de trabajo.
- Preparar las diluciones necesarias de la muestra según sea el caso.
- Transferir en condiciones de esterilidad un ml de cada una de las diluciones a las cajas de petri.
- Agregar de 12 a 15 ml de medio de cultivo (agar biñs rojo violeta) fundido y mantenido de 45 a 48 °C en baño de agua. Incorporar la muestra al medio de cultivo. Dejar solidificar sobre una superficie plana y horizontal y agregar 4 ml del mismo medio extendiéndolo para cubrir completamente la superficie.
- Dejar solidificar e incubar las cajas en posición invertida 24 horas a 35°C.
- Contar las colonias de color rojo oscuro, con halo de precipitación rojo o rosa y diámetro de 0.5 mm. o mayor.
- Confirmar las colonias dudosas desarrolladas de los diferentes productos, inoculando individualmente en un tubo de fermentación con caldo lactosa biñs verde brillante.
- Confirmar las colonias por observación al microscopio si se requiere.
- Multiplicar el número de colonias desarrolladas por el inverso de la dilución.
- Reportar como UFC, de coliformes totales por gramo o mililitro de muestra.

(15)

CUENTA DE COLIFORMES FECALES.

Bacterias gram negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a 44.5 °C en 48 horas de incubación.

Medios de cultivo:

Caldo lauril sulfato triptosa. En tubos de ensayo de 20 X 150 mm. con 10 ml de medio estéril y campana de fermentación.

Caldo EC. En tubos de ensayo de 20 X 150 mm. con 10 ml de medio estéril y campana de fermentación.

PROCEDIMIENTO.

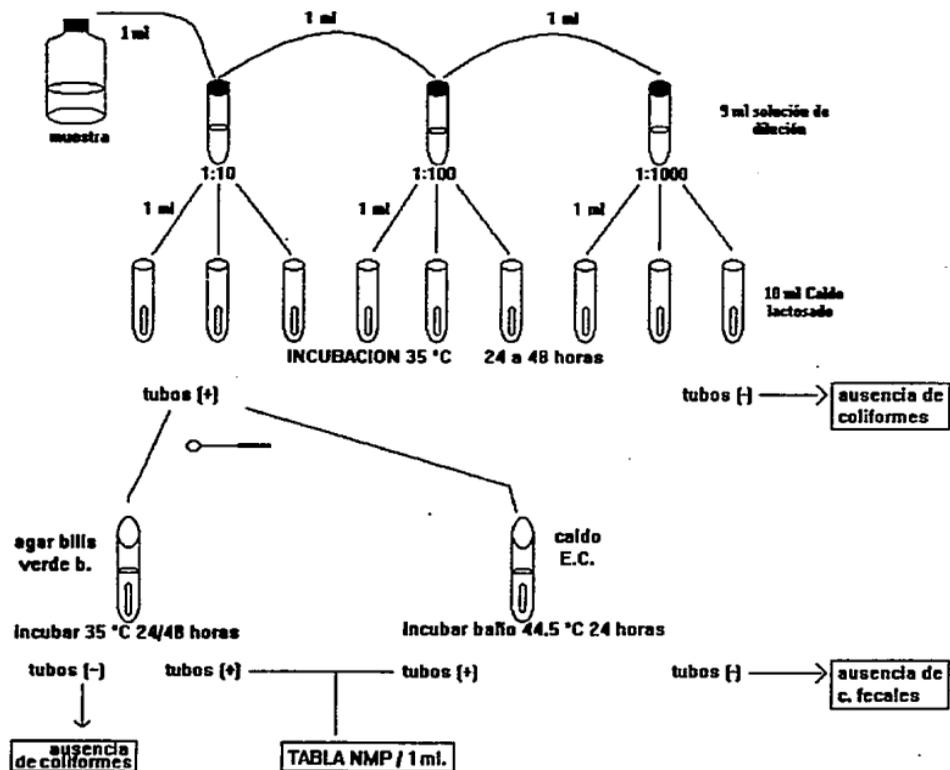
- *Preparar tubos de ensayo con tapón de rosca (20 X 150) y campana de fermentación con 10 ml de Caldo lauril sulfato triptosa y otros con 10 ml de Caldo EC.*
- *Distribuir y marcar los tubos con caldo lauril sulfato triptosa, tres tubos para cada dilución.*
- *Preparar las diluciones de la muestra.*

PRUEBA PRESUNTIVA:

- *Inocular 1 ml por dilución a cada uno de los tres tubos con caldo lauril sulfato triptosa.*
- *Incubar los tubos a 35 °C por 48 horas.*
- *Observar la presencia de gas a las 24 y 48 horas. Cualquier cantidad de gas hace positiva la prueba.*

PRUEBA CONFIRMATORIA:

- *Agitar suavemente los tubos con producción de gas.*
- *Transferir 3 asedades de cada tubo con gas a un tubo con caldo EC.*
- *Incubar los tubos con caldo EC a 44.5 °C en un baño de agua. Controlar la temperatura ± 0.5 °C*
- *Observar la presencia de gas en los tubos a las 24 y 48 horas.*
- *Contar los tubos positivos y anotar las diluciones.*
- *Consultar la tabla para número mas probable y reportar NMP de coliformes fecales por gramo o mililitro de muestra. (15)*



COLIFORMES TOTALES Y FECALES

NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS.

Tubos Inoculados: 3 con 1 ml dilución 1:10 = 0.1 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:100 = 0.01 g muestra
 3 con 1 ml dilución 1:1000 = 0.001 g muestra

Tubos 3 '(0.1)	positivos 3 '(0.01)	3 '(0.001)	NMP /g	Tubos 3 '(0.1)	positivos 3 '(0.01)	3 '(0.001)	NMP /g
0	0	0	< 3	2	0	0	9
0	0	1	3	2	0	1	14
0	0	2	6	2	0	2	20
0	0	3	9	2	0	3	26
0	1	0	3	2	1	0	15
0	1	1	6	2	1	1	20
0	1	2	9	2	1	2	27
0	1	3	12	2	1	3	34
0	2	0	6	2	2	0	21
0	2	1	9	2	2	1	28
0	2	2	12	2	2	2	35
0	2	3	16	2	2	3	42
0	3	0	9	2	3	0	29
0	3	1	13	2	3	1	36
0	3	2	16	2	3	2	44
0	3	3	19	2	3	3	53
1	0	0	4	3	0	0	23
1	0	1	7	3	0	1	39
1	0	2	11	3	0	2	64
1	0	3	15	3	0	3	95
1	1	0	7	3	1	0	43
1	1	1	11	3	1	1	75
1	1	2	15	3	1	2	120
1	1	3	19	3	1	3	160
1	2	0	11	3	2	0	93
1	2	1	15	3	2	1	150
1	2	2	20	3	2	2	210
1	2	3	24	3	2	3	290
1	3	0	16	3	3	0	240
1	3	1	20	3	3	1	460
1	3	2	24	3	3	2	1 100
1	3	3	29	3	3	3	>2 400

table 2

CUENTA DE HONGOS Y LEVADURAS.

Los hongos son organismos que poseen núcleo verdadero, carecen de clorofila, se reproducen sexual o asexualmente por esporas y pueden tener forma multicelular filamentosa o ser células individuales en gemación. La prueba no se aplica a todos los alimentos, sólo a los relacionados con prácticas sanitarias deficientes en la producción y almacenamiento.

Medios de cultivo:

Agar papa dextrosa estéril, acidificado con ácido tartárico al 10% hasta obtener un pH de 3.5

Mantener a 45 ± 1 °C. Una vez acidificado no debe calentarse el medio.

PROCEDIMIENTO.

- Distribuir y marcar las cajas estériles en la mesa de trabajo.
- Preparar las diluciones necesarias de la muestra, según sea el caso.
- Transferir en condiciones de esterilidad un ml de cada una de las diluciones a las cajas de Petri por duplicado.
- Agregar de 12 a 15 ml de medio de cultivo fundido acidificado y mantenido a 45 °C. Incorporar la muestra al medio efectuando los movimientos antes descritos.
- Dejar solidificar el agar. Preparar testigos del medio y del ambiente en cajas sin inóculo.
- Invertir las cajas e incubar una serie a 35 °C durante 48 horas y la otra serie a 25 °C durante 5 días.
- Seleccionar las cajas donde puedan contarse las colonias desarrolladas, con menor error.
- Contar las colonias desarrolladas en las cajas incubadas a 35 °C.
- Contar las colonias desarrolladas en la serie incubada a 25 °C a los 3 y 5 días, ya que el crecimiento excesivo de algunos hongos puede invadir toda la caja.

No abrir nunca una caja con desarrollo de hongos, para evitar la dispersión y contaminación de esporas.

- Multiplicar el número de colonias desarrolladas por el inverso de la dilución y reportar como UFC de hongos o levaduras por gramo o mililitro de muestra. (15)

HONGOS Y LEVADURAS XEROTOLERANTES.

La mayoría de los medios microbiológicos para el análisis de productos de confitería son los mismos que para los alimentos en general. Sin embargo, los hongos y levaduras xerotolerantes requieren de alta concentración de azúcar en diluyentes y en el medio de cultivo, para evitar el shock osmótico.

El uso de 10 a 20 % de sacarosa en diluyentes no es suficiente. Se requiere de una concentración de 35 y 50 % de hexosa. Los azúcares utilizados son glucosa y fructuosa. (17)

PROCEDIMIENTO.

*Para identificar hongos y levaduras xerotolerantes, preparar medios de cultivo líquidos y sólidos. *Ver tabla.3*

Medio líquido:

Para probar los límites de xerotolerancia para levaduras.

Inocular en un caldo que contenga de 35 a 50 % en peso de hexosa.

Incubar a 30 °C y observar el desarrollo.

Del crecimiento de este cultivo, inocular un caldo que contenga 50, 55, 60, 65 y 70 % de fructuosa.

El desarrollo de los microorganismos en alguno de estos tubos que proviene del inóculo a 35 ó 50 % demuestra que son xerotolerantes.

Medio sólido:

El mejor medio sólido para microorganismos xerotolerantes es el Agar extracto de malta, extracto de levadura con 40% de glucosa. El tiempo de incubación depende de la aw del medio. Una incubación prolongada puede ser necesaria, siempre y cuando el medio no se deshidrate.

Incubar para hongos de 20 a 25 °C y para levaduras a 30 °C

Observar el desarrollo para establecer tiempos de incubación.

Esterilización de los medios de cultivo con alta concentración de azúcar:

El sobrecalentamiento del medio, puede hacerlo menos eficiente, posiblemente debido a la producción de furfural y sus derivados que inhiben a las levaduras. Se recomienda utilizar vapor por 30 minutos o calentamiento a 100 °C por 30 minutos, aunque las temperaturas alcanzadas dependerán del volumen y otros factores.

El calentamiento a 100 °C por 5 minutos destruye todos los microorganismos excepto las esporas bacterianas, aunque estas son incapaces de crecer a concentración mayor de 60 % de fructuosa. (17)

COMPOSICIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA HONGOS Y LEVADURAS XEROTOLERANTES.

Ingredientes	MEA	YEP	MY40G	MY60G	MPE	MOS
Ext. malte (g)	20		12	8	15	
Ext. levadura (g)		10	3	2		5
Peptona (g)		10			0.78	
Glucosa (g)	A.R.	A.R.	400	600	450	
Fructuosa (g)		A.R.				600
Agar (g)	20	20-30	12	8	15	25
Agua (ml)	1000	1000	600	400	1000	370
% azúcar	p/v	p/v	p/p	p/p	p/p	p/p
calentamiento	autoclave		vapor	vapor		100 °C
tiempo			30 min	30 min		30 min
pH final			5.5			

A.R. según se requiera la concentración de hexosa.

p/v concentración peso/volumen.

p/p concentración peso/peso.

(17)

tabla 3

CUENTA DE *Staphylococcus aureus*.

El agar Baird Parker se utiliza para el aislamiento selectivo y enumeración de estafilococos coagulasa positivos a partir de los alimentos, piel, suelo, aire y otros.

Se recurre a las pruebas de coagulasa y termonucleasa para identificar indirectamente la toxigenicidad de las cepas, ya que estas pruebas son más sencillas de realizar que la búsqueda de la enterotoxina.

Medios de cultivo y reactivos.

Base de agar Baird Parker.

Caldo BHI. En tubos de ensayo (12 X 75 mm.) con 0.2 ml de medio estéril.

Telurito de potasio al 1% estéril

Solución salina al 0.85 % estéril

Yema de huevo extraída asépticamente.

Plasma de conejo diluido 1:1 con solución salina estéril.

Preparación de la emulsión de yema:

Lavar con agua y jabón los huevos frescos que sean necesarios, desinfectarlos con tintura de yodo. Abrirlos en campana de flujo laminar o en área estéril y vaciarlos en un separador de claras estéril. Transferir las yemas en una probeta estéril hasta medir un volumen de 60 ml y completar a un volumen de 90 ml con solución salina estéril. Transferir a un matraz con perlas de vidrio y agitar para formar la emulsión. Filtrar a través de gasa.

Preparación del agar Baird Parker completo.

A partir de un litro de base de agar Baird Parker estéril, mantenido a 45 ° - 50 °C.

Agregar 10 ml de telurito de potasio al 1% y 90 ml de emulsión de yema de huevo. Se agita suavemente y se vierte en cajas de Petri estériles dejando solidificar con las cajas parcialmente destapadas, en campana de flujo laminar o en área estéril.

El medio debe utilizarse dentro de las 24 horas posteriores a su preparación.

PROCEDIMIENTO.

- Marcar las cajas de agar Baird Parker.
- Preparar las diluciones necesarias de la muestra según sea el caso.
- Transferir en condiciones de esterilidad 0.1 ml de cada una de las diluciones a las cajas de Baird Parker y con ayuda de una varilla estéril realizar la dispersión del inóculo en toda la superficie de la caja. Utilizar una varilla diferente para cada dilución.
- Incubar las cajas en forma invertida a 35 °C durante 48 horas.
- Seleccionar la caja que contenga entre 50 y 150 colonias.
- Contar solamente las colonias negras, brillantes, con o sin ligero borde blanco, rodeadas por una zona clara en el fondo del medio opaco, que es la morfología típica de *S. aureus* en el medio de Baird Parker.
- Seleccionar las colonias típicas para realizar la prueba de coagulasa según el siguiente cuadro:

colonias típicas en una placa	colonias que deben probarse por coagulasa
menos de 50	3
51 - 100	5
101 - 150	7

- Sembrar cada colonia por probar en 0.2 ml de caldo BHI. Sembrar un testigo positivo y un negativo.
- Incubar los tubos de BHI a 35 °C durante 24 horas.
- Agregar a cada tubo con desarrollo 0.2 ml de plasma de conejo diluido volumen a volumen con solución salina estéril.
- Incubar en baño de agua a 35 °C por 6 horas. Observar cada hora.
- Considerar positiva la prueba de coagulasa cuando el tubo se invierte y el coágulo no se desprende del tubo o el coágulo se desplaza en el tubo pero no desaparece con el movimiento.
- Reportar el contenido de microorganismos en la muestra, tomando en cuenta el número de colonias seleccionadas, el número de colonias típicas en la placa, la dilución elegida y el volumen inoculado en la placa como en el siguiente ejemplo:

colonias seleccionadas = 5 — 3 positivas
colonias típicas = 67 — X X = 40 colonias positivas

volumen inoculado = 0.1 ml de la dilución 10^{-3}

$$40 \times 10 \times 1000 = 400,000$$

Reportar: Staphylococcus aureus coagulasa positivo 400,000 UFC / g.

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

(15)

PRESENCIA DE Salmonella sp.

La contaminación con salmonella va acompañada de otras enterobacterias que pueden llegar a inhibirla. En los alimentos procesados, si llegan a estar presentes, se encuentran mermadas debido a la desecación, calentamiento u otros tratamientos de elaboración del producto.

Se describe una técnica de tipo general, aunque se encuentren gran diversidad de medios de cultivo y técnicas de preenriquecimiento y enriquecimiento que disminuyen el tiempo de realización.

Medios de cultivo y reactivos:

Caldo lactosa. En matraces Erlenmeyer de 500 ml con 225 ml de medio estéril.

Caldo selenito. En tubos de ensayo (20 X 150 mm.) con 10 ml de medio estéril.

Caldo tetrationato. En tubos de ensayo (20 X 150 mm.) con 10 ml de medio estéril.

Agar XLD (xilosa, lisina, desoxicolato). Preparado en cajas de petri.

Agar sulfito de bismuto. Preparado en cajas de petri.

Agar verde brillante. Preparado en cajas de petri.

Agar soya triplicase. Preparado en cajas de petri.

Agar TSI (triple azúcar, hierro). En tubos de ensayo (13 X 100 mm.) con 3 ml de medio estéril, inclinado.

Agar LI (lisina, hierro). En tubos de ensayo (13 X 100 mm.) con 3 ml de medio estéril, inclinado

Medio de SIM En tubos de ensayo (13 X 100 mm.) con 3 ml de medio estéril.

Caldo glucosa (RM - VP). En tubos de ensayo (13 X 100 mm.) con 3 ml de medio estéril.

Agar citrato de Simmons. En tubos de ensayo (13 X 100 mm.) con 3 ml de medio estéril, inclinado..

Solución de yodo / yoduro de potasio (6.0 g de cristales de yodo + 6.0 g de KI disolver en 20 ml de agua).

Solución de verde brillante 0.1 %

Solución de Rojo de metilo al 0.4 %

Solución de α - naftol al 5 %

Solución de KOH al 40 %

Reactivo de Kovac

PROCEDIMIENTO:

PREENRIQUECIMIENTO.

Preparar matraces Erlenmeyer de 500 ml con 225 ml de medio de preenriquecimiento.

Para leche entera y descremada en polvo, utilizar agua destilada adicionando 0.45 ml. de una solución de verde brillante.

Para productos de confitería, coberturas y chocolates, utilizar leche descremada y reconstituida (100 g de leche en polvo con un litro de agua destilada), adicionando 0.45 ml de solución v. brillante al 1 %.

Para alimentos en general, utilizar caldo lactosa.

- Pesar 25 g de alimento ó 25 ml y homogeneizar con 225 ml de caldo de preenriquecimiento. Licuar si es necesario.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas.

AISLAMIENTO.

- Agitar el cultivo anterior y por medio de un asa, sembrar sobre la superficie de por lo menos dos cajas de medio selectivo diferencial, por cada tubo, a manera de obtener colonias bien aisladas.

Los medios utilizados pueden ser: Agar verde brillante, Agar sulfito de bismuto, Agar XLD.

- Incubar a 35 °C 24 horas y observar el desarrollo para identificar colonias sospechosas de Salmonella:

CARACTERÍSTICAS DE LAS COLONIAS:

Agar verde brillante.

Colonias de color rojo o rosa, rodeadas de medio rojo.

Agar sulfito de bismuto.

Colonias negras con o sin brillo metálico, rodeadas de un halo café, que posteriormente se torna negro. Las colonias pueden ser café.

Agar XLD.

Colonias de color rojo translúcidas, generalmente con centro negro por producción de H₂S.

- Pesar de una colonia aislada y típica de cada caja por estría a una caja con agar soya triplicase.
- Incubar a 35 °C durante 24 horas y proceder a la identificación bioquímica.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA.

Seleccionar al menos 2 colonias bien aisladas de cada placa. Picar una sola vez cada colonia y transferirla a un tubo de agar TSI y a otro de agar LI, sembrando por picadura y eslría.

Incubar a 35 °C durante 24 horas el agar TSI y a 35 °C durante 48 horas el agar LI.

Oblener los resultados de estas pruebas por las siguientes reacciones:

Agar TSI.

S. typhi : rojo en la superficie (alcalino), amarillo el fondo (ácido), precipitado negro y producción de gas en ocasiones.

Otras Salmonellas : rojo en la superficie, amarillo en el fondo, producción de gas y precipitado negro (H₂S).

Agar LI.

S. typhi : superficie y fondo púrpura (alcalino), precipitado negro y producción de gas en ocasiones.

S. enteritidis : superficie púrpura, fondo amarillo (ácido), con o sin producción de gas y precipitado negro.

Otras Salmonellas : superficie púrpura, fondo púrpura o gris (neutro), precipitado negro en ocasiones.

Observar al microscopio por tinción de gram.

Al mismo tiempo transferir de una colonia aislada, picando una sola vez la colonia para una serie de tubos que contienen los siguientes medios:

Medio de SIM .

Inocular por picadura. Incubar 24 horas a 35 °C.

1) Movilidad.

Prueba positiva: crecimiento a lo largo de la picadura y en el seno del medio de cultivo.

Prueba negativa: crecimiento a lo largo de la picadura exclusivamente.

2) Producción de H₂S:

Prueba positiva: aparición de color negro a lo largo de la picadura que puede extenderse a todo el medio.

Prueba negativa: ausencia de color negro.

3). Producción de Indol:

Adicionar al tubo que presente crecimiento, 0.2 ml del reactivo de Kovac.

Prueba positiva: aparición de color rojo.

Prueba negativa: no hay aparición de color.

Caldo RM - VP.

Inocular e incubar 48 horas a 35 °C para la prueba VP y 96 horas para la prueba RM.

1) Prueba de Vogues - Proskauer (VP).

Transferir a un tubo estéril, 1 ml del cultivo de 48 horas.

Adicionar 0.6 ml de solución de α - naftol.

Adicionar 0.2 ml de solución de KOH al 40 %

Observar dentro de las 4 horas siguientes.

Prueba positiva: desarrollo de color rosa.

Prueba negativa: no hay desarrollo de color.

2) Prueba de Rojo de Metilo (RM)

Transferir a un tubo estéril, 2 ml del cultivo de 96 horas.

Adicionar 2 a 3 gotas de solución de rojo de metilo.

Observar los resultados inmediatamente.

Prueba positiva: color rojo.

Prueba negativa: color amarillo.

Agar Citrato de Simmons.

Semrar por picadura y estría. Incubar 96 horas a 35 °C.

Prueba positiva: indicada por el crecimiento, acompañada por un cambio de color de verde a azul.

Caldo Sarraco.

Inocular e incubar a 35 °C durante 24 horas.

1) Fermentación de la Sacarosa:

Prueba positiva: color amarillo.

Prueba negativa: no hay cambio de color

2) Ureasa:

Prueba positiva: color violeta.

Prueba negativa: no hay cambio de color.

Caldo Manitol.

Inocular e incubar a 35 °C durante 48 horas

Prueba positiva: color amarillo.

Prueba negativa: no hay cambio de color.

Consultar los resultados obtenidos en la tabla, para la identificación de los géneros de las bacterias probadas:

(15, 17)

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE AMBIENTE Y FLUJOS DE AIRE.

Considerados como una fuente de contaminación el ambiente y los flujos de aire se investigan para determinar la presencia de hongos y levaduras principalmente que dañan a los productos.

TECNICA DE SEDIMENTACION EN PLACA.

Medios de cultivo.

Agar papa dextrosa acidificado, estéril y preparado en cajas de petri de plástico.

Agar cuenta estándar. Preparado en cajas de petri de plástico.

PROCEDIMIENTO.

La técnica consiste en la exposición de la superficie del agar en las cajas de cultivo al medio ambiente, durante un tiempo determinado.

Se requiere establecer una guía en relación al número y tipo de microorganismos por volumen de aire o área de exposición para niveles críticos de contaminación. De la misma forma se requiere establecer tiempos de exposición y zonas de muestreo para la obtención de datos que nos indiquen la fuentes de contaminación de los productos.

Se proponen las siguientes zonas de muestreo:

- 1. Áreas de proceso, sin flujos de aire (en las diferentes líneas de producción).*
- 2. Túneles de enfriamiento, con flujo de aire.*
- 3. Ductos de aire de secado, con flujo de aire.*
- 4. Área de almidón (desmoldeo y depositado) sin flujo de aire.*

Tiempo de exposición de las cajas de cultivo.

De acuerdo a la zona de muestreo, dependiendo del flujo de aire.

En las diferentes líneas de producción, seleccionar un espacio sin flujo de aire y a la altura del equipo de transporte del producto. Colocar una base firme y exponer abiertas, durante 10 o 15 minutos las cajas de cultivo bien identificadas.

En los túneles de enfriamiento, exponer durante el recorrido normal de un producto y asegurar las cajas a la banda, colocando cinta adhesiva por la base.

En sistemas de aire de secado de producto con flujo constante de aire, sostener la base de la caja de cultivo abierta, con una mano y exponer a la altura del producto, directamente recibiendo el flujo de aire, durante 1 minuto.

En el área de almídon, exponer abiertas las cajas de cultivo, durante 10 o 15 minutos.

(17. 13)

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE MAQUINARIA Y EQUIPO.

Se investigan principalmente las superficies en contacto con el producto, para determinar fuentes de contaminación así como eficiencia de limpieza y sanitización. Entre los métodos de análisis de superficies se encuentra el de recogida de inóculo con torundas y siembra mediante dilución o directamente en agar. El sistema a usar para la toma de muestra depende del tipo de superficie, la contaminación y el objetivo del análisis.

Medios de cultivo.

Agar papa dextrosa acidificado, estéril, preparado en cajas petri desechables.

Agar cuenta estándar, estéril, preparado en cajas de petri desechables.

Agar bñe rojo violeta, estéril, preparado en cajas de petri desechables.

Materia para la toma de muestra:

Hisopos de madera estériles, en tubos o frascos de vidrio con tapón de rosca.

Plantillas de papel Kraft de 10 cm. estériles, recortando al centro un cuadro de 5 cm. de lado.

Tubos de ensayo (20 X 150 mm.) con 10 ml de solución de dilución estéril.

PROCEDIMIENTO.

Tomar el hisopo por el extremo de madera y humedecer con la solución de dilución del primer tubo marcado con la identificación del lugar de muestreo.

En superficies pequeñas, de una unidad, como un molde o una boquilla, frotar con el hisopo toda el área expuesta, girando el hisopo.

En superficies grandes, como bandas, tanques, etc., colocar una plantilla estéril, tocando solamente los bordes externos. Con el hisopo húmedo, frotar la superficie delimitada por el cuadro interno de la plantilla, girando el hisopo.

Colocar el hisopo dentro del tubo marcado con el lugar donde se tomó la muestra trozando el extremo por el cual fue sostenido con la mano. Cerrar perfectamente el tubo y llevar al laboratorio.

En área estéril, colocar 0.1 ml de la muestra en cada una de las cajas, con los diferentes medios de cultivo preparados.

Con un extensor de vidrio estéril, distribuir la muestra por la superficie de la placa, dejar secar e incubar en posición invertida de acuerdo a los organismos que se buscan.

Agar papa dextrosa a 30 °C durante 3 a 5 días.

Agar cuenta estándar y agar biñis rojo violeta a 35 °C durante 24 horas.

Contar las colonias desarrolladas en las placas de cultivo.

Reportar UFC por área expuesta o en 25 cm.² si se usa la plantilla.

(2, 13)

5. HIGIENE.

Las prácticas adecuadas de higiene y seguridad en el manejo de los productos, reducen significativamente el riesgo de contaminación.

Toda persona que entre en contacto con materias primas, ingredientes y material de empaque, producto en proceso y producto terminado, equipo y utensilios, deberá seguir las indicaciones de higiene que le correspondan. (16)

Indicaciones generales de importancia en el control microbiológico de los productos en la Industria de Confeitería y Chocolates:

Con referencia al personal.

- 1. Usar ropa limpia.*
- 2. Lavarse las manos y sanitizarse antes de iniciar el trabajo, después de cada ausencia del mismo y en cualquier momento cuando las manos puedan estar sucias o contaminadas.*
- 3. Utilizar cubreboca.*
- 4. Mantener las uñas cortas, limpias y libres de pintura.*
- 5. Evitar contaminación con cosméticos (crema, loción, perfume, etc.)*
- 6. Usar protección que cubra totalmente el cabello, barba y bigotes si los hay.*
- 7. Fumar, mascar, comer o beber sólo en áreas destinadas para hacerlo. (comedor)*
- 8. Se prohíben dulces, chicles y otros objetos en la boca durante el trabajo, ya que estos pueden caer al producto en proceso.*
- 9. Se prohíbe estrictamente escupir en el área de proceso.*
- 10. Mantener como norma que los empleados se presenten aseados diariamente.*
- 11. Cubrir apropiadamente con un material impermeable, cortadas o heridas, antes de entrar al área de proceso.*
- 12. Evitar que personas con enfermedades contagiosas laboren en contacto con los productos.*
- 13. Evitar toser y estornudar sobre el producto. (Uso obligatorio del cubreboca).*

Con referencia al equipo.

Todos los equipos y utensilios empleados en la elaboración y manejo de los productos, deben ser de material que no transmita sustancias tóxicas, olores, ni sabores, no absorbentes y resistentes a la corrosión, capaz de resistir repetidas operaciones de limpieza y desinfección. Evitar el uso de madera y otros materiales que no puedan limpiarse y desinfectarse adecuadamente.

- 1. Las superficies habrán de ser lisas y no tener hoyos y grietas.*
- 2. Las partes externas de los equipos que no entran en contacto con los productos, deben estar limpias, sin muestras de derrames.*
- 3. Los equipos no deben tener tornillos, tuercas, remaches o partes móviles que puedan caer accidentalmente al producto.*
- 3. El interior del equipo para el manejo y elaboración de los productos, debe ser revisado por la existencia de bordes y grietas que pueden acumular residuos de alimentos por largo tiempo. Prevenir la limpieza adecuada.*
- 4. Cuando el equipo se deja mojado pueden proliferar microorganismos en la capa de humedad, por ello es importante secar el equipo cuanto antes con materiales absorbentes que deben usarse una sola vez.*
- 5. El equipo que inevitablemente quede mojado durante un período de tiempo en el que puedan desarrollarse microorganismos, debe sanitizarse nuevamente antes de usarse.*
- 6. Las partes de los equipos que no entran en contacto directo con los productos, también deben mantenerse limpias.*

Con referencia a los insumos y otros.

Las materias primas deben estar separadas de los materiales ya procesados, para evitar una recontaminación.

Deben inspeccionarse y aprobarse para ser utilizadas por el Departamento de Calidad.

Los materiales de empaque deben estar protegidos del polvo y partículas del aire.

No debe haber tránsito de personal y materiales que no correspondan al área de proceso.

(16)

6. CONCLUSIONES.

El control microbiológico de los productos confitados, de chocolate y derivados, requiere de la consideración de varios aspectos .

Entre los aspectos más importantes de considerar se encuentran sus características intrínsecas como pH, humedad y contenido de elementos nutritivos. De esta manera, es posible predecir la calidad y seguridad ofrecida al consumidor.

De la misma forma, los factores externos como: temperatura de almacenamiento, humedad relativa y presencia o ausencia de oxígeno, ayudan a inhibir el desarrollo de los microorganismos.

La conservación de los materiales y producto terminado en áreas de humedad relativa alta, altera su contenido acuoso y permite la presencia de microorganismos.

Aunque estos productos no suelen dar lugar a intoxicaciones alimentarias, es importante considerar la posible contaminación de salmonella a partir de cocoa, leche y productos lácteos.

La elevada concentración de azúcar hace que el agua contenida no pueda ser utilizada por los microorganismos, aunque algunas levaduras y hongos pueden crecer en presencia de hasta 60% de azúcar.

El control microbiológico de los insumos y el ambiente de las zonas de proceso, reducirá considerablemente el riesgo de contaminación de los productos, así como el mantener siempre limpias y libres de materias extrañas estas áreas.

Existen normas y reglamentos de higiene, para la industria de elaboración de alimentos en los que se encuentran todos los aspectos importantes generales que deben vigilarse.

En cuanto a las técnicas, con frecuencia se ofrecen nuevos equipos que reducen el tiempo y aseguran resultados confiables, la mayoría de las veces realizables por personal no especializado. Estos equipos y pruebas deben ser comparados siempre con las técnicas oficiales establecidas antes de ser aplicadas .

BIBLIOGRAFIA.

1. *American Public Health Association, A.W.W.A., W.P.C.F. 1992. Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 17ª Edición. Díaz de Santos, S.A., Madrid. (España). 9-28, 9-29.*
2. *Bannart, George. J. 1989. Basic Food Microbiology. An Avi Book. N.Y. 16, 17, 169, 173, 178, 182, 188, 372, 740.*
3. *Biotest Diagnostics. Detector Ambiental Centrifugo. Laboratorios de Productos Biológicos HYLE S.A. de C.V.*
4. *Campbell, R. 1987. Ecología Microbiana. Limusa, México. 208.*
5. *Colón, M.L., Josefina, M. 1993 Manual de Microbiología de Alimentos. Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Subdirección de Nutrición Experimental y Ciencia de los Alimentos. Dept. Ciencia y Tecnología de los Alimentos., México. 6-B, 19, 23, 30, 43.*
6. *Frazier, W.C. 1978. Microbiología de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza (España). 174, 284.*
7. *Grant, W. D., Long, P.E. 1989. Microbiología Ambiental. Ed. Acribia. Zaragoza (España).*
8. *ICMSF. 1980. Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. 1. Factores que afectan a la supervivencia de los Microorganismos en los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza (España). 243, 245, 260, 264, 268.*
9. *ICMSF. 1980. Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. 2. Productos alimenticios. Ed. Acribia. Zaragoza (España). 787, 824, 825.*
10. *Jay, J.M. 1981. Microbiología Moderna de los Alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza (España). 39, 40, 95, 111, 112, 413-418.*
11. *Journal Bacteriology. 1958 76: 471-484.*
12. *Manual de Medios de Cultivo. Merck. 1990. 5-10, 328-343.*
13. *Métodos de Análisis Microbiológicos. Organización Bimbo. Dirección de Producción. 1993.*
14. *Método General de Investigación de Salmonella en Alimentos. Dirección General de Normas. NOM. F - 304 - 1977. México. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.*

15. *Secretaría de Salubridad y Asistencia. 1979*
Técnicas generales para análisis microbiológico de alimentos.
Dirección General de Laboratorios de Salud Pública.
México. 12-14, 17-25, 33-68.
16. *Secretaría de Salud. 1992*
Manual de buenas prácticas de higiene y sanidad.
Secretaría de regulación y fomento sanitario.
Dirección general de control sanitario de bienes y servicios.
17. *Speck, Marvin. L. 1984*
Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.
APHA. Washington, D.C. 55-57, 66-71, 302, 303, 702-713.
18. *Tatcher, F. S., Clark, D. S. 1973.*
Análisis Microbiológico de los Alimentos.
Ed. Acribia. Zaragoza (España). 69.
19. *Technical Report 2, 1987*
Micotoxin. Neogen Corporation. Michigan. 1,2
20. *Zinsser, Hans. 1960*
Bacteriología.
UTHEA, México. 132-134.