



Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua  
León, Nicaragua, C. A.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
ESCUELA DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL FUNCIONAMIENTO  
DEL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO E HIGIENE DE LOS ALIMENTOS  
DE LA E.A.V.S.

MONOGRAFIA PRESENTADA POR: VICTORIA MENA PINELL

PREVIO PARA OPTAR EL TITULO DE:  
"LICENCIADO EN TECNOLOGIA DE ALIMENTOS"

TUTOR: LIC. IRMA CONTRERAS DE CUADRA

LEON, NICARAGUA, C.A. 1994



W  
42  
M534m  
1994  
c.2.



W  
42  
M534m  
1994

155.557  
C.2

OPINION DEL TUTOR

El presente trabajo consistió en la elaboración del Manual de Procedimiento del Laboratorio de Microbiología e Higiene de Planta, de la Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco, situada en el Km.105 de la carretera Panamericana.

El manual consiste en un documento obligatorio de la empresa, el cual contiene las normas y procedimientos del trabajo diario en el proceso productivo de vegetales, por lo tanto, permite disponer de una guía exclusiva de referencia, para la aplicación de métodos de análisis e interpretación de resultados en el control de calidad y en el análisis de la situación higiénico sanitaria de la planta.

El contenido del manual, es producto principalmente de la experiencia de trabajo, que permitió una selección de información y métodos que reúnan los elementos necesarios para servir de guía al personal técnico involucrado en el control microbiológico e higiénico sanitario de los alimentos.

A lo largo del desarrollo del trabajo se pudo observar su efectiva aplicación en las líneas de producción, control de productos y sanidad de planta; lo que permitió la obtención de un producto terminado de calidad que compitiera en el mercado internacional.

Lic. Irma Contreras de Cuadra

# I N D I C E

---

		PAGINA N <sup>o</sup>
I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	3
III.	MARCO DE REFERENCIA	4
IV.	MATERIAL Y METODO	8
V.	RESULTADOS	10
VI.	DISCUSION	17
VII.	CONCLUSIONES	18
VIII.	RECOMENDACIONES	19
IX.	BIBLIOGRAFIA	21
X.	ANEXOS	
X.1	ANEXO N <sup>o</sup> 1	23
X.2	ANEXO N <sup>o</sup> 2	32
X.3	ANEXO N <sup>o</sup> 3	54
X.4	ANEXO N <sup>o</sup> 4	78
X.5	ANEXO N <sup>o</sup> 5	131
X.6	ANEXO N <sup>o</sup> 6	141

---

## I. INTRODUCCION:

El desarrollo de la Industria de Alimentos en el país tiene un potencial debido a las características de sus Recursos Naturales Agropecuarios que por su carácter perecederos deben ser procesados. En Nicaragua las principales industrias conserveras de frutas y hortalizas son IFRUGALASA, VALLE DE SEBACO y otras, sin embargo, existen empresas con mucho tiempo de funcionamiento y carecen de un laboratorio de microbiología e higiene, que asegure la calidad sanitaria de éstos alimentos, esto se ve limitado por el costo que implica la organización de un laboratorio de Microbiología e Higiene, originando pérdidas económicas por la descomposición de lotes de producción o por la baja calidad sanitaria de los mismos, que no permite la competencia en el comercio internacional de alimentos.

La Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco, ubicada en el kilómetro 105 carretera Panamericana, concebida como un Proyecto en 1980 y como Empresa de Producción en 1989, cuenta con una infraestructura para diversos procesos tecnológicos como: Concentrado de tomate, Tomates pelados, Okra en salmuera, Pepinos en salmuera, Chilotes en salmuera, Frijoles en salsa, Chiltomas en salmuera, Hortalizas mixtas, Cebolla deshidatada, etc., y un laboratorio de control de calidad de apoyo al sistema productivo de la planta industrial para garantizar los requisitos de calidad

definido para sus productos, através de los programas de control sanitario de materia prima, línea de producción y producto terminado, que requiere la inspección del lugar de trabajo, la prevención y el control de microbiología de alimentos e higiene.

El presente trabajo va dirigido a la Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco, con el propósito de establecer las normas sanitarias aplicada a los procesos tecnológicos de la industria de alimentos que asegure su vida útil, aceptabilidad desde el punto de vista de la salud pública y cumplir con los requisitos sanitarios en concordancia con las normas internacionales de higiene y sanidad de alimentos.

## II. OBJETIVOS:

### Objetivo General:

Elaborar un manual de procedimiento para el funcionamiento del laboratorio microbiológico e higiene de los alimentos.

### Objetivos Específicos:

- 1.- Definir la organización del laboratorio de microbiología e higiene de los alimentos y sanidad de planta.
- 2.- Establecer las normas de funcionamiento del laboratorio de Microbiología e Higiene de Alimentos.
- 3.- Elaborar normas y procedimientos para los programas de Control Sanitario de Alimentos.

### III. MARCO DE REFERENCIA

La conservación de alimentos es uno de los mejores sistemas, nos permite disponer durante todo el año y no solamente de forma estacional, de alimentos perecederos. La preparación de las comidas es mas cómoda y en general los alimentos se obtienen de forma más limpia e higiénica. Los avances conseguidos por estos métodos de conservación han hecho posible que los países con excedentes de ciertos productos puedan atender las necesidades de otros, suministrándoles suplementos alimentarios de alta calidad (1).

Los alimentos contienen, en general las sustancias (Proteínas, Carbohidratos, Grasas, Vitaminas, etc.) necesarias para la vida de los microorganismos y por tanto, representan un medio propicio para que éstas se desarrollen. La mayoría de los microorganismos al desarrollarse sobre los alimentos provocan cambios indeseables tales como acidificación, putrefacción, etc.. Aunque también pueden hacerlo las enzimas propias del alimento, pero su acción es mucho más lenta y moderada (2).

Las fuentes más importantes de contaminación de los alimentos:

- a) Los alimentos podrán contener microorganismos del suelo, del agua, de las materias fecales, del animal mismo y otros.

- b) Contaminación adquirida durante el transporte de los lugares de producción, a las plantas de procesamiento. Comprende la contaminación en barcos de pesca, camiones refrigerados, etc.
- c) Contaminación durante las operaciones de deshuesado, evisceración, etc. de animales y durante el lavado, eliminación de cáscaras y escaldado en vegetales, entre otras.
- d) Contaminación por el personal que manipula el alimento: microorganismos de la piel, de la boca, de la nariz, de las heces fecales y de otras áreas del organismo tienen acceso a los alimentos en esta forma.
- e) Contaminación por el agua que se emplea en la industria.
- f) Contaminación por los equipos e instrumentos de trabajo.
- g) Gérmenes transportados por el aire mediante partículas de polvo pueden aumentar la carga microbiana y muchos de ellos pueden ser peligrosos.
- h) Las moscas, insectos, roedores, gatos, perros y aves contribuyen también a contaminar las materias primas cuando tienen acceso a ellas.

- i) Los envases no higiénicos pueden ser también motivo de infección de los alimentos.

Los microorganismos patógenos pueden tener entrada al organismo mediante los alimentos y producen infecciones o intoxicaciones causadas por la presencia de una toxina bacteriana formada en el alimento o por la entrada de bacterias en el organismo a través de la ingestión de alimentos contaminados.

La sanidad e higiene de los alimentos, significa aplicar medidas sanitarias en cada paso de la operación; las prácticas sanitarias, por tanto se relacionan con el adquirir alimentos sanos y con su almacenamiento higiénico; con la adecuación de la planta física y con los tratamientos que eliminan las bacterias patógenas del equipo y utensilios usados en la preparación y al servicio de los comestibles; con la buena salud, higiene personal y hábitos apropiados de trabajo de quienes los manejan. (3)

En base a las consideraciones anteriores el manual tiene la finalidad de servir de guía orientativa y práctica, para establecer las buenas prácticas de fabricación tomando en cuenta las técnicas sanitarias en el manejo de los alimentos antes, durante y después de la producción. Esto involucra análisis de materia prima, puntos críticos de la producción, producto terminado, almacenamiento y el manejo posterior del alimento hasta su consumo. Es debido a esto la importancia de elaborar normas microbiológi-

cas, las cuales establecen los principios aplicables a las diferentes actividades de la industria alimenticia y a la vez implantar reglas, con el objetivo de ordenar una actividad determinada, para el beneficio y con la participación de todos los interesados y en particular para lograr la optimización de la economía en general, cumpliendo las condiciones funcionales y los requisitos de seguridad.

El manual se basa en los resultados comprobados de la técnica y la experiencia que expresa las conclusiones de un trabajo de normalización, en el que se da una solución óptima de un problema que se repite, cuyas disposiciones son de cumplimiento obligatorio o recomendados debido a que son aprobados, editados y distribuidos por la empresa y son de obligatorio cumplimiento para dicha empresa.

Es notorio que las industrias de alimentos donde existe un manual de procedimiento para el funcionamiento del laboratorio microbiológico e higiene de los alimentos goza de los siguientes beneficios:

1. Un mejor producto final.
2. Una planta limpia.
3. Cumplimiento de las normas sanitarias.

#### IV. MATERIAL Y METODO.

Para la elaboración del manual de procedimiento de microbiología de higiene de alimentos del departamento de control de calidad de la Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco, se partió de la estructura organizativa de la planta industrial, refiriéndose al presente manual solo a la organización y funcionamiento del laboratorio de microbiología e higiene de alimentos.

Para establecer el funcionamiento del laboratorio de microbiología e higiene se deberá tomar en consideración la infraestructura del local, el equipo instalado, personal contratado y, el tipo de servicio brindado por el laboratorio.

Para la elaboración de las normas de los programas de control sanitario de alimentos, se partió de la experiencia acumulada del trabajo correspondiente al período 1988-1992, el cual consiste en la recopilación y análisis de una serie de información obtenidas en las diferentes líneas de producción puesta en marcha, y de las recomendaciones brindadas por la asistencia técnica búlgara. Así mismo, para facilitar la elaboración de las normas en forma organizada se ha recurrido a la agrupación de los mismos por afinidad en la orientación del trabajo, estableciéndose seis grupos de normas:

- Grupo #1 : Las que contienen las orientaciones del trabajo, materiales y reactivos.
- Grupo #2 : Las que contienen el uso y el manejo de los equipos.
- Grupo #3 : Las referidos a la higiene del ambiente, personal, equipos, agua, envases y maquinaria.
- Grupo #4 : Las que se aplican a los procesos tecnológicos, producto terminado y tinciones.
- Grupo #5 : Las que se aplican para las tomas de muestras.
- Grupo #6 : Las que contienen los formatos, que se aplican para llevar el registro de las diferentes actividades durante el proceso tecnológico.

## V. RESULTADOS:

### 1. Organización del Laboratorio de Microbiología e Higiene.

En el diagrama No. 1, se presentó la estructura organizativa de la planta industrial de la Empresa Industrial del Valle de Sébaco, la cual está administrada por la dirección general, que a su vez se apoya en la gerencia administrativa, comercial, agrícola e industrial; correspondiendo la gerencia industrial al área donde se procesan las materias primas y teniendo de apoyo el departamento de mantenimiento, producción y control de calidad que es el órgano que prueba mediante evidencias objetivas el cumplimiento de las disposiciones y documentos técnicos-normalizativos, en relación a la calidad de la producción y del producto y correspondiéndole al laboratorio de microbiología e higiene la emisión de resultados de las inspecciones y análisis efectuados en los procesos tecnológicos y en los programas de higiene aplicados a la planta.

### 2. Funcionamiento del Laboratorio de Microbiología e Higiene.

El laboratorio de microbiología e higiene de alimentos está organizado de la forma siguiente:

## 2.1. Aspecto General del Local:

El laboratorio es una habitación ventilada con buena iluminación aislada de locales para otros fines, la parte baja de la pared es lisa sin grietas donde se acumule el polvo o suciedad al igual que el piso. Las ventanas no abren a la altura de las mesas, si no en su parte posterior. El laboratorio está equipado con aire acondicionado, electricidad, agua y gas.

Para la distribución del trabajo, el laboratorio está diseñado fundamentalmente por tres salas de trabajo y dos ambientes de bodega:

- Sala principal o de trabajo: Es aquella donde se encuentran las mesas para la preparación de medios de cultivos microbiológicos reactivos, materiales, microscopio, balanzas y preparación de muestras.
  
- Cuarto de siembra: Son cuartos pequeños equipados con lámparas de rayos ultravioletas, en el que se realizan las siembras y resiembras de microorganismos y toda aquella operación que requieran una estricta asepsia.

- Cuarto de esterilización: Es aquel donde está situado el autoclave, esterilizador, destilador de agua, así como un calentador para la preparación de medios de cultivo y reactivos.
  
- Ambiente de Bodega: Son dos cuartos, en el primero se encuentran los productos químicos y biológicos, para uso en el laboratorio, y en el segundo cuarto de bodega, se encuentra la cristalería y equipo necesario para el laboratorio.

Así mismo los ambientes de trabajo están acondicionados con:

- Mesas de trabajo del laboratorio que son de superficie impermeables y lisas, sobre ellas se sitúan todos los instrumentos de trabajo.
  
- La cristalería, productos químicos y biológicos los que se sitúan en bodegas con armarios destinados para este fin.

## 2.2. Equipo Instalado:

El equipo instalado tiene un lugar específico dentro del laboratorio y según las necesidades, se sitúan las incubadoras, refrigeradoras, etc.

### 2.3. Personal:

El laboratorio cuenta con un responsable o jefe del laboratorio de microbiología e higiene, que es un profesional Licenciado en Tecnología de Alimentos, que dirige el laboratorio tanto técnico como administrativamente, elabora el programa de actividades diarias para cada análisis, indicando claramente los métodos de ensayos correspondiente.

Por la importancia del laboratorio y la cantidad de trabajo se cuenta con dos analistas microbiológicos técnicos en conservas de frutas y vegetales. Los analistas son capacitados por el responsable o jefe del laboratorio de microbiología e higiene, para preparar las áreas de trabajo aplicando planos de limpieza y desinfección, en la preparación de medios de cultivos, en la preparación de cristalería, en el manejo de los instrumentos de trabajo, en el montaje de los análisis y en la toma de muestra.

### 2.4. Plan de Trabajo:

El Responsable o Jefe del laboratorio de microbiología e higiene de alimentos elabora el plan de trabajo, el cual corresponde a las actividades diarias requeridas por cada una de la líneas de producción instalada, orientando las mismas como también la metodología para ejecutarlo.

### 2.5. Aseguramiento de la calidad en el laboratorio:

La ejecución de los trabajos es supervisada por el responsable o jefe de laboratorio para conocer las causas más importantes de las variaciones en los resultados obtenidos.

### 3. Normas Sanitarias:

- a) El grupo de normas para la preparación de medios de cultivo y reactivos se presentan en el anexo No. 1; las cuales describen las generalidades; fundamento y procedimiento para la preparación de medios de cultivos y reactivos.
- b) El grupo de normas para el uso y manejo de los equipos, se presentan en el anexo No. 2; las cuales describen las generalidades, fundamento y procedimientos de las estufas bacteriológicas y de cultivos, del baño universal, de la estufa de desecación y esterilización de la estufa de desecación al vacío, del autoclave y los registros de utilización de los equipos y el control de operación de incubadoras.
- c) El grupo de normas de higiene se presentan en el anexo No. 3; los cuales describen las generalidades, fundamento y procedimiento de la limpieza y desinfección del

laboratorio industrial, determinación del grado de contaminación del área de trabajo, determinación de microorganismos coliformes en manos del personal, determinación del grado de contaminación de equipos y maquinaria, determinación del número mas probable de microorganismos coliformes en agua, higiene del envase e higiene de tapas de los envases.

- d) El grupo de normas para antes, durante y después del proceso, se presentan en el anexo No.4; las cuales describen las generalidades, fundamento y procedimiento de la determinación del conteo total de microorganismos aerobicos mesofilos viables, determinación de hongos filamentosos y levaduras viables, determinación de esporas, determinación del control microbiológico en la producción de conservas esterilizados (frutas y hortalizas frescas), efecto del escaldado, determinación del control microbiológico en especies y otros condimentos, tinción simple, tinción de Gram, tinción de Ziehl-NEELSEN, preparado de la gota pendiente, preparado natural cubierto, coloración de esporas, preparación de soluciones colorantes, prueba de esterilidad, conteo directo de hifas de mohos por el método de Howard, valoración estadística de los resultados del conteo de los mohos (Howard) y determinación del control microbiológico en alimentos enlatados sometidos a

tratamiento térmico.

- e) El grupo de normas para la toma de muestras de materias primas, productos en procesos y productos enlatados, se presentan en el Anexo No. 5, las cuales describen las generalidades, fundamento y procedimiento para la toma de muestra, preparación y toma de muestra para productos enlatados, etiquetado de muestra y muestreos para la toma de decisión sobre un lote de producción.
  
- f) El grupo de formato que se aplican para llevar el Registro de las diferentes actividades diarias antes, durante y después de los procesos tecnológicos se presentan en el anexo No.6; los cuales reflejan las diferentes actividades durante el proceso tecnológico y las diferentes actividades realizadas en el Laboratorio, como es el registro de higiene y limpieza en la Planta de Producción, análisis de agua, de maquinaria, materia prima y de higiene personal (muestreo en manos)

## VI. DISCUSION

Dada la existencia de un Laboratorio Industrial, debidamente equipado en la Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco y considerando que la Empresa, es responsable de la calidad de los productos que elabora se debe organizar y ejecutar el control de calidad de los mismos; procediendo con tal fin a elaborar un manual de procedimiento con el propósito principal de hacer cumplir las normas establecidas.

Corresponde a los organismos rectores la elaboración de documentos técnicos normalizativos a nivel nacional que sirvan de guía para la elaboración de normas de empresas para efectuar los trabajos de control de la calidad en las mismas. Así como la asesoría técnica para su implantación y la aprobación como norma de Empresa en correspondencia con las normass nacionales y éstas a su vez con las normas internacionales.

Sin embargo, existe un órgano rector de Higiene de Alimentos adscrito al Ministerio de Salud y no responde a la complejidad del control sanitario de las empresas, ni a la ejecución de normas de higiene antes, durante y después del proceso, limitandose solamente a la toma de muestra de producto terminado para la verificación de la calidad sanitraria como requisito para extender la Carta de libre Exportación de los productos elaborados, por lo tanto, esta inspección se ha dado en el momento en que la

empresa lo solicita, en consecuencia, las normas de Empresas se corresponden con normas internacionales que las empresas consideran aplicables a sus procesos

## VII. CONCLUSIONES

Se concluye que la experiencia acumulada de cuatro años de trabajo y la aplicación del presente manual, garantiza la calidad sanitaria de los productos elaborados en la Empresa Agroindustrial del Valle de Sébaco, ya que se definen las normas para cada una de las áreas de trabajo que conllevan al proceso gradual de la elevación de la calidad de la producción desde las materias primas, los materiales, los componentes y el producto terminado.

### VIII. RECOMENDACIONES.

- 1.- El Jefe o responsable del Laboratorio de Microbiología e Higiene, debe ser un recurso capacitado y responsable, para aplicar los documentos normalizativos y criterios técnicamente sustentados para el aseguramiento de la calidad.
- 2.- Organizar y participar conjuntamente con la Dirección de la Empresa y el Departamento de Producción en reuniones, seminarios, conferencias y exposiciones, a fin de interpretar cada una de las normas y poder garantizar su aplicación durante las diferentes etapas del proceso tecnológico.
- 3.- Participar en el Consejo Técnico de calidad, ante situaciones de reclamos por incumplimiento en las especificaciones de la calidad sanitaria.
- 4.- El personal técnico del Laboratorio deberá capacitarse obligatoriamente, previo a su contratación de acuerdo a un programa elaborado por el personal de Dirección
- 5.- El sistema de Registro deberá ser cumplido como se estipula en el manual, que permita de esta manera la

inspección del proceso y la evaluación del trabajo del Laboratorio.

- 6.- Es importante que dentro del Departamento de Higiene de Alimentos del Ministerio de Salud, se estructure un Departamento de Normas Sanitarias que regulen la industrias de alimentos.

**IX. BIBLIOGRAFIA.**

- 1.- Frazier, W. C, y D. C. Westhoff. **MICROBIOLOGIA DE LOS ALIMENTOS.** 3a. Edición (traducción del inglés por José Tormo Iguacel). Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1985.
- 2.- F.A.O. **ANALISIS MICROBIOLOGICO.** Manuales para el Control de Calidad de los alimentos. Estudio Fao: Alimentación y Nutrición. Serie: 14/4. Roma, 1981.
- 3.- COVENIN. **MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS.** FONDONORMA, Caracas, Venezuela.
- 4.- N. C. 76-02:82. **CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES.** Método de ensayo microbiológico: Preparación de medios de cultivo y reactivos.
- 5.- E. Merck Darmstardt. **MANUAL DE MICROBIOLOGIA.** 1978.
- 6.- Folletos de Instrucciones Técnicas, Uso y Mantenimiento de Equipo.
- 7.- Normas Búlgaras.

- 8.- N.C. NE. IAL.2253.006. **INDUSTRIAS DE CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES.** Limpieza y Desinfección. 1983.
- 9.- Gonzalez Raymundo. **MICROBIOLOGIA DE BEBIDAS.** Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. 1984.
- 10.-N.C. 76-04:82. **PRODUCTOS ALIMENTICIOS Y BEBIDAS.** Métodos de Ensayo Microbiológico. Determinación del Número más probable de microorganismos coliformes.
- 11.-Limonta Xiomara. **MICROBIOLOGIA DE LA HARINA.** Editorial Pueblo y Educación, Habana, Cuba. 1984.
- 12.-Rubiera Fernández, Pedro. **MICROBIOLOGIA DE CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES.** Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. 1983.
- 13.-N. C. 76-04:82. **PRODUCTOS ALIMENTICIOS Y BEBIDAS.** Métodos de Ensayo Microbiológico. Determinación de Hongos Filamentosos y Levaduras viables.
- 14.-Rubiera Fernández, Pedro. **MICROBIOLOGIA GENERAL DE LOS ALIMENTOS.** Editorial Pueblo y Educación. Cuba. 1987.
- 15.-N.C. 76-04:82. **PRODUCTOS ALIMENTICIOS Y BEBIDAS.** Método de ensayo microbiológico. Prueba de esterilidad.

A N E X O    N O 1

EMPRESA AGROINDUS TRIAL SEBACO	CONSERVA DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYO MICROBIOLOGICO PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS	N.E 00-01 NMIC 1992
---	--	------------------------------

## 1. ALCANCE.

Esta norma establece el procedimiento para la preparación de los medios de cultivos y reactivos que se utilizan en los análisis microbiológicos de las conservas de frutas y vegetales.

## 2. GENERALIDADES.

2.1. "Agar": es el principal medio sólido con un contenido de agar de 1% o más el cual es colocado en platos de petri.

"Medio": es el principal medio semisólido conteniendo menos del 1% de agar.

"Caldo": es un medio líquido libre de agar, conteniendo carne o productos de proteína (peptona, extracto), son solubles en agua a temperatura ambiente.

"Solución": es un líquido principal libre de agar es un medio sintético.

2.2. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se emplearon productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.3. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua esteril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121 C durante 20 minutos.

2.4. Los recipientes utilizados para la preparación de los medios de cultivo tendran de 2 a 5 veces el volumen de medio a preparar y estaran limpios y secos.

2.5. En la preparación de los medios de cultivo se empleará una balanza técnica con división de 0.1g y en casos requeridos se utilizará balanza analítica.

2.6. El PH de los medios de cultivo se standariza con solución de hidroxido de sodio al 10% o con solución de ácido cítrico al 10%, utilizando un medidor de PH con presición de 0.1 unidades de PH.



- 2.7. Para la distribución de los medios de cultivo no se llenaron los recipientes más de la mitad de su altura y después de esterilizados se extraen del autoclave para concluir su enfriamiento en un lugar fresco para evitar calentamientos prolongados.
- 2.8. Los medios con agar se fundirán en baño de agua y nunca sobre la cocina o llama. Una vez fundidos deben ser utilizados en un tiempo no mayor de 3 horas y no se fundirán más de una vez.
- 2.9. Los medios de cultivo preparados estériles, se conservarán en un ambiente fresco para evitar la evaporación, y no se guardarán por tiempo prolongado. Se prepararán en cantidad suficiente para una semana.
- 2.10 Todos los medios de medición utilizados estarán verificados y aptos para su uso.

### 3. FUNDAMENTO DEL METODO.

Los medios de cultivos son preparaciones sólidas, semisólidos o líquidas, que constituyen el micromundo de los microorganismos en condiciones de laboratorios, intentando ser un reflejo de su hábito natural satisfaciéndose de sus principales necesidades como ser vivo.

Los medios de cultivo se han agrupado atendiendo a los característicos que presentan algunos tipos de microorganismos. Una vez dentro del grupo microbiano de interés, nos puede interesar un medio de cultivo general o particular, ya sea para detectar una propiedad morfológica, bioquímica, etc.

### 4. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

Agar para conteo total placas.

#### 4.a. Agar Nutritivo.

Extracto de carne	3.0gr.
Peptona de carne	5.0gr.
Agar - Agar	12.0gr.

Si se posee el medio deshidratado se pesan 20gr del mismo, se disuelve en 1 litro de agua destilada fresca y completamente desmirealizada dejando reposar por 15 minutos. Se

aplica calor hasta disolver completamente. Se ajusta el PH a  $7.0 \pm 0.2$  se distribuye en erlenmeyer de 100ml aproximadamente en cada uno. Se taponea con algodón y se retapa con papel fuertemente amarrado. Se esteriliza en autoclave a 121 C por 15 minutos.

Procedimiento:

Agregar a los platos de Petri 10 ml del medio líquido enfriado alrededor de 45 C. Homogenizar la mezcla.

Evaluación:

Incubar 24 a 48 horas a 36 C, contar las colonias que han sido desarrolladas.

4.b. Caldo Nutritivo.

Extracto de Carne	3.0gr
Peptona de Carne	5.0gr

Disolver completamente, 8gr en 1 litro de agua destilada fresca y completamente desmineralizada. Esterilizar en el autoclave por 15 min. a 121 C. Ajustar el PH a  $7.0 \pm 0.2$

Procedimiento:

El caldo nutritivo es usualmente distribuido en tubos. Es usado en ves de esterilidad y en la cultivación de ves sensitivo de microorganismos dañinos.

4.c. Usos.

El agar nutritivo y caldo nutritivo son empleados en el cultivo de microorganismos dañinos en particular en el examen bacteriológico de bebidas, aguas industriales y aguas de desechos, y en todos las especies de materiales alimenticios.

5. AGAR EXTRACTO DE CARNE, PEPTONA DE COSEINA, GLUCOSA.

Peptona de coseína	5 gr (por litro)
Estracto de carne	3 gr
D (+) Glucosa	1.0gr
Agar - Agar	12.0gr

Disolver 21 g en un litro de agua fría fresca y destilada y completamente desmineralizada, dejar en reposo por 15 minutos y hervir hasta disolverlo completamente, esterilizar en el autoclave por 15 minutos a 121 C.

El PH del medio a 30 C deberá estar entre  $7 \pm 0.1$

Procedimiento:

El medio es usado con el método de vertido de platos para el cual se forman cantidades iguales (1 ml) de dilución del material de la muestra preparada con solución RINGER'S son pipeteadas dentro del plato petri y mezclado homogéneamente en porciones de 12 a 15 ml del medio líquido calentado a 45 C.

Usos:

Para la determinación del conteo total de microorganismos aerobios en leche, agua y otros materiales.

6. Standard cuenta Agar:

Extracto de carne	3.0 g/litro
Peptona de caseína (Libre de carbohidratos fácil de fermentación)	5.0 g
Cloruro de Sodio	5.0 g
Agar - Agar	12. g

Disolver 25 gramos en un litro de agua fresca, destilada o completamente desmineralizada, dejar reposar por 15 minutos a 121 C.

Procedimiento:

Para determinar el conteo microbiano prepare serie de diluciones de la mezcla usando agua al grifo estéril agregar el medio líquido estéril y enfriado entre 50 a 55 C en Baño María; mezclar vigorosamente con movimientos retatorios. Incubar de 24 a 48 horas a 36 C.

Evaluación.

El conteo de colonias se hace cuando están desarrolladas. El número de colonias corresponde al número total de mi

microorganismos vivos presentes. El conteo microbiano es igual al número de microorganismos por ml de material examinado y multiplicado por el factor de dilución.

7. Agar Extracto de Malta.

Extracto de Malta 30.0 gr.

Peptona de Harina de soya 3.0 gr.

Agar - Agar 15.0 gr.

Agregar 48g a 1 litro de agua fresca y destilada y completamente desmineralizada y dejar reposar por 15 minutos, hervir hasta disolver completamente. Esterilizar en el autoclave (10 min a 121 C). PH del medio listo a 22 C: es de  $5.6 \pm 0.1$

Procedimiento:

Si el agar es usado para conteo microbiológico, el PH debe ser ajustado a 3.5 para suprimir el crecimiento bacterial. Para ajustar el PH de 4.5 a 3.5 añadir al medio líquido y enfriado a 50 C alrededor de 20 ó 50 ml de solución de ácido láctico o ácido cítrico al 10% filtrado y esterilizado, ácido tartarico al 5% filtrado y esterilizado.

Usos:

Determinación, aislamiento y conteo de hongos, en particular levadura de varios materiales.

8. Endo C Agar:

Peptona de carne 10 gr/litro

Lactosa 10 gr/litro

Sulfito de sodio anhidro 2.5 gr/litro

Fucsina básica 0.4 gr/litro

Dipotasio hidrogeno fosfato 3.5 gr/litro

Agar - Agar 12.5 gr/litro

Disolver 39 gr en 1 litro de agua completamente desmineralizada y frescante destilada, mezclar por 15 minutos. La fucsina puede prepararse en solución, con 40ml de etanol

(Etanol absoluto). Entonces hervir hasta disolver completamente, esterilizar en el autoclave (15 min a 121 C) si después de enfriado el medio presenta excesivo color rojo intenso que pueda inferir con la evaluación, entonces agregar gota a gota de solución de sulfito de sodio recientemente preparado y llevar el medio a ebullición para eliminar el color rojo. El PH de el medio listo a 37 C es de  $7.4 \pm 0.2$

#### Procedimiento:

Es importante para la identificación en platos de coli bacterias fecales pero, usualmente va precedido por caldo de enriquecimiento lactosa peptona o caldo lactoso fuccina.

#### Evaluación:

<u>Colonias</u>	<u>Microorganismos</u>
Rojo	Lactosa- positiva
Rojo con un permanente brillo	—
Metálico	Escherichia Coli
Rojo, a veces con un inconsecuente brillo metálico, semi-esferica, mucosa.	Enterobacter aerogenes, Klebsiella
Colores, claros	Lactosa - negativa

El medio debe almacenarse en un lugar oscuro y a temperatura de refrigeración.

## Caldo Tioglicolato:

1. Composición:	(g por litro)
Peptona de coseina	15.0
Extracto de levadura	5.0
D(+) Glucosa	5.5
L(+) cysteine	0.5
Cloruro de Sodio	2.5
Tioglicolato de sodio	0.5

Disolver 29 gr en 1 litro de agua recientemente destilada completamente desmineralizada, hervir en la cocina hasta disolución completa.

Llenar los tubos (10 ó 15m) y esterilizar en el autoclave 15 min a 121 C.

PH de medio listo a 37 C:  $7.1 \pm 0.1$

El caldo tioglicolato debe ser preparado recientemente antes de ser usado, si esto no es posible, llevarlo a ebullición y enfriar inmediatamente antes de ser usado.

## Usos:

Para la cultivación y solución de organismos microaerofilos obligados y facultativos.

## PREPARACION DE REACTIVOS

1. Solución de Acido Cítrico al 10% m/m:

Se pesan 10 gr de ácido cítrico. Se disuelve en aproximadamente 80 ml de agua, se completa volumen hasta 100 ml, se distribuye en erlenmeyer y se calienta a ebullición por 10 min.

2. Solución de hidróxido de sodio al 10% m/m:

Se pesan 10 gr de hidróxido de sodio. Se disuelve en aproximadamente 80 ml de agua, se completa volumen hasta 100 ml, se distribuye en erlenmeyers, se rótula y se guarda en refrigeración.

NORMA EXTRANJERA CONSULTADA

- (7) NC 76 - 02 : 82 Conservas de frutas y vegetales. Método de ensayo microbiológicos. Preparación de medios de cultivos y reactivos.

Bibliografía Consultada:

- E. MERCK DARMSTADT "Manual de Microbiología", 1978.  
Págs. 101,175,227,263,318,361.



ANEXO No. 2

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS USO Y MANEJO DE LAS ESTUFAS BACTE- RIOLÓGICAS Y DE CULTIVOS.</b>	<b>N E 01-01 NMIC 1992</b>
---	--	--

1. ALCANCE:

Esta norma establece el uso y manejo de las estufas bacteriológicas y de cultivos.

2. GENERALIDADES:

2.1. Son máquinas térmicas que producen en un pequeño espacio las diferentes temperaturas óptimas de crecimiento de los microbios.

2.2. Dentro de las incubadoras se realizan las incubaciones de los platos petri y tubos de ensayos sembrados.

3. FUNDAMENTO:

Es indispensable por lo menos tres incubadoras y elegir un modelo lo más grande posible, para disponer de bastante espacio.

4. PROCEDIMIENTO:

CONEXION A LA RED ELECTRICA:

Una plaquita colocada en la parte frontal de la estufa, indica las características del voltaje que debe ser conectada, así como la potencia en watos.

Cerciorese de que la instalación eléctrica es de las características que figuran en la plaquita.

CONEXION A TIERRA:

Para conectar la estufa a tierra, deberá utilizarse una base de enchufe que corresponda al tipo de clavija que lleva el aparato. En caso de que no disponga de esta base, la conexión a la tierra puede hacerse a cualquier tornillo del mueble exterior de la estufa.

Una vez efectuadas las verificaciones anteriormente citados deberá introducir la clavija en la base del enchufe, teniendo el interruptor de puesta en marcha en la posición de "0" y el termostato en el mínimo.

#### PUESTA EN MARCHA:

Accionar el interruptor de puesta en marcha y al mismo tiempo se iluminará el piloto de señalización de línea (color ámbar) indicando que la estufa recibe corriente.

Desplazar el mando del termostato de menos a más y fijarlo a la temperatura que se desee trabajar; al mismo tiempo se iluminará el piloto de calefacción (color rojo).

Transcurrido en tiempo prudencial, se apagará el piloto rojo y seguidamente irá efectuando una serie de conexiones y desconexiones, hasta estabilizar la temperatura preseleccionada.

Para estar seguro de que la estufa está ya estabilizada en su temperatura fijado de antemano, es necesario dejar transcurrir un tiempo desde su puesta en marcha que oscila entre 1 1/2 a 2 horas. Si una vez estabilizada la temperatura, no fuera la adecuada, se tendrá que desplazar el mando del termostato en más o en menos según el caso, y dejar estabilizar de nuevo.

La graduación de la escala del termostato solo sirve de referencia, siendo la temperatura real la que indica el termómetro.

#### TERMOSTATO DE SEGURIDAD:

Para regular el termostato de seguridad de forma que la temperatura de la estufa se desconecte de 2 a 5 C. por encima de la temperatura de trabajo en caso de que fallara el termostato de regulación, se procederá de la siguiente forma: A la primera puesta en servicio, se tendrá que desplazar el botón del termostato todo hacia la derecha.

Después de transcurridas por lo menos unas dos horas y se tenga la seguridad de que la temperatura ya está estabilizada, esperar a que se encienda el piloto rojo.

Una vez se haya encendido girar el botón del termostato de seguridad lentamente hacia la izquierda hasta apagar el piloto rojo, al mismo tiempo saldrá el botón de enclavamiento.

Girar de nuevo, lentamente hacia la derecha unos 3 ó 4 milímetros de recorrido, pulsar de nuevo el botón de enclavamiento y se encenderá el piloto rojo. De esta forma, tendremos el termostato de seguridad unos 2 ó 5 C más alto que el de la temperatura de trabajo.

#### ESTUFAS EQUIPADAS CON RELOJ DESCONECTADOR:

Las estufas que llevan interruptor horario están preparadas para desconectarse automáticamente, después de un tiempo fijado de antemano. Para hacer uso del dispositivo una vez esté la estufa en marcha girar el botón del reloj hacia la derecha fijándolo en el tiempo que se quiera que la estufa se desconecte y accionar el conmutador del temporizador hacia la posición "0" (Automático temporizador) quedando así preparada para que se desconecte en el tiempo que se ha fijado.

Cuando se ponga en marcha otra vez la estufa se tiene que accionar el conmutador del temporizador hacia la posición "I" (Manual sin temporizador).

Bibliografía consultada: Libro de instrucciones técnicas, uso y mantenimiento.

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>USO Y MANEJO DEL BAÑO UNIVERSAL</u></b>	<b>N.E. 01-02 NMIC</b>
---	---	--------------------------------

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece el uso y manejo del baño universal "UNITRONIC".

2.- **GENERALIDADES:**

Descripción Técnica:

- 2.1. Grifo para el vaciador de la cuba.
- 2.2. Interruptor general
- 2.3. Piloto de señalización de alarma
- 2.4. Piloto de señalización de calefactor
- 2.5. Mando de offset
- 2.6. Pulsador de TEST
- 2.7. Conmutador para dos rangos de temperatura
- 2.8. Mando del selector
- 2.9. Pantalla displai

3.- **FUNDAMENTO:**

Para un uso correcto de los baños, es necesario que primero sean llenados de líquidos hasta un nivel adecuado y como mínimo que cubra la resistencia eléctrica del interior de la cubeta. De no hacerlo, se corre el riesgo de inutilizar el elemento calefactor.

Según sea el tipo de baño y el rango de temperatura, se tendrá que utilizar el líquido o mezcla adecuada.

<u>Rango de temperatura en C.</u>	<u>Líquido aconsejable</u>
- 10 hasta + 10	40% de agua y 60% de alcohol industrial.
- 30 hasta + 60	Shell Kerosene inodoro
- 10 hasta + 15	40% de agua y 60% de etileno-glicol
+ 20 hasta + 80	Agua perfectamente descalcificada
+ 80 hasta +140	Polietileno glicol 200
+100 hasta +200	Polietileno glicol 400

#### 4.- PROCEDIMIENTO:

##### Conexión a la Red Eléctrica:

Una plaquita colocada en la parte posterior del baño, indica las características del voltaje al que debe ser conectado, así como la potencia en vatios. Cerciórese de que la instalación eléctrica es de las características que figuran en la plaquita.

##### Conexión a Tierra:

Para conectar el baño a tierra deberá utilizarse una base de enchufe que corresponda al tipo de clavija que lleva el baño. En caso de que no disponga de esta base, la conexión a tierra puede hacerse a cualquier tornillo del mueble exterior del baño.

##### Puesta en marcha:

Una vez conectado a la red, se accionará el interruptor general y se iluminará la pantalla displai indicando la temperatura ambiente.

##### Selección de la temperatura:

Se efectúa mediante el pulsador de Test y el mando del selector. Presionar el pulsador de test y aparecerá en la pantalla displai la temperatura que preseleccionaremos.

El pulsador de test se tendrá que mantener presionado mientras seleccionaremos la temperatura. Con el pulsador accionado se girará el mando del selector hacia la derecha o izquierda hasta que aparezca en la pantalla la temperatura a la que se quiere trabajar; seguidamente dejar de accionar el pulsador de TEST y en la pantalla aparecerá la temperatura real del baño.

Siempre que se desee saber la temperatura que se ha seleccionado bastará solo con apretar el pulsador de TEST y aparecerá ésta en la pantalla.

Una vez el baño alcance la temperatura seleccionado, ésta se mantendrá automáticamente y el piloto de calefacción irá emitiendo unos destellos intermitentes, indicando el comportamiento del calefactor.

### Mando de Offset:

El baño incorpora un conmutador para seleccionar la escala de temperatura. Así según sea la temperatura de trabajo, se situará dicho mando en un rango u otro.

Normalmente se situará en la zona intermedia de su recorrido. Dicho mando actúa sobre el selector como ajuste fino de la temperatura. Si una vez establecida la temperatura real del baño, ésta no coincide con la seleccionada, se hará girar el mando de OFFSET a derecha o izquierda, según sea el caso, teniendo en cuenta que todo el recorrido del mando sólo es de 1 C.

Por ejemplo, si se ha seleccionado una temperatura de 50 C y una vez estabilizada, el display nos indica una temperatura real del baño de 49,6 C se desplazará ligeramente hacia la derecha el mando de OFFSET y se observará en cuánto aumenta la temperatura del baño después de transcurridos unos cinco minutos; si todavía no alcanza los 50°C desplazar más el mando o si por el contrario se ha sobrepasado en décimas los 50°C debe retrasarse el mando.

### Dispositivo de seguridad:

En el caso de que por descuido o por evaporación se quedase el baño con un nivel de agua por debajo del calefactor, actúa un dispositivo de seguridad automático que desconecta el calefactor y enciende el piloto de alarma.

Para restablecer el servicio, primero desconectar el baño accionando el interruptor general, llenar de nuevo el baño hasta un nivel que cubra como mínimo el calefactor y volverá accionar el interruptor de puesta en marcha.

### Vaciado de la cubeta:

Para vaciar el líquido del interior de la cubeta, abrir el grifo lateral del baño. Anteriormente se habrá conectado un tubo elástico entre el grifo y el desagüe.

### Mantenimiento:

Si se utiliza agua normal de la red, se producirán deposiciones calcáreas que se depositarán en la cubeta, elementos calefactores y bombas de circulación. Si las incrustaciones son considerables actúan a modo de aislante, por lo que pueden incluso llegar a destruir los elementos calefactores.

Periódicamente debe limpiarse el interior del baño con una solución de agua con un ácido débil (preferentemente ácido acético o ácido fórmico) hasta que se desprenda toda la cal; después vaciarlo y enjuagarlo con agua limpia.

**Bibliografía consultada:**

Folleto de instrucciones técnicas,  
uso y mantenimiento.

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>USO Y MANEJO DE LA ESTUFA DE DESECACION Y ESTERILIZACION</u></b>	<b>N.E. 01-03 NMIC 1992</b>
---	--	---

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece el uso y manejo de la estufa de desecación y esterilización.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Es necesario tener dos o tres hornos, para esterilizar los instrumentos metálicos y de cristal.

3.- **FUNDAMENTO:**

Las estufas de desecación y esterilización son de mucha importancia en el laboratorio microbiológico, para esterilizar los instrumentos metálicos y de cristal. El mantenimiento durante dos horas a 160 C se considera generalmente suficiente.

4.- **PROCEDIMIENTO:**

**Conexión a la Red Eléctrica:**

Una plaquita colocada en la parte frontal de la estufa, indica las características del voltaje que debe ser conectada, así como la potencia en wattios.

Cerciórese de que la instalación eléctrica es de las características que figuran en la plaquita.

**Conexión a tierra:**

Para conectar la estufa a tierra, deberá utilizarse una base de enchufe que corresponda al tipo de clavija que lleva el aparato. En caso de que no disponga de esta base, la conexión a tierra puede hacerse a cualquier tornillo del mueble exterior de la estufa.

Una vez efectuadas las verificaciones anteriormente citadas, deberá introducir la clavija en la base del enchufe, teniendo el interruptor de puesta en marcha en la posición de "0" y el termostato en el mínimo.

### Puesta en marcha:

Accionar el interruptor de puesta en marcha y al mismo tiempo se ilumina el piloto de señalización de línea (color ámbar) indicando que la estufa recibe corriente.

Desplazar el mando del termostato de menos a más y fijarlo a la temperatura que se desee trabajar; al mismo tiempo se iluminará el piloto de calefacción (color rojo).

Transcurrido el tiempo prudencial, se apagará el piloto rojo y seguidamente irá efectuando una serie de conexiones, hasta estabilizar la temperatura preseleccionada.

Para estar seguro de que la estufa está ya estabilizada en sus temperatura fijada de antemano, es necesario dejar transcurrir un tiempo desde su puesta en marcha que oscilará entre 1 1/2 a 2 horas. Si una vez estabilizada la temperatura, no fuera la adecuada, se tendrá que desplazar el mando del termostato en más o en menos según el caso y dejar estabilizar de nuevo.

La graduación de la escala del termostato solo sirve de referencia, siendo la temperatura real la que indica el termómetro.

### ESTUFAS EQUIPADAS CON TERMOSTATO DE SEGURIDAD, Ref. T.S.

Para regular el termostato de seguridad de forma que la temperatura de la estufa se desconecte de 2 a 5 °C por encima de la temperatura de trabajo en caso de que fallara el termostato de regulación, se procederá de la siguiente forma:

A la primera puesta en servicio, se tendrá que desplazar el botón del termostato todo hacia la derecha.

Después de transcurrido por lo menos unas dos horas y se tenga la seguridad de que la temperatura ya está estabilizada, esperar a que se encienda el piloto rojo.

Una vez se haya encendido girar el botón del termostato de seguridad lentamente hacia la izquierda hasta apagar el piloto rojo, al mismo tiempo saldrá el botón de enclavamiento.

Girar de nuevo, lentamente hacia la derecha unos 3 ó 4 milímetros de recorrido, pulsar de nuevo el botón de enclavamiento y se encenderá el piloto rojo. De esta forma, tendremos el termostato de seguridad unos 2 ó 5 °C más alto que el de la temperatura de trabajo.

**ESTUFA EQUIPADA CON RELOJ DESCONECTADOR:**

Las estufas que llevan interruptor horario están preparadas para desconectar automáticamente.

**Bibliografía consultada:**

Folleto de instrucciones técnicas,  
uso y mantenimiento de equipo.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS USO Y MANEJO DE LA ESTUFA DE DESECACION <u>AL VACIO</u>	N.E 01-04 NMIC 1992
---	---	------------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el uso y manejo de la estufa de desecación al vacío (VACIO - TERM" Ref. S-571).

2.- GENERALIDADES

- 2.1. Mirilla de vidrio Pyrex: Permite visualizar el interior de cámara así como el termostato lector de la temperatura interna, situado en uno de los estantes.
- 2.2. Regulador de la temperatura con escala comparativa en °C.
- 2.3. Piloto de señalización del calefactor:  
Sincronizado con el termostato irá efectuando ciclos de encendido y apagado.
- 2.4. Interruptor general: Para la puesta en marcha de la estufa.  
Para accionar apretar la tecla hacia el fondo y al mismo tiempo quedará iluminado, para desconectarlo volver a pulsar la tecla.
- 2.5. Válvula de Venteo: Se utilizará el restablecer la presión atmosférica en el interior de la estufa o para regular un vacío determinado.
- 2.6. Vacuómetro indicador del vacío interior.

2.7. Terminal de conexión para toma de aire:

Al restablecer la presión atmosférica o al regular un vacío, el aire entra por dicho terminal.

2.8. Terminal de conexión para la toma de vacío.

2.9. Válvula para la toma de vacío.

### 3.- FUNDAMENTO:

La estufa de desecación al vacío se han acreditado a la incubación de cultivos bajo condiciones anaerobias. El aire de la estufa se elimina mediante una bomba de vacío y se sustituye por nitrógeno hasta obtener una atmósfera particularmente pura.

### 4.- PROCEDIMIENTO:

Conexión a la Red Eléctrica:

Una plaquita colocada en el chásis de la estufa indica las características del voltaje al que debe ser conectada, así como la potencia en vatios. Cerciórese de que la instalación eléctrica es de la características que figuran en la plaquita.

Puesta en Marcha:

Conectar la bomba de vacío al terminal mecánico. Accionar el interruptor general, al mismo tiempo se iluminará y desplazar el botón del termostato hasta la temperatura que se desee trabajar. Unos grados antes de alcanzar la temperatura el piloto rojo se apagará e irá efectuando unos ciclos de encendido y apagado hasta que se alcance la temperatura de trabajo. La temperatura real se lee con el termómetro que se incluye en uno de los estantes anteriores. Una vez estabilizada la estufa si la temperatura real no coincide con el termostato, reajustando éste se conseguirá el calor que deseamos.

### FUNCIONAMIENTO DE VACIO:

Si durante el calentamiento no se producen vapores en el interior de la estufa a vacío, se podrá conectar la bomba de vacío directamente a la estufa. Si se desarrollan vapores de agua, o de disolvente, solo se podrán utilizar conectados directamente con la estufa bombas y la estufa un condensador refrigerado por agua para que se depositen los vapores y no dañen la bomba. Además hay que agregar en el lado de succión de la bomba y en el de presión de la misma, un colector de condensación en cada lado.

### OBSERVACIONES:

- Si no se evacúa el espacio útil durante el calentamiento, deberá abrirse totalmente la válvula de venteo, a fin de que no se origine sobrepresión en el interior.
- Finalizado el secado no debe desconectarse la bomba simultáneamente con la estufa, sino que se cerrará la válvula de cierre de la estufa dejando correr la bomba de vacío con la válvula de lastre de aire abierta durante algún tiempo, para que los vapores disueltos en el aceite de la bomba se eliminen.

Con la desconexión de la bomba se abrirá la válvula de ventilación de la tubería de succión.

Cuando la bomba debe extraer medios muy corrosivos, se tendrán que efectuar repetidos cambios de aceite. Estos cambios se efectuarán después de un lavado previo con aceite fresco y limpio.

### **Bibliografía consultada:**

Folleto de instrucciones técnicas,  
uso y mantenimiento.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>USO Y MANEJO DE AUTOCLAVES "AUTESTER</u> <u>"AUTESTER-DRY"</u>	N.E. 01-05 NMIC 1992
---	---	-------------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el uso y manejo del autoclave ("AUTESTER").

2.- GENERALIDADES:

- 2.1. Volante central de abrir - cerrar de máxima rapidez y seguridad, que protege al operador del contacto con el vapor. Puente Central de cierre, robusto, con bisagra axial y rodamiento a bolas.
- 2.2. Tapa estampada, sin soldadura, en acero inoxidable, con junta de cierre de silicona de fácil recambio.
- 2.3. Luces de señalización: Color verde (RED), indica puesta en marcha; color rojo (CALEFAC), indica funcionamiento del calefactor sincronizado con el regulador automático de presión; color ámbar (TEMPO), indica el comienzo del temporizador.
- 2.4. Interruptor general de puesta en marcha y paro.
- 2.5. Temporizador de puesta en marcha automático en cuanto la cámara está presurizada, garantizando una perfecta esterilización.
- 2.6. Presostato a membrana para la regulación automática de presión y manómetro indicador.
- 2.7. Ruedas de caucho sistérico para facilitar su desplazamiento.
- 2.8. Mando exterior de la válvula de desague del fondo de la cubeta, facilitando un conveniente drenaje.
- 2.9. Mando exterior de la válvula de descompresión del vapor.
- 2.10 Válvula de seguridad de escape libre, tarada a 2,3 kg/cm<sup>2</sup> que asegura un buen rendimiento.

2.11 Terminal metálico que permite el acoplamiento de un tubo flexible para facilitar el drenaje a un recipiente externo, desagüe, etc.

### 3.- FUNDAMENTO:

El autoclave es uno de los equipos más importantes en el laboratorio, para esterilizar los medios y destruir los cultivos.

### 4.- PROCEDIMIENTO:

Conexión a la Red Eléctrica: Una plaquita colocada en la parte posterior del autoclave, indica las características del voltaje al que debe ser conectado, así como la potencia en watos.

Cerciórese que la instalación eléctrica es de las características que figuran en la plaquita.

#### CONEXION A TIERRA:

Para conectar el autoclave a tierra deberá utilizarse una base de enchufe que corresponda al tipo de clavija que lleva el aparato. En caso de que no disponga de esta base, la conexión a tierra puede hacerse a cualquier tornillo del mueble exterior del autoclave.

#### PREPARACION PARA ANTES DE LA PUESTA EN MARCHA:

Una vez efectuada las verificaciones anteriores indicada, se deberá introducir la clavija en la base de enchufe, el interruptor en la posición de "0". Unir un tubo elástico (goma látex, goma silicona, etc., a excepción de tubo plástico al terminal metálico de la parte posterior, y llevarlo a un recipiente o desagüe.

Abrir la tapa superior, y llenar por arriba al autoclave con agua preferentemente descalcificada, hasta el nivel de la gradilla interior y como mínimo que cubra el elemento calefactor situado debajo de la gradilla (2 litros para el modelo Ref. S-437-P y 4 litros para el modelo Ref. S-437-G).

Cerrar la tapa del autoclave mediante giro del volante hasta el fondo y ejerciendo una ligera presión. Las válvulas de "VAPOR" y "DESAGUE", deberán estar cerradas 1/4 de vuelta hacia la derecha.

**SELECCION DE LA PRESION:**

Desplazar el mando del regulador de presión (Kg/cm<sup>2</sup>) y fijarlo en el punto en que se desee trabajar. Teniendo presente la relación que existe entre la presión de vapor saturado y la temperatura en °C de la tabla siguiente:

<u>Presión en Kg/Cm<sup>2</sup></u>	<u>Temperatura en °C.</u>
1	120
1,2	123
1,4	125
1,6	128
1,8	130
2	133

**SELECCION DEL TIEMPO DE ESTERILIZACION:**

Desplazar el mando del temporizador y fijarlo en el tiempo que se quiera que dure la esterilización. El temporizador sólo se pone en marcha cuando el autoclave ya ha alcanzado la presión preseleccionada.

**PUESTA EN MARCHA:**

Accionar el interruptor general a la posición "I"; al mismo tiempo se iluminarán los pilotos verde y rojo.

El autoclave va provisto de una válvula automática de expulsión de aire, por lo que durante el calentamiento hasta 100 °C. esta válvula permanece abierta expulsando todo el aire del interior del autoclave y al llegar a 100 °C se cierra automáticamente y el autoclave empieza a acumular presión, asegurando de esta forma que la temperatura interior corresponde a la presión de vapor saturado.

La presión real es la que indica el manómetro; la escala graduada del presostato sólo sirve de referencia.

Una vez alcanzada la presión preseleccionada se apagará el piloto rojo e irá efectuando unos ciclos de encendido-apagado, sincronizados con el presostato, manteniendose de esta forma la presión preseleccionada.

Cuando se ha alcanzado la presión de régimen, se pone en marcha automáticamente el temporizador iluminándose al mismo tiempo el piloto ámbar y una vez el índice rojo del temporizador llegue a cero, desconectará automáticamente el calefactor y el zumbador avisará el final de la esterilización.

Para el zumbador accionando el interruptor general a la posición "0".

Si una vez finalizada la esterilización se desea desvaporizar rápidamente el autoclave, abrir el grifo de "VAPOR".

**ATENCIÓN:** NO ABRIR LA TAPA SUPERIOR HASTA QUE EL MANOMETRO ESTE A "CERO".

Para vaciar el agua, abrir el grifo de "DESAGUE".

**INSTRUCCIONES PARA EL AUTOCLAVE "AUSTESTER-DRY", Refs. S-437-P-DRY y S-437-G-DRY.**

Una vez finalizado el ciclo de esterilización, vaciar la presión y el agua caliente, abriendo los grifos de "VAPOR" y "DESAGUE".

Seleccionar un tiempo de secado (como mínimo 20 minutos).

Para el modelo Ref S-437-P-DRY y de 30 minutos para el modelo Ref. S-437-G-DRY, desplazando el mando de temporizador.

Alojar la tapa superior y levantarla ligeramente.

Accionar el interruptor general a la posición de secado.

Una vez transcurrido el tiempo preseleccionado, el zumbador avisará el final del secado y se desconectarán los calefactores.

Para parar el zumbador, poner el interruptor general en la posición "0".

**Importante:** Al introducir el material dentro del autoclave, se tendrá en cuenta de no tapar los tres orificios de la parte superior del depósito.

**Bibliografía consultada:**

Folleto de Instrucciones Técnicas, Uso y Manejo.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS REGISTRO DE UTILIZACION DE LOS EQUIPOS LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE	N.E. 01-06 NMIC 1992
---	--	-------------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el registro de utilización de los equipos del laboratorio de microbiología e higiene.

2.- GENERALIDADES:

2.1. La distribución y ubicación de los equipos en el laboratorio debe ser adecuada por permitir su lavado y limpieza y desinfección periódica.

2.2. El analista que utiliza el equipo debe familiarizarse con el mismo y conocer los detalles mínimos.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Los registros de utilización de los equipos del laboratorio de microbiología e higiene, se redactan en forma de instrucciones específicas que son proporcionados por el Jefe o Responsable del laboratorio, donde se les instruye a los analistas sobre el uso de los equipos y la importancia de llevar un registro, con el objetivo de observar:

- 1.- Fallas en el equipo.
- 2.- Frecuencia de uso del equipo.
- 3.- Agrupar un personal más experimentado.
- 4.- Delimitar responsabilidad.

**4.- APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Formatos o registros.

**5.- PROCEDIMIENTO:**

- 5.1. Se anota la fecha de uso del equipo.
- 5.2. Se anota el nombre del equipo.
- 5.3. Se anotan las condiciones higiénicas que presenta el equipo al momento de su uso.
- 5.4. Se anota el objeto de su uso, porque se utiliza el equipo.
- 5.5. Se anota la cantidad y tipo de material que entra el equipo. La capacidad del equipo debe ser tal que permita el proceso sin paros.
- 5.6. Se anota la hora que inicia y finaliza el funcionamiento del equipo.
- 5.7. Se anota la temperatura durante el trabajo, que es la temperatura que nos proporciona el equipo durante el tiempo que funciona éste.
- 5.8. Se anota la firma de la persona responsable del funcionamiento del equipo.
- 5.9. Se anota cualquier observación sobre el funcionamiento del equipo.

**Norma Extranjera Consultada:**

Normas Búlgaras.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>CONTROL DE OPERACION DE INCUBADORAS</u>	N.E. 01-07 NMIC 1992
---	--	-------------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el control de temperatura que debe realizarse a las incubadoras.

2.- GENERALIDADES:

2.1. Las incubadoras deben tener su cuaderno o formato del control diario de temperatura de las incubadoras, al inicio y final de la jornada de trabajo.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El control de temperatura de las incubadoras, se redacta en forma de instrucciones específicas que son proporcionados por el Jefe o Responsable del laboratorio donde se les instruye a los analistas, sobre la importancia de llevar un control de temperatura de las incubadoras, con el objetivo de observar.

1. Fallas en el equipo
2. Frecuencia del uso del equipo
3. Agrupar personal más experimentado
4. Delimitar responsabilidades.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Formatos o registros.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

Con cada incubadora en funcionamiento se debe hacer lo siguiente:

1. Anotar diariamente al inicio y final de jornada.
  - 1.1. Fecha que se realiza el control.
  - 1.2. Temperatura al inicio de la jornada de trabajo; si no es la requerida se anota y se regula la temperatura.
  - 1.3. Temperatura al final de la jornada de trabajo; si no es la requerida se anota y se regula la temperatura.
  - 1.4. Firma del analista que realizó la anotación.
  - 1.5. Se anotarán las observaciones.

**Norma Extranjera Consultada:**

Normas Búlgaras.

ANEXO No. 3

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS LIMPIEZA Y DESINFECCION DEL LABORATORIO INDUSTRIAL</b>	<b>N.E. 02-01 NMIC 1992</b>
---	---	---

**1.- ALCANCE:**

Esta norma establece el método de limpieza y desinfección que garantiza la asepsia, antes de iniciar las actividades de los ensayos Microbiológicos, en los diferentes tipos de muestras de alimentos.

**2.- GENERALIDADES:**

- 2.1. Para la limpieza y desinfección de los ambientes del Laboratorio, se asigna al personal apropiado que en éste caso es el mismo que efectúa los Análisis, ya que tiene la obligación de conocerla en su totalidad, para obtener resultados confiables.
- 2.2. El analista encargado de la limpieza y desinfección se organiza de modo que asegure la higiene de los ambientes, al inicio, durante las operaciones y al finalizar los mismos.
- 2.3. El analista que realiza la limpieza y desinfección, responde por la calidad de su trabajo, por el buen trato y uso correcto de los materiales y equipos que se entregan para el desarrollo de las tareas.

**3.- FUNDAMENTO DEL METODO:**

Los laboratorios de las fabricas de productos alimenticios, se preocupan fundamentalmente del control de la calidad, estudian las materias primas, los ingredientes y diversas muestras a lo largo de todo el proceso de fabricación, manipulación, etc. Las pruebas utilizadas tienden, en general, al control del aspecto sanitario de los alimentos; se preocupan también de que se cumplan los standards bacteriológicos, de que la calidad del producto sea aceptable y que no estén presentes microorganismos o productos microbianos perjudiciales a la salud del consumidor.

Es por ésto que la limpieza y desinfección del laboratorio es base fundamental, a fin de poder saber cuáles son las causas más importantes de las variaciones, para reducir al mínimo sus efectos sobre la fiabilidad de los resultados de los análisis y para evitar que se decida que un producto reúne las especificaciones aplicables y los requisitos legales basándose en informes defectuosos o de poco crédito.

#### 4.- AGENTES DE LIMPIEZA Y DESINFECCION:

- Detergente.
- Hipoclorito de sodio 50 ppm, 100 ppm y 5500 ppm.
- Alcohol de 75°
- Lámparas bactericidas.

##### 4.1. Preparación de las soluciones de trabajo:

###### a) Detergente al 0.2%.

- Pesar la cantidad de detergente necesario para la presente (2 gr. x 1 litro)
- Medir la cantidad de agua necesaria.
- Añadir el detergente y agitar constantemente con agitador apropiado, nunca con las manos, hasta la total disolución del detergente en el agua.

###### b) Hipoclorito de Sodio a 500 ppm. (0.05% ó 500 mg/litro).

- De una solución madre de hipoclorito de sodio a 5% tomar 10 ml para cada litro de solución desinfectante a preparar.
- Añadir el hipoclorito al agua agitar hasta la mezcla total de hipoclorito en el agua.

- c) Hipoclorito de sodio a 100 ppm. (0.01% ó 100 mg/litro).
- De una solución madre de hipoclorito de sodio a 5% tomar 2 ml/L de solución desinfectante a preparar.
  - Añadir el hipoclorito al agua y agitar hasta la mezcla total de hipoclorito en el agua.
- d) Hipoclorito de sodio a 50 ppm. (0.005% ó 50 mg/L.)
- De una solución madre de hipoclorito de sodio al 5% tomar un ml para cada litro de solución desinfectante a preparar.
  - Añadir el hipoclorito al agua y agitar hasta la mezcla total de hipoclorito en el agua.

5.- PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCION:

- a) Antes de comenzar la jornada laboral.
- Entrar al laboratorio con gabacha impecablemente limpia.
  - Quitar el polvo con paño húmedo.
  - Limpiar las mesas de trabajo y equipos con detergente, con agua y con solución de hipoclorito de sodio de 0.01% (100 ppm).
  - Limpiar el piso con hipoclorito de sodio a 0.05% (500 ppm).
  - Limpiar internamente las incubadoras con un trapo limpio y humedo, luego con alcohol de 75° una vez semanal.
  - Ordenar el laboratorio, colocar la cristalería en sus respectivos depósitos.

- b) Limpieza y desinfección del cuarto de siembra para los ensayos.
- Limpiar mesas, azulejos con paño limpio, humedo y con hipoclorito de sodio a 0.01% (100 ppm) o con alcohol de 75°.
  - Ordenar todos los materiales necesarios para los ensayos.
  - Los envases que se analizarán, estarán previamente lavados y secos.
  - Conectar las lámparas bactericidas durante 30 minutos antes de empezar el ensayo.
  - La limpieza de las manos se efectúan con jabón, agua y con solución de hipoclorito de sodio a 0.005% (50 ppm).
  - Durante el trabajo las puertas permanecen cerradas y no se debe bostezar, hablar, toser, etc.
- c) Al finalizar la jornada laboral.
- El analista de turno deberá entregar limpio y desinfectado el laboratorio, al turno siguiente.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

- 6.1. Para controlar la calidad de limpieza del laboratorio, se debe realizar ensayos microbiológicos, como mínimo una vez al mes.
- a) Ensayo microbiológico del ambiente (aire), antes y después de la limpieza.
  - b) Ensayo microbiológico de mesas antes y después de la limpieza.
  - c) Ensayo microbiológico de manos de los analistas antes y después de lavarse las manos con hipoclorito.

### Bibliografía Consultada:

Frazier W.C. : Microbiología de los Alimentos. Edic. Revolucionaria. Habana, Cuba, 1970.

NG - IAL 2253.006 LIMPIEZA Y DESINFECCION.

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DETERMINACION DEL GRADO DE CONTA MINACION DEL AREA DE TRABAJO.</b>	<b>N. E. 02-02 NMIC 1992</b>
---	---	--

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el método para verificar el grado de asepsia del aire dentro del laboratorio de microbiología e higiene.

2.- GENERALIDADES:

2.1. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se empleará agua destilada para análisis.

2.2. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se debe realizar en condiciones estériles.

2.3. Todos los aparatos y utensilios utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

2.4. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realiza por duplicado.

2.5. Por agua destilada se entenderá al agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El aire carece de una flora microbiana propia, ya que todos los microorganismos que en él se encuentran, están de forma accidental; los microorganismos llegan al aire con el polvo, tierra, gotitas expulsadas al toser, estornudar y hablar, mohos esporulados que crecen en paredes, techos y suelos.

Los microorganismos presentes en el aire no tienen oportunidad de desarrollarse, sino de perdurar en el mismo, por lo que, las clases más resistentes a la desecación serán las que más persistirán.

El número de microorganismos de la atmósfera aumenta al ocasionarse corrientes de aire, al moverse personas por ventilación y por la brisa. El aire de una habitación vacía contiene menos microorganismos que el de una ocupada y de la misma manera la atmósfera de un local puede tener una carga bacteriana mayor.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1) Placas de Petri.
- 2) Agar nutriente.
- 3) Agar saboreaud (Medio Micológico)

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

- 5.1. A una placa petri agregar 10 ó 15 ml de agar nutriente.
- 5.2. Dejar solidificar.
- 5.3. A una placa petri agregar 10 a 15 ml de agar saboreaud.
- 5.4. Dejar solidificar.
- 5.5. Las placas se colocan en el local que se desean y se dejan destapadas durante 5 a 10 minutos.
- 5.6. Las placas se incuban a 37°C. durante 24 a 48 horas para la cuenta de bacterias y 5 días para la cuenta de mohos y levaduras.
- 5.7. Observar las placas y efectuar el conteo.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

6.1. Conociendo el número de colonias por placa, el diámetro y la superficie de la placa, hallamos el número de microorganismos por metro cúbico de aire, mediante la fórmula:

$$\text{Número de Microorganismos por metro cúbico de aire.} = \text{Número de colonias en placas} \times \text{Coeficiente de cálculo.}$$

Utilizando la tabla de OMELIANSEY para el cálculo de microorganismos en 1 m<sup>3</sup>.

Diámetro de la placa (Cm).	Superficie de la placa (Cm <sup>2</sup> ).	Coeficiente de cálculo del número de microorganismos en 1 m <sup>3</sup> de air
8	50	100
9	63	80
10	78	60
11	95	50
12	113	45

### Bibliografía Consultada:

- Frazier W.C. y D. C. Westhoff. **Microbiología de los Alimentos**  
3a. Edición (traducción del inglés por José Tormo Iguacel). Editorial Acribia, Zaragoza, España, 1985.
- González Raymundo. **Microbiología de Bebidas.**  
Editorial Pueblo y Educación.  
Habana, Cuba 1984. (Pág. 148,149).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DETERMINACION DE MICROORGANISMOS COLIFORMES EN MANOS DEL PERSONAL</b>	<b>N.E. 02-03 NMIC 1992</b>
---	---	---

1.- **ALCANCE.**

Esta norma establece la determinación de microorganismos coliformes en las manos del personal.

2.- **GENERALIDADES:**

- 2.1. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se empleará agua destilada para análisis.
- 2.2. El método de ensayo microbiológico establecido en ésta norma se realiza por duplicado.
- 2.3. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril, el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C. durante 20 minutos.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

Este método contempla los siguientes pasos: Con un hisopo húmedo que se encuentra en el interior de un tubo que contiene caldo lactosado (10 ml) más un tubo Durham invertido, se frota la palma de la mano, los dedos, la superficie entre los dedos y bajo las uñas, los tubos se tapan perfectamente y se incuban a 37°C. durante 24 a 48 horas. En caso de resultados positivos se hace un estriado a partir de ese tubo, en medio agar ENDO, para finalizar con una tinción de Gram de las colonias, que han crecido en éste agar.

En este método se utiliza un hisopo que se confecciona con 1 gr. de algodón quirúrgico, en cual se enrolla en un aplicador de metal de 150 mm. de longitud y 3 mm de diámetro, se coloca en un tubo de ensayo se tapa con algodón, el aplicador del hisopo debe sobresalir un poco por encima del extremo del tubo. El hisopo con el tubo se esteriliza en autoclave a 121° por 15 minutos.

El medio utilizado (caldo lactosado) se usa para detectar la presencia de bacteria entérica cuyo habitat es el intestino humano o animal. Estas bacterias tienen la propiedad de utilizar la lactosa como única fuente de carbono en la producción de ácido láctico.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1- Tubos de cultivo 150 x 20 mm.
- 2- Hisopos de algodón
- 3- Placas de petri.
- 4- Asa de incubación
- 5- Tubos de fermentación Durham
- 6- Portaobjeto liso
- 7- Soluciones colorantes para Gram
- 8- Incubadora termorregulable

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

- a) Después de tomar la muestra de la mano, incubar a 37°C de 24 a 48 horas, para su posterior análisis.

##### 5.2. Siembra:

- a) Transcurrido el tiempo de 24 a 48 horas se observa la formación de turbidez, ácido y gas que desplaza el líquido del interior del tubo Durham y se considera la lectura positiva.
- b) Del tubo positivo tomar con el asa una porción y se realiza resiembra o estríos en placas con agar endo; se incuba 37°C. de 24 a 48 horas.
- c) Se esteriliza el asa en la llama y se prepara una tinción de Gram de las colonias que crecieron en las placas estriadas y se observa el preparado con el lente de inmersión.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

- 6.1. Transcurrido el período de incubación, se observa el tubo para comprobar la formación de gas.
- 6.2. La ausencia de gas constituye una prueba negativa.
- 6.3. La formación de gas constituye una prueba positiva.
- 6.4. El resultado es positivo si en las placas con agar endo se da crecimiento de colonias de intenso color rojo con brillo metálico.
- 6.5. El resultado es positivo cuando la tinción de Gram observada con el lente de inmersión refleje la presencia de bacilos no esporógenos Gram negativos.

### Complemento:

Norma Internacional Consultada:

NC 76 - 04 : 82      **Productos alimenticios y bebidas.** Métodos de ensayo microbiológico DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE MICROORGANISMOS COLIFORMES.

Bibliografía consultada:

González Raymundo: **Microbiología de Bebidas.**  
Editorial Pueblo y Educación  
Habana, Cuba, 1984.  
(Pág. 153, 154).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DETERMINACION DEL GRADO DE CONTAMINACION DE EQUIPOS Y MAQUINARIA</b>	<b>N.E. 02-04 NMIC 1992</b>
---	---	---

**1.- ALCANCE:**

Esta norma establece el método para verificar el grado de asepsia de los equipos y maquinarias.

**2.- GENERALIDADES:**

2.1. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se empleará agua destilada para análisis.

2.2. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico, se debe realizar en condiciones estériles.

2.3. Todos los aparatos y utensilios utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizarán en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

**3.- FUNDAMENTO DEL METODO:**

La clase y número de microorganismos de un alimento se ven influenciados por el tipo y grado de contaminación, por oportunidades de crecimiento anteriores para ciertos tipos y por tratamiento previos que el alimento pueda haber recibido.

La contaminación aumenta la carga microbiana del alimento, pudiendo incluso añadirle otros tipos bacterianos. Así los equipos y maquinaria de la fábrica puede contaminar los alimentos durante su elaboración con microorganismos perjudiciales, ésto se da cuando no se hallan convenientemente limpios y en condiciones higiénicas. La limpieza e higiene de el equipo y maquinaria consiste principalmente en la eliminación de la mayor cantidad posible de alimentos para los microorganismos.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Patrón de alambre de 10 cm<sup>2</sup>
- Agua Estéril
- Tubo de ensayo
- Hisopo de algodón (quirúrgico)
- Placas de petri
- Agar standard
- Caldo lactosado
- Agar ENDO

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Al muestrear la superficie seca, antes de emplear el hisopo, éste se debe sumergir en una disolución estéril (10 ml de agua). Con el hisopo se limpia el área de 10 cm<sup>2</sup> con un patrón de alambre, lento y firmemente, haciéndolo rotar en dirección contrario a la del movimiento de limpieza; después se pasa tres veces por el área, haciéndolo girar ligeramente en cada pasada. Si se advierte que han quedado pedazos de algodón adheridos a la superficie muestreada, es recomendable y efectivo pasar otra vez el hisopo por el área, para recoger estos pedazos de algodón. Terminado el muestreo del área, el hisopo se coloca inmediatamente dentro del tubo de ensayo con la disolución estéril en que se encontraba.

Ya en el laboratorio se agita durante 3 minutos, posteriormente se procede a realizar las disoluciones decimales para contar en placa standard y para los índices higiénicos se siembran 0,1 ml de la dilución, para la determinación de bacterias coliformes, estafilococos y estreptococos.

### 5.2. Siembra:

Vease la N.E. 03-01 "Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables". Métodos de ensayos microbiológicos.

- a) Se siembra 0,1 ml de cada dilución en tubos con caldo lactosado, conteniendo tubos Durhan invertido e incubando a 37°C. de 24 a 48 horas.
- b) Si hay formación de gas se inocular en agar ENDO (estriado).
- c) Realizar tinción de Gram a las colonias que crecieron en los medios.

Se utiliza una placa de control de medio de cultivo por cada serie de placas sembradas.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

6.1. Conociendo el número de colonias desarrolladas podemos aplicar la siguiente fórmula:

$$K = \frac{a \cdot b \cdot c}{d}$$

donde:

- |   |   |   |
|---|---|---|
| a | = | Cantidad de colonias de la placa standard.                      |
| b | = | Disoluciones.   |
| c | = | Volúmen de líquido esterilizado en el erlenmeyer (m)            |
| d | = | Area del patrón (cm <sup>2</sup> )                              |
| k | = | Cantidad de microorganismos en 1 cm <sup>2</sup> de superficie. |

Bibliografía consultada:

González Reymundo **Microbiología de Bebidas.** Edit. Pueblo y Educación. Habana, Cuba, 1984.(pag.155-156).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS DETERMINACION DEL NUMERO MAS PROBABLE DE ORGANISMOS COLIFORMES EN AGUA (SERIE DE 15 TUBOS)</b>	<b>N.E. 02-05 NMIC 1992</b>
---	--	---

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la determinación del número más probable (N M P) de microorganismos coliformes en agua.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en ésta norma se realiza por duplicado.

2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril, el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

Este método contempla los siguientes pasos: Prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba final. El ensayo presuntivo consiste en utilizar caldo lactosado concentración normal y doble concentrado con tubos Durham invertido, seguido de la prueba confirmativa, de los tubos que ha producido gas por la propiedad que tienen los microorganismos coliformes fecales de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura de 45° C. y la que tienen

los coliformes totales de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas a temperatura de 37°C, para el cual se utiliza caldo lactosa bilis verde brillante al 2% y caldo E.coli con tubos Durham invertidos. Como los resultados obtenidos no son suficiente para afirmar la presencia de coliformes se realiza la prueba final que consiste en el estudio de las características morfológicas de los microorganismos del grupo coliformes por medio de Tinción de Gram.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1) Tubos de cultivo 150 x 20 mm.
- 2) Tubos de cultivo de 180 x 20 mm.
- 3) Pipetas bacteriológicas de 10 ml.
- 4) Pipetas bacteriológicas de 1 ml. con graduación de 0.1 décimas.
- 5) Gradillas metálicas o plásticas.
- 6) Tubos de fermentación Durham.
- 7) Asa de Inoculación.
- 8) Portaobjeto liso.
- 9) Soluciones colorantes para Gram.
- 10) Baño de María graduado a  $45^{\circ} \pm 0.5^{\circ}$
- 11) Incubadora termorregulable.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

- a) Emplee frasco estrictamente tapado y estéril.
- b) Abra la llave y deje correr el agua durante 5 minutos para hacer la muestra homogénea.
- c) Tomar alrededor de 100 ml de agua, lo más asepticamente posible.
  - Si el agua es clorada se utiliza solución de tiosulfato de sodio al 10% a razón de 0,1 ml. por cada 100 ml. de agua.
  - La muestra debe ser analizada inmediatamente después de colectar o refrigerar a temperatura entre 0 a 10°C.

## 5.2. Siembra:

### 5.1.2. Prueba Presuntiva:

- a) Inocular 10 ml. de muestra en cada uno de los 5 tubos que contienen 10 ml. de caldo lactosado doble concentración y tubos Durham invertidos.
- b) Inocular 1 ml. de la muestra de cada uno de los 5 tubos que contienen 10 ml. de caldo lactosado simple y tubos de Durham invertidos.
- c) Inocular 0.1 ml. de muestra en cada uno de los 5 tubos que contienen 10 ml. de caldo lactosado simple y tubos de Durham invertidos.
- d) Se incuban a la temperatura de 37° durante 24 horas.
- e) Si no hay formación de gas, se esperan las 48 horas y se reporta según la tabla correspondiente. La formación de gas dentro de las 48 horas constituye una prueba presuntiva positiva.

### 5.2.2. Prueba Confirmativa:

- a) De cada tubo considerado positivo, se transfiere una asada a un tubo (rotulado y señalado la cantidad añadida) que contiene 10 ml. de caldo lactosa bilis verde brillante al 2% y tubos Durham invertidos y otra (rotulada y señalada la cantidad añadida) que contiene 10 ml. de caldo E. coli y tubos de Durham invertidos.
- b) Los tubos que contienen caldo lactosa bilis verde brillante se incuban a 37°C durante 48 horas.
- c) Los tubos que contienen caldo E. coli se incuban en Baño de María graduado a 45°± 0.5°C durante 24 horas.

- d) A los tubos con caldo lactosa bilis verde brillante se les efectúa lectura a las 24 y 48 horas. Se considera la lectura positiva cuando se observa turbidez y producción de gas tanto en los tubos con caldo lactosado bilis verde brillante como en los tubos con caldo E. coli.
- e) De los tubos positivos de la prueba presuntiva tomar con el asa una porción y haga resiembra (estrias) en placa con agar Mac Conkey rotulando y señalando del tubo que proviene la muestra. Incube a 37°C. por 24 a 48 horas.

#### 6.- PRUEBA FINAL:

- 6.1. Se esteriliza el asa en la llama y se prepara una tinción de Gram de las colonias que crecieron en las placas estriadas y se observa el preparado con el lente de inmersión.

#### 7.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

- 7.1. Transcurrido el período de incubación, se observan los tubos para comprobar la formación de gas.
- 7.2. La ausencia de gas constituye una prueba negativa.
- 7.3. Si hay formación de gas, la prueba se considera positiva.
- 7.4. Los resultados se expresan como número más probable de organismos coliformes fecales por 100 ml. de la muestra (coliformes fecales).
- 7.5. En la prueba final, el resultado es positivo si en las placas con agar Mac Conkey se da crecimiento de colonias rojas no mucosas.
  - 7.5.1. El resultado es positivo cuando la tinción de Gram observada con el lente de inmersión refleje la presencia de bacilos no esporógenos Gram negativos.

Norma Internacional Consultada:

NC 76 - 04 : 82      Productos Alimenticios y Bebidas. Método de Ensayo Microbiológico. Determinación del Número más probable de Microorganismos coliformes.

Bibliografía Consultada:

González Raymundo: Microbiología de Bebidas.  
Ed. Pueblo y Educación, Habana, Cuba  
1984.

Limonta Xiomara : Microbiología de la Harina.  
Ed. Pueblo y Educación, Habana, Cuba  
1984.

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  HIGIENE DE ENVASES</b>	<b>N.E.  02-06 1992</b>
---	--	-------------------------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece verificar la higiene de los envases que son utilizados en la producción.

### 2.- GENERALIDADES:

2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en ésta norma se realiza por duplicado.

2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril, el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Los recipientes que se utilizan para envasar directamente la materia fundamentalmente pomos y latas, pueden contener una gran cantidad de microorganismos, que de no guardarse las reglas higiénicas necesarias serían transmitidos al producto.

Las medidas recomendadas para disminuir, e incluso eliminar todos estos microorganismos son: El lavado correcto de los envases y su esterilización a vapor.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1.- Incubadora
- 2.- Agua estéril
- 3.- Placas de Petri
- 4.- Pipetas
- 5.- Tubos de ensayos
- 6.- Agar plate count.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

- a) Se toma una botella, pomo o lata de cada descargue de la máquina, durante un período de 5 minutos, si los envases no se van a analizar inmediatamente, se cubren con tapas estériles, se almacenan a 4°C. y se analizan dentro de las 4 h. siguientes de efectuada la toma de muestra.

##### 5.2. Siembra:

- a) Se toman los envases lavados y se agrega a cada envase 50 ml de agua estéril, se tapa con una tapa estéril.
- b) Se agita enérgicamente el envase durante 2 a 3 min., cuidando no votar el agua estéril.
- c) Se abre el envase en condiciones asépticas y el líquido se toma para el ensayo.
- d) Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos veáse la NE 03-01 "DETERMINACION DEL CONTEO TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS VIABLES". Métodos de ensayos microbiológicos.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

El número total microbico determinado representa la cantidad de los microorganismos contenidos en 1 gr. ó 1 ml. ó cm<sup>2</sup> de producto.

La cantidad de los microorganismos para 1 cm<sup>2</sup>, se determina según la fórmula:

$$Nm = \frac{A}{S}$$

Donde:

Nm = Número de microorganismos en un cm cuadrado.

A = Número de los microorganismos en todo el volúmen líquido lavado.

S = P D H . Donde:

P = 3,14

D = Es el diámetro del envase.

H = Es la altura del envase.

Norma Extranjera Consultada:

Norma Búlgara.

Bibliografía Consultada:

- González Raymundo.  
Microbiología de Bebidas. Ed. Pueblo y Educación, Habana, Cuba, 1984. (Pág. 143).
- Rubiera Fernández Pedro.  
Microbiología de Conservas de Frutas y Vegetales.  
Ed. Pueblo y Educación, Habana, Cuba. 1983. (Pág. 33).



EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS HIGIENE DE TAPA DE LOS ENVASES	N.E. 02-07 1992
---	--	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece verificar la higiene de las tapas que son utilizadas en los envases.

2.- GENERALIDADES:

- 2.1. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se empleará agua destilada para análisis.
- 2.2. Para efectuar la siembra microbiológica se deben obtener condiciones estériles.
- 2.3. Todos los aparatos y utensilios para efectuar los ensayos microbiológicos, estarán estrictamente limpios y estériles.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizarán en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

La superficie interior de las tapas o cubiertas que se ponen en contacto con el contenido del recipiente deberán estar libres de microorganismos que pueden de alguna forma afectar el producto.

Este método se aplica a tapas pequeñas que pueden alcanzar en un petri.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Pinza de tipo quirúrgico.
- Frasco de boca ancho con tapa.
- Placas de Petri.
- Alcohol al 70%.
- Microscopio.
- Agar malta o saboreaud y T.P.C.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

- a) Se seleccionan por lo menos 10 tapas al azar, o de acuerdo al número de piezas presentes.

### 5.2. Siembra:

- a) Tomar las tapas con pinza estéril y limpiar la parte posterior de la tapa con alcohol de 70%, ésta se ponen en un frasco estéril con el cuidado de que no toque las superficies interiores.
- b) Se utiliza agar Plate count, para la cuenta de bacterias mesófilas y agar saboreaud para levaduras y mohos.
- c) Se pone la tapa en placa de petri estéril, con la cara interior hacia arriba y se vierte el medio de cultivo, en cantidad suficiente para llenar o cubrir la tapa.
- d) Incubar a 37°C de 3 a 5 días.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

- 6.1. Se reportan las colonias de bacterias mesófilas, levaduras y mohos por placa.

### Bibliografía Consultada:

- González Reymundo: Microbiología de Bebidas.  
Editorial Pueblo y Educación.  
Habana, Cuba. 1984.

**ANEXO Nº 4**

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>DETERMINACION DEL CONTEO TOTAL DE MICRO ORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS VIABLES</u></b>	<b>N.R. 03-01 1992</b>
---	--	--------------------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables en los productos alimenticios de frutas y vegetales.

### 2.- GENERALIDADES:

- 2.1. El Método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realiza por duplicado.
- 2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización, con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.
- 2.3. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad p.a.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Este método se basa en la hipótesis de que las células microbianas que contiene una muestra mezclada con un medio de agar forman, cada una, colonias visibles y separadas. Para ello se mezclan diluciones decimales de la muestra del alimento homogeneizado con el medio. Después de incubar las placas a 30°C durante 72 horas, se calcula el número de bacterias aeróbicas mesófilas por gramo de la muestra de alimento, basándose en el número de colonias obtenidas en cápsulas de petri elegidos con diluciones que den resultados significativos.

**4.- APARATOS Y UTENSILIOS:**

- 1.- Placas de petri.
- 2.- Pipetas
- 3.- Tubos con agua estéril
- 4.- Agar plate count.

**5.- PROCEDIMIENTO:**

- 5.1. Realizar diluciones según el número requerido, tomando 1.0 ml con una pipeta y se vierte en un tubo que contenga 9ml de agua de grifo estéril; se mezcla cuidadosamente.
- 5.2. Con la misma pipeta se toma 1.0 ml de la primera dilución y se vierte en el tubo de la segunda dilución, que contiene 9 ml de agua de grifo esteril se mezcla y se repite la operación con una pipeta nueva para un tercero, cuarto o más tubos hasta hacer el número requerido de diluciones.
- 5.3. Se vierte con una pipeta 1.0 ml de cada una de las diluciones en cada una de las cápsulas adecuadamente marcadas y duplicadas.
- 5.4. Se vierte en cada cápsula de petri 15 ml del agar para el cómputo bacteriano.
- 5.5. Se mezcla bien y uniformemente, la muestra diluida con el medio de agar y se deja solidificar.
- 5.6. Las cápsulas preparadas se incuban, invertidos, durante  $72 \pm 3$  horas a  $36^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ .

**6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:**

- 6.1. Después de la incubación se cuentan todas las colonias de las cápsulas que contienen 30 - 300 de ellas y se anotan los resultados por cada dilución contada.
- 6.2. En caso de encontrar cápsulas (dilución 1:10) con menos de 30 col/ml en la menos dilución sembrada el resultado se expresa: menos de  $3 \times 10^2$  ( $3 \times 10 = 3 \times 10^2$ ).
- 6.3. En caso que las cápsulas examinadas no contengan ninguna colonia, el resultado se expresa menos de  $1 \times 10^1$  col/ml.

- 6.4. En caso que las cápsulas examinadas contengan más de 30 colonias/mililitros se cuentan las colonias de las dos placas de una dilución y se calcula la media, con dos cifras significativas solamente y se multiplica por el inverso de la dilución correspondiente, a fin de obtener el número de bacterias por gramo o mililitro.
- 6.5. En caso de encontrar cápsulas con más de 300 colonias/mililitros y en la mayor dilución sembrada el resultado se expresa mayor de 300 col/ml en la mayor dilución sembrada.

Norma Internacional Consultada:

NC 76-04:82. **Productos Alimenticios y Bebidas.** Métodos de Ensayo Microbiológico. Determinación del conteo total de microorganismos aeróbios mesófilos viables.

Bibliografía Consultada: Alimentación y Nutrición Estudio FAO, **Manuales para el control de calidad de los alimentos.** Análisis Microbiológicos.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO <u>DETERMINACION DE ESPORAS</u>	N.E. 03-02 1992
---	---	-----------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación de esporas en productos alimenticios de frutas y vegetales.

### 2.- GENERALIDADES:

- 2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realiza por duplicado.
- 2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril, el agua para análisis sometida a esterilización, con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.
- 2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos estarán estrictamente limpios y esterilizados.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

La formación de esporas en las bacterias comunes es una característica propia y casi exclusiva de las bacterias de forma bastonada o cilíndricas, llamadas bacilos.

La espora una vez formada se separan del resto de la célula de la cual se formó, a veces queda unida a este resto durante algún tiempo o por siempre o sea hasta que germine, cuando ocurre esto último, la espora adopta diferentes posiciones, por tanto, se puede decir que existen tres tipos de esporas:

Centrales, cuando la espora aparece en el centro de la célula; Terminales, si la espora aparece en el extremo de la célula y Subterminales cuando la espora aparece entre el centro y el extremo de la célula.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1- Placas de petri.
- 2- Pipetas.
- 3- Tubos de ensayo esteril.
- 4- Baño maría termorregulable.
- 5- Agar plate count.
- 6- Caldo nutritivo.
- 7- Medio líquido de tioglicolato.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

- 5.1. La muestra de análisis se toma en dos tubos de ensayo estéril y en condiciones estériles en cantidades de 10 a 15 ml.
- 5.2. En uno de los tubos se introduce un termómetro de 0 a 100°C y se rotula como tubo de control de temperatura.
- 5.3. El tratamiento térmico se lleva a cabo en un baño maría, donde se calientan los dos tubos a temperatura de 80°C; se da el tiempo requerido a partir que la temperatura en el tubo de control llega a la cifra necesaria.
- 5.4. Después de cumplido el tiempo de tratamiento térmico se enfrían inmediatamente el tubo muestra con agua de grifo.

#### 6.- SIEMBRA:

##### Esporas Aerobias Mesofilas:

- a) Se vierte con una pipeta 1 ml. de la muestra a cada placa de petri, y se agrega 10 a 15 ml. de agar nutriente o placa count.
- b) Se vierte con una pipeta 1 ml. de la muestra a cada tubo conteniendo 10 ml. de caldo nutritivo.
- c) Se incuban los tubos y, las placas (invertidas) durante  $72 \pm 3$  horas, a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

##### Esporas Aerobias Termofilas:

- a) Igual que esporas aerobias mesofilas a excepción de la temperatura.

Esporas Anaerobias Mesofilas:

- a) Se vierte con una pipeta 1 ml de la muestra a cada placa de petri y se agrega 10 a 15 ml. de agar para anaerobios.
- b) Se vierte con una pipeta 1 ml de la muestra a cada tubo conteniendo 10 ml de medio líquido de tioglicolato más campaña Durham invertida.
- c) Se incuban los tubos y las placas (invertidas) en estufa de desecación al vacío, durante  $72 \pm 3$  horas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Esporas Anaerobias Termofilas:

- a) Igual que esporas anaerobias mesofilas a excepción de la temperatura  $56 \pm 1^\circ\text{C}$ .

6.- EXPRESION:

- 6.1. En caso que las cápsulas examinadas contengan más de 30 colonias/mililitros, se cuentan las colonias de las dos placas de una dilución y se calcula la media, con dos cifras significativas solamente y se multiplica por el inverso de la dilución correspondiente, a fin de obtener el número de bacterias por gramo o mililitros.
- 6.2. En caso de encontrar cápsulas (dilución 1:10), con menos de 30 Col/ml. en la menor dilución sembrada el resultado se expresa: menos de  $3 \times 10^2$  ( $30 \times 10 = 3 \times 10^2$ ).
- 6.3. En caso de encontrar cápsulas con más de 300 colonias/ml. en la mayor dilución sembrada el resultado se expresa: mayor de 300 col/ml en la mayor dilución sembrada.
- 6.4. En caso que las cápsulas examinadas no tengan ninguna colonia el resultado se expresa: menos de  $1 \times 10^1$  col/ml.

Norma Extranajera consultada:

Normas Búlgaras.

Bibliografía consultada:

Rubiera Fernandez Pedro: Microbiología General de los Alimentos. Ed. Pueblo y Educación, Habana, Cuba, 1987. (Pág. 31, 32, 33).

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>DETERMINACION DE HONGOS FILAMENTOSOS</u> <u>Y LEVADURAS VIABLES</u>	N.E. 03-03 1992
---	---	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación de hongos filamentosos y levaduras viables en productos alimenticios.

2.- GENERALIDADES:

2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realizará por duplicado.

2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico, se realizará en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El método se basa en la facultad que tienen los hongos filamentosos y las levaduras viables de desarrollarse en un medio de cultivo adecuado de PH bajo, a temperatura de 25 a 30°C y durante 3 a 5 días.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Platos de petri esterilizados.
- Pipetas
- Agar extracto de malta o Agar sabouricid.maltosa
- Disolución de ácido cítrico al 10%.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

5.1. Preparación de la muestra a analizar. VEASE N.E.04-02 "CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES" Métodos de ensayos Microbiológicos, preparación y toma de muestras de productos enlatados.

### 5.2. Siembra:

Se extrae asépticamente 1 ml de la porción de ensayo y utilizando una pipeta y se lleva a placas de petri.

Se funde el medio de cultivo en un baño de agua, se enfría a la temperatura de 45°C y se mantiene a esa temperatura hasta que vaya a ser utilizado, el tiempo no podrá ser mayor de 3 horas. A cada frasco del medio de cultivo a utilizar, se añade solución de ácido cítrico al 10% ó solución de ácido láctico al 10% hasta lograr un PH de 3,5 a 4. La cantidad de ácido a añadir estará previamente calculada. Se vierte en cada placa de 10 a 15 ml del medio de cultivo acidificado y se procede inmediatamente a mezclarlo con la porción de ensayo, haciendo rotar suavemente la placa durante 5 a 10 segundos, teniendo cuidado de no salpicar los bordes ni la tapa de la placa. Se colocan las placas de petri sobre una superficie plana nivelada para permitir que el medio solidifique durante 5 a 10 minutos.

Se utiliza una placa de control ambiental y otra de control del medio por cada serie de placas sembradas. Solidificado el medio de cultivo se invierten las placas y se incuban a la temperatura de 25 a 30°C durante 3 a 5 días, con observación diaria. Transcurrido el tiempo de incubación, se cuentan las colonias de hongos filamentosos y levaduras viables de cada placa.

6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

- 6.1. Se escogen las placas de modo tal que el número de colonias esté dentro 30 y 150 colonias por placa.
- 6.2. El conteo de hongos filamentosos y levaduras viables en el producto, vendrá dado por el número de colonias contadas en las placas por el factor de dilución.
- 6.3. Se reportan los resultados en las dos formas siguientes:
  - 6.3.1. Conteo de hongos filamentosos/g o ml de la muestra.
  - 6.3.2. Conteo de levaduras viables/ g o ml de la muestra.

Norma extranjera consultada:

NC 76-04: 82 Productos alimenticios y bebidas. Métodos de ensayos microbiológicos. Determinación de hongos filamentosos y levaduras viables.

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>DETERMINACION DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA PRODUCCION DE CONSERVAS ESTERILIZADAS (FRUTAS Y HORTALIZAS FRESCAS).</u></b>	<b>N.E.  03-04 1992</b>
---	---	-------------------------------------

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la determinación del control microbiológico en la producción de conservas esterilizadas (frutas y hortalizas frescas).

2.- **GENERALIDADES:**

- 2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en ésta norma se realizará por duplicado.
- 2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.
- 2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos, se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

El deterioro de las frutas y hortalizas frescas, suele acontecer durante su almacenamiento y transporte, así como durante la etapa de espera antes de su procesado. Tan pronto como las frutas y hortalizas se colocan durante su recolección en cajas, bolsas o cestos, están expuestas a contaminación por organismos que pasan de unas a otras o proceden de los recipientes, a menos que éstos hayan sido adecuadamente higienizados. Durante su transporte a la planta industrial, los traumatismos aumentan su susceptibilidad a la alteración y puede iniciarse el crecimiento microbiano.

En las fábricas que elaboran frutas y hortalizas existe la posibilidad de contaminaciones posteriores y también de un desarrollo bacteriano; el lavado a fondo de las frutas y hortalizas sirve no solo para eliminar la suciedad y por tanto los gérmenes en ella existentes, sino también los restos que puedan quedar de tratamientos tóxicos. El lavado puede practicarse con agua, soluciones detergentes o incluso soluciones bactericidas.

El efecto del lavado de las frutas y hortalizas se determina calculando el coeficiente de lavado (KL) que se obtiene comparando el número más probable (NMP) de las materias primas antes y después de su lavado.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1) Tubos con 9 ml. agua de grifo estéril.
- 2) Pipetas de 1 ml.
- 3) Placas de Petri.
- 4) Plate count. agar.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

Preparación de la muestra antes de la siembra: Los análisis se hacen siempre a partir de diluciones si los alimentos son líquidos la dilución es evidente, la homogenización de los alimentos sólidos en un diluyente esterilizado es necesaria para obtener una suspensión (suspensión madre) que se puede diluir después a discreción.

- Se utiliza una licuadora limpia, desinfectada y esterilizada, para la homogenización de productos sólidos.
- Esta homogenización se realiza en zona estéril (del mechero).
- La técnica más simple para obtener una dilución de concentración conocida consiste en pesar la cantidad exacta del alimento de una manera estéril, en un recipiente esterilizado (el recipiente de la mezcladora) que contiene ya una cantidad conocida de diluyente esterilizado también.
- La frecuencia de éste análisis debe ser semanal.
- Para la toma de muestra de la materia prima se aplica NE 04-01 "TECNICA TOMA DE MUESTRAS", Métodos de Ensayos Microbiológicos.

- Para el etiquetaje de las muestras se aplica NE 04-03 "ETIQUETAJE DE LAS MUESTRAS". Métodos de Ensayos Microbiológicos.
- Para la determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesofilos, véase la NE 03-01 "DETERMINACION DEL CONTEO TOTAL DE MICROORGANISMOS AEROBIOS VIABLES". Métodos de Ensayos Microbiológicos.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

$$K^1 = \frac{NMP - 1}{NMP - 2}$$

NMP - 1 = Número más probable de microorganismos viables antes del lavado en Unid/Gr.

NMP - 2 = Número más probable de microorganismos viables después del lavado en Unid/Gr.

El efecto del lavado se considera satisfactorio cuando  $K^1 > 10$

Norma Extranjera Consultada:

Norma Búlgara.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>EFECTOS DEL ESCALDADO</u>	N.E 03-05 1992
---	--	----------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece el efecto del escaldado en productos de frutas y vegetales antes de envasarse.

### 2.- GENERALIDADES:

2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realiza por duplicado.

2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Muchos productos vegetales se escoldan brevemente con el fin de obetener la materia y detener los procesos enzimáticos, provoca, además, una disminución considerable de la microflora que porta la materia. El efecto de la elevada temperatura (aproximadamente 100°C) o que se realiza el blanqueo, provoca, de manera general, la eliminación de todas las formas vegetativas de los microorganismos; aunque esto último depende del grado de contaminación que tenga la materia. Las esporas, principalmente de bacilos, el blanqueo no logra eliminarlas (salvo muy raras excepciones) procrea únicamente el debilitamiento de su capacidad de desarrollo.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1.- Vasos estériles para la toma de muestra.
- 2.- Agua estéril.
- 3.- Balanza.
- 4.- Pipetas.
- 5.- Tubos de ensayos.
- 6.- Placas de Petri.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar.

- a) Etiquetaje de las muestras. VEASE LA N.E.04-03 "CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES". Métodos de ensayos Microbiológicos. Etiquetaje de las muestras.
- b) Técnica de toma de muestras. VEASE LA N.E.04-01 "CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES". Métodos de Ensayos Microbiológicos. Técnica de toma de muestras.

##### 5.2. Siembra:

Para realizar la determinación del conteo total de Microorganismos mesofilos viables:

- VEASE N.E. 03-01. Métodos de Ensayos Microbiológico. Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesofilos viables.
- Para realizar la determinación de esporas aerobios y anaerobios mesofilos VEASE N.E. 03-02. Métodos de Ensayos Microbiológicos. Determinación de Esporas.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

El efecto microbiológico del blanqueado se determina comparando el número total microbico del producto después del blanqueado con el número de las esporas de los microorganismos aeróbicos y anaerobicos facultativos en el mismo.

Donde:

$$EB = \frac{NTM}{C}$$

EB = Efecto del blanqueo.

NTM = Número total microbico del producto blanqueado (Unid/g)

C = Número de esporas de los microorganismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos (Unid/g).

Valoración del Blanqueo	Bueno	Malo
EB	1-1.3	Más de 1.3

Norma Extranjera consultada:

Norma Búlgara.

Bibliografía Consultada:

Fernández Pedro. Microbiología de conservas de frutas y vegetales. Editorial Pueblo y Educación. Habana, Cuba. 1983 (Pág. 35).

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>DETERMINACION DEL CONTROL MICROBIO- LÓGICO EN ESPECIES Y OTROS CONDIMENTOS</u>	N.E. 03-06 1992
---	--	-----------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación del control microbiológico en especies y otros condimentos.

### 2.- GENERALIDADES:

- 2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realizará por duplicado.
- 2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.
- 2.3. Para la preparación de medios de cultivos y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.
- 2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizarán en condiciones estériles.
- 2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

### 3.- FUNDAMENTOS DEL METODO:

En las concentraciones normalmente empleadas, las especies y condimentos carecen de acción bacteriostáticas, si bien pueden cooperar con otros compuestos en prevención del crecimiento microbiano. Los distintos lotes de especies tienen diferente poder según su origen, si son más o menos inyectivos y si se almacenaron enteros o molidos. El poder inyectivo varía con las distintas especies y microorganismos.

La canela y el clavo que contienen aldenido cinámico y el eugenol respectivamente, son generalmente más bacteriostático que las demás especies. La pimienta molida es menos inhibidora que la canela y el clavo; y la mostaza y nuez moscada y jengibre son todavía menos. El zorrillo, hojas de laurel, romero, pimienta negra y otros tienen solamente un ligero poder inhibidor contra la mayoría de los microorganismos, pudiendo incluso estimular al crecimiento de algunos, como por ejemplo: levaduras y mohos, concentraciones relativamente elevadas de las especies más efectivas, permiten el crecimiento micelial de algunos mohos, pero inhiben la formación de esporas asexuales.

El peligro de contaminación de las conservas en los que se usan condimentos, aumenta porque no se le puede dar tratamiento térmico, pues esto haría que perdieran cualidades más preciadas. Lo más recomendado para disminuir la contaminación que proviene de los condimentos es la aplicación de un lavado mecánico, siempre que sea posible.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

1. Placas de petri.
2. Pipetas.
3. Tubos con agua estéril.
4. Agar plate count.
5. Agar extracto de malta o Agar sabouraud maltosa.
6. Caldo nutritivo.
7. Medio líquido de tioglicolato.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Técnica de toma de muestra VEASE N.E. 04-01 "Conservas de Frutas y Vegetales". Métodos de ensayos Microbiológicos. Técnica de toma de muestra.

##### 5.2. Siembra:

- 5.2.1. Para realizar la determinación del conteo total de Microorganismos mesófilos viables VEASE N.E. 03-01 "Conservas de Frutas y Vegetales". Métodos de ensayos microbiológicos. Determinación del conteo total de microorganismos aerobios mesófilos viables.

- 5.2.2. Para realizar la determinación de hongos filamentosos y levaduras viables VEASE N.E. 03-03 "Conservas de Frutas y Vegetales". Métodos de ensayos microbiológicos. Determinación de hongos filamentosos y levaduras viables.
- 5.2.3. Para realizar la determinación de esporas VEASE N.E. 03-02 "Conservas de frutas y vegetales" Métodos de ensayo microbiológico. Determinación de esporas.

Bibliografía consultada:

- Frazier W.C. Microbiología de los Alimentos.  
3a. edición. Editorial Acribia, España. 1985 (Pág. 159).

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  TINCION SIMPLE	N.E 03-07  1992
---	---	--------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la elaboración de preparados coloreados para las observaciones por el microscopio de las diferentes características morfológicas de los microorganismos.

2.- GENERALIDADES:

2.1. Para la preparación de la muestra sólida se utilizará agua estéril.

2.2. Mantener normas de asepsia en su manipulación por si no mueren todos los microorganismos y los que quedan con vida pueden acarrear infecciones.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Los preparados coloreados son los más usados en la práctica, debido a que con ellos se pueden observar los microorganismos con mayor claridad y así definir con exactitud su forma y algunas particularidades de su estructura como son: La presencia de cápsulas, esporas, flagelos, etc.

Cuando los preparados se colorean con un solo colorante reciben el nombre de Tinción Simple. Con ella los microorganismos se tiñen rápidamente y se observan principalmente su forma y tamaño.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Portaobjetos limpios y desgrasados.
- Tubo con cultivo en medio líquido y sólido.
- Frasco con tintes o disoluciones colorantes.
- Tubo con solución de agua estéril o solución fisiológica estéril.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Si se trabaja con muestra sólida, se debe agregar una gota de agua estéril o solución fisiológica en el centro del portaobjeto con un asa estéril y agregar una pequeña porción de las colonias que crecieron en el medio de cultivo.

### 5.2. Preparación del Frotis:

- 5.2.1. Encienda el quemador y regule adecuadamente la llama.
- 5.2.2. Pase 2 ó 3 veces el cristal portaobjetos por la llama y colóquelo sobre la mesa, al pie del quemador.
- 5.2.3. Esterilice correctamente el asa, hasta ponerla al rojo y déjela enfriar cerca de la llama.
- 5.2.4. Tome con el asa una gota del tubo con cultivo en el centro del cristal portaobjeto y extiéndala cuidadosamente con movimiento giratorio del asa en un diámetro aproximado de 1,5cm.
- 5.2.5. Esterilice inmediatamente el asa a la llama hasta que se ponga roja.

### 5.3. Secado de la Extensión:

Se puede realizarse mediante el secado al aire y el secado a la llama.

Para el primero mantenga el frotis, una vez elaborado al pie del quemador a temperatura ambiente o en una incubadora a 37°C, hasta que se evapore toda la humedad contenida en la extensión y quede completamente seca. Para que el secado a la llama sea rápido, sitúe el portaobjeto sobre la llama del quemador, teniendo cuidado de que esté lo suficientemente alto como para que no se caliente mucho, ya que el calentamiento intenso y rápido del portaobjeto puede provocar deformaciones de las células.

#### 5.4. Fijado del preparado:

Existen dos métodos para fijar el preparado que son el método físico y el químico. El primero consiste en pasar al preparado por la llama del quemador 3 ó 4 veces consecutivas (la llama debe lamer la parte inferior del portaobjeto y el frotis debe quedar en la parte superior de éste), es decir, el frotis debe tener contacto directo con la llama. Dicho proceso alcanza una temperatura entre 65 y 70°C. El segundo método consiste en cubrir el frotis con alcohol etílico, acetona, etc. durante 3 ó 5 min. Este método se utiliza cuando se desea estudiar la estructura de la célula.

En los dos métodos anteriores las proteínas de los microorganismos se coagulan en parte, lo que provoca su muerte adhiriéndose fuertemente al cristal. Esto evita que los microorganismos se corran con el colorante al teñirlos y al lavar el preparado; además facilita la coloración de las células, ya que la materia orgánica muerta se colorea con más rapidez.

#### 5.5. Coloración del Preparado:

- 5.5.1. Coloque el portaobjeto sobre el soporte de la cuba de tinción.
- 5.5.2. Cubra la extensión con alguna de las soluciones colorantes, preferiblemente fenicadas, violeta de metilo o azul de metileno.
- 5.5.3. Tome con la pinza el portaobjetos y vierta el residuo de solución, colorante en la cuba.
- 5.5.4. Lavado del Preparado:

Para lavar el preparado, mantenga el cristal portaobjeto con cierta inclinación y vierta agua sobre la superficie del portaobjetos utilizando el frasco lavador, hasta que el agua corra completamente limpia.

#### 5.5.5. Secado del preparado:

Es una operación importante, pues evita que el agua contenida en el dañe el microscopio. Si esta operación no se hiciera se dificultaría la observación. Este secado se realiza con un papel absorbente (teniendo cuidado de no dañar la extensión) o a la llama del quemador; pero sin que este toque el cristal.

Los microorganismos, una vez fijados, absorben los colorantes por el fenómeno de la ósmosis y por afinidad química entre sus células y los distintos colorantes.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Después de finalizar las operaciones, observe al microscopio el preparado elaborado. A continuación analice y anote los siguientes resultados:

- Forma del microorganismo.
- Modo de agrupación de sus células.
- Otras características.

#### Bibliografía consultada:

Fernandez Pedro: Microbiología General de los Alimentos.  
Ed. Pueblo y Educación, Cuba. 1987.  
(Pág. 119).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS</b>  <u>TINCIÓN DE GRAM</u>	<b>N.E.</b>  <b>03-08 1992</b>
---	--	--

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la elaboración de preparados coloreados para las observaciones por el microscopio de las diferentes características morfológicas de los microorganismos.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Para la preparación de la muestra se utiliza agua estéril.

2.2. Mantener normas de asepsia en su manipulación por si no mueren todos los microorganismos y los que quedan con vida pueden acarrear infecciones.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

La tinción de Gram, es la coloración diferencial más usada en la microbiología y se emplea con mucha frecuencia para la clasificación de los microorganismos.

En este tipo de tinción los microorganismos pueden adquirir las tonalidades en dependencia de la especie, las que pueden ser de violeta a negra o de rosada a rojo. Aquellos microorganismos que tiñen de violeta a negro son denominados Gram-positivos y los que se tiñen de rosado a rojo se les denomina Gram-negativos.

4.- **APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Portaobjeto limpio y desgrasado.
- Tubo con cultivo en medio sólido
- Tubo con solución fisiológica estéril o agua estéril.
- Frasco con violeta cristal, fenicada.
- Frasco con solución de lugol.
- Frasco con alcohol de 95° (absoluto)
- Fucsina fenicada diluida o sufranina.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Para determinar si un microorganismos es Gram-positivo o negativo es necesario emplear cultivos frescos de ellos (no después de 48 h. de sembrado); los cultivos viejos sufren alteraciones que pueden provocar resultados erróneos y dar por Gram-positivo un microorganismo Gram-negativo o viceversa.

### 5.2. Preparación del frotis:

- a) Coloque con el asa una gota de solución fisiológica o agua estéril en el centro del portaobjeto.
- b) Tome con el asa esterilizada y enfriada junto a la llama una pequeñísima porción de las colonias que crecieron en la superficie del medio tratando de no romperla.
- c) Haga una suspensión microbiana del material tomado, en la gota de solución fisiológica y extendiéndola del mismo modo descrito en la tinción simple.

### 5.3. Secado de la extensión:

- a) Seque y fije la extensión de la misma manera que en la tinción simple.

### 5.4. Coloración de preparado:

- a) Cubra la extensión con violeta fenicada y déjela actuar durante 2 min. si la solución colorante tiene precipitado es recomendable cubrir el preparado de pedazos de papel filtro sobre el cual se añade el colorante.
- b) Vierta el exceso de colorante en la cuba.
- c) Cubra el preparado con solución de lugol y déjelo actuar entre 30 y 60 Seg.
- d) Vierta el exceso de lugol en la cuba.
- e) Cubra el preparado con alcohol de 95° y déjelo actuar durante 1 min.

- f) Lave inmediatamente con agua guiándose por el método descrito en la tinción simple.
- g) Cubra el preparado con fucsina fenicida o zafranina y déjelo actuar durante 1 minuto.
- h) Vierta el exceso de colorante.

5.5. Lave y seque el preparado del mismo modo que en la tinción simple.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Observe el preparado por el microscopio con el lente de inmersión y anote los siguientes resultados:

- Forma del microorganismo.
- Color tomado por la célula microbiana
- Otras características.

El comportamiento de algunos microorganismos a la coloración de Gram., se puede observar en la siguiente tabla:

<u>MICROORGANISMOS GRAM-POSITIVOS</u>	<u>MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS</u>
1- Casi todos los cocos con excepción del gonococo y meningococos.	1- Todos los representantes del grupo coliforme.
2- Casi todos los bacilos.	2- Los géneros proteus, salmonellas, shigella, etc.
3- Levaduras.	3- Las bacterias acéticas.
4- Todas las bacterias ácido lácticos.	4- Una gran parte de las bacterias fluorescentes.

Bibliografía consultada:

Fernández Pedro: Microbiología General de los Alimentos.  
Ed. Pueblo y Educación, Cuba. 1987.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  TINCION DE ZIEHL - NIELSEN	N.E. 03-09 1992
---	---	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la elaboración de preparados coloreados compuestas para las observaciones por el microscopio, el estudio más minucioso de los microorganismos.

2.- GENERALIDADES:

2.1. Para la preparación de la muestra sólida se utilizará agua estéril.

2.2. Mantener normas de asepsia en su manipulación por sí no mueren todos los microorganismos y los que quedan con vida pueden acarrear infecciones.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Algunos microorganismos están rodeados de una cubierta constituida por lípidos y lipoides, la cual dificulta la coloración de la célula microbiana y debido a esto los microorganismos se tiñen débilmente. Una vez teñidas retienen el color, incluso al lavarlos con alcohol acidulado.

Los microorganismos que no son decolorados con este alcohol acidulado y que retienen el color rojo de la fucsina reciben el nombre de ácido resistentes a causa de su resistencia a los ácidos, que son incapaces de decolorarlos. Sin embargo, los microorganismos que no tienen esta composición y que se decoloran fácilmente con alcohol acidulado, se denominan ácidos no resistentes.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Portaobjetos limpios y desgrasado.
- Tubo con cultivo en medio sólido o líquido.
- Tubo con solución fisiológica estéril o agua estéril.
- Frasco con fucsina fenicada de ziehl.
- Frasco con alcohol etílico acidulado.
- Frasco con azul de metileno de loeffler.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Si se trabaja con muestra sólida se debe agregar una gota de solución fisiológica estéril o agua en el centro del portaobjeto con una asa estéril y agregar una pequeñísima porción de las colonias que crecieron en el medio de cultivo.

### 5.2. Preparación del Frotis:

Prepare el frotis o extensión del mismo modo indicado en la tinción simple.

### 5.3. Secado de la Extensión:

Séquela del mismo modo indicado en la tinción simple.

### 5.4. Fijado del preparado:

Fijelo del mismo modo indicado en la tinción simple.

### 5.5. Coloración del Preparado:

5.5.1. Cubra el preparado con la fucsina fenicada de ziehl.

5.5.2. Caliente sobre la llama del quemador el preparado con la fucsina, tomándolo con una pinza y colocándolo a una altura prudencial de la llama donde le de suficiente calor, pero que no hierva, manténgalo así hasta que se desprendan los primeros vapores.

En esta operación el calor va a facilitar la penetración del colorante en las células de los microorganismos ácido-resistente.

5.5.3. Después de desprendidos los primeros vapores colóquelos sobre el soporte de la cuba de tinción y espere aproximadamente 3 minutos; en caso de secarse se le añade colorante de nuevo hasta cubrir todo el preparado.

5.5.4. Lave con agua abundante.

5.5.5. Decolore con alcohol acidulado, cubriendo totalmente el preparado con dicho alcohol y déjelo actuar durante 1 minuto.

- 5.5.6. Lave el preparado con agua abundante.
- 5.5.7. Coloreé con azul de metileno de Leoffler, cubriendo el preparado totalmente y dejándolo actuar entre 3 a 5 minutos.
- 5.5.8. Lave y seque.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Los microorganismos ácido-resistentes conservan el color rojo de la fucsina, mientras que los no ácidos-resistentes se decoloran. Al agregar el azul de metileno de Leoffler, los microorganismos no ácido-resistentes se tñen de azul, pero los ácido-resistentes conservan el color rojo por ser de mayor intensidad que el azul.

Después de realizar las operaciones, observe por el lente de inmersión y anote los siguientes resultados:

- Forma del microorganismo.
- Color que tomó la célula.
- Otras características.

#### Bibliografía Consultada:

Fernández Pedro: Microbiología General de los Alimentos.  
Ed. Pueblo y Educación, Cuba. 1987 (Pág.122-123).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  PREPARADO DE LA GOTA PENDIENTE</b>	<b>N.E.  03-10 1992</b>
---	---	-------------------------------------

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la elaboración de preparado incoloro natural o nativos, donde se pueden detectar el movimiento, la reproducción y el proceso de formación de esporas.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Mantener normas de asepsia en la elaboración y manipulación de estos preparados para evitar contaminación con los microorganismos.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

La elaboración de preparados vivos por este método es más difícil, pero tiene la ventaja de que se crea una cámara de humedad, la cual dificulta la desecación del preparado y debido a esto el tiempo posible de observación es mayor. Por consiguiente, si se mantienen las condiciones requeridas (temperatura de cultivo, etc.), se puede observar el proceso de segmentación de las bacterias, así como la gemación de las levaduras, etc.

4.- **APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Portaobjeto con una excavación, limpio y desgrasado.
- Cubreobjetos.
- Varilla de cristal.
- Frasco con aceite de cedro o vaselina estéril.
- Tubo con cultivo en medio sólido o líquido.
- Tubo con solución fisiológica estéril o agua estéril.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

5.1. Preparación de la muestra a analizar: En la preparación de la muestra se debe tener los siguientes cuidados:

- Que la gota sea completamente esférica y no muy grande para evitar que tope con el fondo de la concavidad.
- Que las manipulaciones sean rápidas para evitar contaminaciones.
- Que se mantenga una rigurosa asepsia.

5.2. Preparación del Frotis:

- 5.2.1. Encienda el mechero y regule adecuadamente la llama.
- 5.2.2. Sitúe el cristal cubreobjeto completamente limpio sobre la mesa al pie del quemador.
- 5.2.3. Esterilice correctamente el asa hasta ponerla al rojo y déjela enfriar cerca de la llama.
- 5.2.4. Tome con el asa una gota de la solución fisiológica estéril o agua estéril, de la manera indicada para la manipulación de cultivos y deposítela en el centro del cristal cubreobjetos.
- 5.2.5. Esterilice nuevamente el asa hasta ponerla al rojo y déjela enfriar cerca de la llama.
- 5.2.6. Tome con el asa pequeñísima porción de la colonia desarrollada sobre el medio de cultivo sólido y haga una suspensión microbiana en la gota del cubreobjeto, sin que esta se esparza por el cristal.
- 5.2.7. Esterilice inmediatamente el asa.
- 5.2.8. Con la varilla de cristal unte ligeramente con aceite de cedro o vaselina el borde de la concavidad del cristal portaobjetos.
- 5.2.9. Coloque invertido el portaobjetos que contiene concavidad, de tal manera que la gota se coloque en el centro de la concavidad y que el aceite de cedro o vaselina adhiera un cristal al otro.

- 5.2.10. Haga un viraje rápido de los dos cristales unidos, de modo que la gota quede colgada en el centro de la cavidad.

6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Después de realizar las operaciones, observe por el microscopio con el objetivo seco de mayor aumento así como con el de inmersión y con el diafragma suficientemente cerrado para que en el campo visual, las células microbianas brillen en contraste con la oscuridad del campo, durante la observación en el microscopio tenga mucho cuidado en no romper el cubreobjeto con los objetivos. A continuación analice y anote los siguientes resultados:

- Movilidad de los microorganismos.
- Forma de los microorganismos.
- Otras características.

Bibliografía Consultada: Fernández Rubiera Pedro. Microbiología General de los Alimentos. Ed. Pueblo y Educación, Cuba. (Pág. 127 - 128).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  PREPARADO NATURAL CUBIERTO</b>	<b>N.E.  03-11 1992</b>
---	---	-------------------------------------

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la elaboración de preparados incoloro donde se pueden detectar el movimiento, la reproducción y el proceso de formación de esporas.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Mantener normas de asepsia en la elaboración y manipulación de estos preparados para evitar contaminación con los microorganismos.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

En estos preparados, los microorganismos permanecen vivos y debido a la transparencia de sus células al ser observados por el microscopio no se ven con la nitidez conque se observaron los preparados coloreados, pero tienen la ventaja que mediante ellos se pueden detectar el movimiento, la reproducción y el proceso de formación de esporas tal y como se realizan por los distintos microorganismos.

4.- **APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Portaobjetos limpios y desgrasados.
- Cubreobjetos.
- Tubo con cultivo en medio líquido.

5.- **PROCEDIMIENTO:**

5.1. **Preparación de la muestra a analizar:**

Debe tener sumo cuidado en no depositar una gota grande sobre el cristal portaobjetos para evitar que se derrame por los bordes cuando sea aplastada por el cubreobjeto. Después de elaborado debe localizarse rápidamente para evitar que se seque y poder efectuar correctamente el análisis.

### 5.2. Preparación del frotis:

- 5.2.1. Encienda el mechero y regule adecuadamente la llama.
- 5.2.2. Pase 2 ó 3 veces el cristal portaobjetos por la llama y dépositelo sobre la mesa al pie del quemador.
- 5.2.3. Esterilice correctamente el asa hasta ponerla al rojo y déjela enfriar cerca de la llama.
- 5.2.4. Tome con el asa una gota del tubo con cultivo y colóquelo en el centro del cristal portaobjetos.
- 5.2.5. Esterilice nuevamente el asa a la llama hasta que se ponga al rojo.
- 5.2.6. Sitúe con mucho cuidado el cubreobjeto sobre la gota de cultivo.

### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Después de realizar las operaciones, obsérvelo por el microscopio con el objetivo de inmersión y con el diafragma lo suficientemente cerrado para que en el campo visual, las células microbianas brillen en contraste con la oscuridad del campo. A continuación analice y anote los resultados:

- Forma de los microorganismos.
- Movilidad.
- Otras características.

#### Bibliografía Consultada:

Fernández Ramón Pedro: Microbiología General de los Alimentos. Ed. Pueblo y Educación, Cuba 1987 (Pág. 126-127).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS</b>  <b><u>COLORACION DE ESPORAS</u></b>  <b>METODO DE FULTON</b>	<b>N.E.</b>  <b>03-12 1992</b>
---	---	--

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la elaboración de preparados especiales coloreados que se utilizan para examinar distintas estructuras de la célula microbiana.

2.- **GENERALIDADES:**

- 2.1. Para la preparación de la muestra sólida se utilizará agua estéril.
- 2.2. Mantener normas de asepsia en su manipulación por sino mueren todos los microorganismos y los que quedan con vida pueden acarrear infecciones.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

En cierta etapa de su desarrollo un gran número de microorganismos tienen la propiedad de formas esporas. Esta característica es un índice diferencial de ellos; para su estudio se utilizan colorantes con grandes concentraciones y además se calienta el frotis; de otra forma no se obtendría una coloración clara, debido a que las esporas están cubiertas de una capa dura e impermeable, que dificulta su tinción.

4.- **APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Portaobjetos limpios y desgrasados.
- Tubo con cultivo de bacilo en medio sólido, con dos días de sembrado.
- Tubo con solución fisiológica estéril o agua estéril.
- Frasco con verde de malaquita (solución acuosa al 0.5%)
- Frasco con safranina (solución acuosa al 0.5%).

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Preparación de la prueba a analizar.

Quando se trabaja con muestra sólida se debe agregar una gota de solución fisiológica estéril o agua estéril en el centro del portaobjeto con una asa estéril y agregar una pequeñísima porción de las colonias que crecieron en el medio de cultivo.

### 5.2. Preparación del Frotis:

5.2.1. Prepare el frotis del mismo modo que la tinción de Gram.

### 5.3. Secado del Frotis:

Seque el frotis del mismo modo que la tinción de Gram.

### 5.4. Fijado del preparado:

Fijelo del mismo modo indicado en la tinción de Gram.

### 5.5. Coloración del preparado:

5.5.1. Cubra el cristal con verde malaquita y caliente a la llama hasta que surjan vapores, continuando el calentamiento de 30 s. a 1 min. y añada más colorante en caso de que se seque.

5.5.2. Lave con agua el preparado aproximadamente de 30 s. a 1 min.

5.5.3. Aplique la solución de safranina y déjela actuar por un tiempo de 30 s. a 1 min.

### 5.6. Lave con agua y seque.

**6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:**

Después de realizar las operaciones, observe el preparado por el microscopio con el lente de inmersión, anote y analice los siguientes resultados:

- Color de las esporas y color de la parte vegetativa de la célula.
- Posición de la espora en la célula.
- Diámetro de la espora con respecto al diámetro de la parte vegetativa.

**Bibliografía Consultada:**

Fernández Rubiera Pedro: Microbiología General de los Alimentos.  
Ed. Pueblo y Educación, Cuba. 1987.  
(Pág. 124-125).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>PREPARACION DE SOLUCIONES COLORANTES</u></b>	<b>N.E.  03-13 1992</b>
---	---	-------------------------------------

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece la preparación de soluciones colorantes para la elaboración de preparados coloreados.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Para la preparación de soluciones colorantes se empleará "Agua destilada para Análisis".

2.2. Para la preparación de soluciones colorantes se empleará alcohol absoluto.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

Para preparar estas soluciones se utiliza fundamentalmente la anilina, con reacciones ácidas, básicas o neutras. Los tintes de anilina con reacción básica, son los que mayor aplicación encuentran, debido a que colorean con más facilidad la célula bacteriana. Los de reacción ácido y neutro se usan sobre todo, como colorantes de contraste, o sea para darle determinado fondo al preparado.

Los colorantes básicos empleados son: Fucsina básica, violeta de metileno, violeta cristal, safranina y azul de metileno.

4.- **APARATOS Y UTENSILIOS:**

- Frascos ámbar.
- Fucsina básica (polvo o cristal).
- Azul de metileno (polvo o cristal).
- Violeta Genciana (polvo o cristal).
- Verde malaquita (polvo o cristal).
- Alcohol Absoluto (polvo o cristal).

5.- PROCEDIMIENTO:

5.1. Se preparan soluciones alcohólicas saturadas (solución madre) y de ésta se prepara solución acuosa.

5.2. Preparación de solución alcohólicas saturada:

- Fucsina básica 3 gr. en 100 ml de alcohol absoluto.
- Azul de metileno 7 gr. en 100 ml de alcohol absoluto.
- Violeta genciana 4.8 gr. en 100 ml de alcohol absoluto.

5.3. Preparación de solución acuosa saturada:

- Azul de metileno 6.7 gr. en 100 ml de agua destilada.
- Violeta genciana 1.5 gr. en 100 ml de agua destilada.

5.4. Preparación de Violeta genciana fenicada:

- Solución alcohólica de violeta genciana 5 ml.
- Solución de fenol al 5% 95 ml.

5.5. Fucsina fenicada de Ziehl:

- Solución alcohólica de fucsina básica 10 ml.
- Solución de fenol al 5% 100 ml.

5.6. Fucsina fenicada diluida para Gram:

- Fucsina fenicada de ziehl 10 ml.
- Agua destilada 100 ml.

5.7. Verde malaquita (para tinción de esporas):

- Verde malaquita 5 gr.
- Agua destilada 100 gr.

## Bibliografía consultada:

Rubiera Fernández, Pedro. **Microbiología General de los Alimentos.** Ed. Pueblo y Educación. Cuba, 1987.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  PRUEBAS TERMOSTÁTICA	N.E.  03-14 1992
---	---	---------------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece la prueba de estabilidad para detectar la microflora restante.

### 2.- GENERALIDADES:

2.1. Durante la esterilización industrial no siempre se matan todos los microorganismos presentes en la conserva, aquellos que quedan con vida después de este proceso, forman la microflora restante.

2.2. Los microorganismos que forman la microflora restante son importantes porque pueden descomponer la conserva a pesar de que no produzcan fugas en el cierre. Estos al terminar la esterilización se encuentran en estado latente, pero pasado cierto tiempo pueden llegar a desarrollarse y producen la descomposición si el número de microorganismos es grande y las condiciones de almacenamiento no son adecuadas.

2.3. La existencia de la microflora restante depende de:

- a) La microflora antes de la esterilización.
- b) La composición química del producto.
- c) Como se realice el proceso de esterilización.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

La incubación de las conservas consiste en colocar de cada partida o autoclave 5 a 10 muestras, latas o pomos en una incubadora que las mantenga a temperatura de 37°C por 10 días e igual número de muestras en una incubadora que las mantenga a temperatura de 57°C por 3 días. Las muestras colocadas se observan diariamente y en caso que se detecte abombado en alguna, hay que esterilizar de nuevo toda la partida o deshecharla.

El objetivo con el se realiza la incubación es para detectar la microflora restante, pues en ella se crean condiciones para que los microorganismos que quedaron con vida se desarrollen y produzcan el gas que abomba la conserva. Este abombado permite detectar la presencia de microflora restante.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- Detergente.
- Paño limpio y seco.
- Alcohol de 70°.
- Algodón esterilizado.

#### 5.- PROCEDIMIENTOS:

- 5.1. Se lavan las latas con detergente y agua.
- 5.2. Se secan con un paño limpio y seco.
- 5.3. Se limpia la superficie exterior de los envases que contienen el alimento a incubar, con alcohol de 70° sobre algodón esterilizado.
- 5.4. Se rotula el envase con la fecha de entrada y salida de incubación.
- 5.5. Incubar a la temperatura deseada 37° por 10 días ó 57°C por 3 días.
- 5.6. Observar diariamente las muestras.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

La única señal que nos indica la presencia de microflora restante es el abombado, sin embargo, existen microorganismos que pueden descomponer las conservas sin abombarlos, por lo que podríamos dar por bueno un producto altamente contaminado.

Es recomendable que además de la incubación de las muestras de un lote, se realicen análisis microbiológicos de las conservas antes y después de la esterilización del mismo lote.

Norma Extranjera Consultada:

Norma Búlgara.

Bibliografía Consultada:

Rubiera Fernández Pedro: Microbiología de conservas de frutas y vegetales. Ed. Pueblo y Educación, Habana. Cuba 1983. (Pág. 51, 52, 53).

<b>EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO</b>	<b>CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS</b>  <b>CONTEO DIRECTO DE HIFAS DE MOHOS POR EL METODO DE HOWARD</b>	<b>N.E.</b>  <b>03-15 1992</b>
---	--	--

1.- **ALCANCE:**

Esta norma establece el conteo directo de hifas de mohos, por el método de Howard especialmente en productos de tomate.

2.- **GENERALIDADES:**

2.1. Para la preparación de la muestra se utilizará agua destilada para análisis.

2.2. Para efectuar el conteo se debe utilizar un microscopio compuesto con tornillo de movimiento del objeto o platina móvil.

2.3. La cámara Howard y el cubreobjeto, deben ser lavados con agua destilada e introducidos en alcohol absoluto.

3.- **FUNDAMENTO DEL METODO:**

Este conteo es muy importante para la determinación de la calidad microbiológica de una buena cantidad de productos, como los de tomate para lo cual fue creado.

En este conteo se utiliza la cámara Howard, la cual es un portaobjetos grueso, que posee en su centro un retículo rectangular o circular hundido a una profundidad de 0.1 mm. junto a éste hay unos canales para el derramamiento de líquido sobrante y al lado de ellos, unas superficies sobresalientes de apoyo donde se coloca el cubreobjeto.

En el interior del retículo, se han grabado sobre el cristal dos líneas paralelas que tienen una separación de 1,382 mm.

A observar se abarca una superficie de 1,5 mm y se analiza un volumen de líquido de 0,15 mm, para lograr esto hay que valerse de las líneas paralelas que deben quedar tangenciales al campo.

Este método tiene aplicación internacional y se exige para los productos de tomate, como índice internacional de calidad. No se permite una cantidad mayor al 40% de campos positivos, ya que ésto indica el 2% de materia en mal estado y lo que se cuenta en el análisis son hifas muertas que no provocan descomposición del producto, pero sí indican el índice de calidad del material con que fue elaborado.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1- Microscopio compuesto con tornillo de movimiento.
- 2- Cámara de Howard con cubreobjetos.
- 3- Gamuza o papel filtro.
- 4- Microespátula de acero inoxidable.
- 5- Pasta de tomate.
- 6- Alcohol absoluto.
- 7- Agua destilada.
- 8- Refractómetro.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

- a) Tomar una pequeña porción del producto y diluir con agua destilada hasta obtener una concentración de 8,5 a 9,5% de sólidos solubles al refractómetro.

##### 5.2. Conteo:

- a) Preparación de la cámara de Howard: agregar muestra al portaobjeto y cubrir con el cubreobjeto de manera que no quede muestra en abundancia.
- b) Observar el ocular y mediante los tornillos de movimiento del objeto, buscar el campo superior izquierdo, mirarlo con detenimiento tratando de encontrar las hifas de mohos.
- c) Si hay hifas o un segmento de hifas superiores a 1/6 de campo, entonces éste es positivo.
- d) Si no hay hifas o hay un segmento inferior a 1/6 del campo, entonces es negativo.
- e) Por campo del microscopio, se entiende el espacio de la cámara que se observa en una posición fija del microscopio.

- f) Para poder observar otro campo es necesario trasladarse hacia él, pero la cámara no tiene ninguna guía para hacerlo; entonces nos valemos de los tornillos de movimiento del objeto que se mueve hacia los lados, hacia atrás y adelante y utilizamos como guía una partícula oscura del producto.
- g) Seleccione una partícula del producto que éste en el extremo opuesto a que se moverá la cámara mediante el tornillo de movimiento lateral, observando la partícula seleccionada de manera que atraviere todo el campo y se deje de ver; entonces estará en el segundo campo.
- h) Prosiga hacia otro campo de la manera explicada, en la misma dirección y sentido, hasta obtener 25 campos.
- i) Cuando hay dudas sobre si una pieza observada es hifa o no, ésta se puede situar en el centro del campo momentáneamente y mirarlo con aumentos mayores; una vez aclarados éstos, se colocan los aumentos originales, se retorna en el campo a su puesto y se continúa el trabajo.
- j) Deben contarse al menos 25 campos, es recomendable hacer dos montajes de la cámara, contando en cada uno 25 campos. Si al realizar la comparación difieren en tres campos o más, se recomienda hacer un tercer montaje y conteo de 25 campos. Los resultados de los conteos se promedian para obtener el resultado final.

## 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

6.1. Con el promedio obtenido se calcula el porcentaje de campos positivos por medio de la siguiente formula:

$$\% \text{ HOWARD} = \frac{\text{No. DE CAMPOS POSITIVOS}}{\text{No. DE CAMPOS OBSERVADOS (TOTALES)}} \times 100$$

### Bibliografía Consultada:

Fernández Pedro: Microbiología de Conservas de Frutas y Vegetales.  
Editorial Pueblo y Educación.  
Habana, Cuba. 1988.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SRBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS VALORIZACION ESTADÍSTICA DE LOS RESULTADOS DEL CONTEO DE LOS MOHOS (HOWARD)	N.E. 03-16 1992
---	---	-----------------------

### 1.- ALCANCE:

Esta norma establece la valorización estadística de los resultados del conteo de los mohos por el método de Howard, para lotes de producción.

### 2.- GENERALIDADES:

2.1. Un lote se considera no standard, cuando el valor medio determinado X es mayor de  $L + (T \cdot S_x)$ .

2.2. L= requisito del comprador (Howard %).

2.3. T= factor que depende del número de muestras analizadas y la probabilidad necesaria para aceptación 95%.

Para	2	muestras	T =	2.92
Para	5	muestras	T =	2.01
Para	10 ó más	muestras	T =	1.81

2.4.  $S_x$  = es el error típico del valor medio donde:

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{N}}$$

N= Número de análisis efectuados (cada análisis comprende el conteo de por lo menos 2 cámaras con 25 campos de visión.

S= Diferencia típica donde  $S = \sqrt{\frac{d^2}{N-1}}$

d= Diferencia entre un resultado y el valor medio.

x= Valor medio de todos los resultados.

2.5. La valorización estadística se realiza con los resultados que se obtiene en el momento de la producción.

### 3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Para obtener criterio confiable acerca de un lote de producción, este se somete a una valorización estadística, lo que da probabilidad 95% de que el valor medio real del lote es más bajo del que está señalado en el standard.

### 4.- PROCEDIMIENTO Y EJEMPLO:

<u>No. de Pruebas</u>	<u>% Howard</u>	<u>d</u>	<u>d<sup>2</sup></u>
1	34	2.44	5.95
2	40	3.56	12.67
3	26	10.44	108.99
4	40	3.56	12.67
5	22	14.44	208.51
6	26	10.44	108.99
7	36	0.44	0.19
8	20	16.44	270.27
9	40	3.56	12.67
10	24	12.41	154.75
11	20	16.44	270.27
12	28	8.44	71.23
13	24	12.44	151.75
14	36	0.44	0.19
15	42	5.56	30.91
16	44	7.56	57.15
17	24	12.44	151.75
18	64	27.56	759.55
19	20	16.44	270.27
20	20	16.44	270.27
21	21	15.44	238.39
22	36	0.44	0.19
23	36	0.44	0.19
24	24	12.44	151.75
25	18	11.56	133.63
26	44	7.56	57.15
27	32	4.44	19.71
28	32	4.44	19.71
29	32	4.44	19.71
30	60	23.56	555.07
31	64	27.56	759.55
32	56	19.56	382.59
33	40	3.56	12.67
34	84	47.56	2,261.95
No. 34	1,239		7,550.26

$$\bar{x} = \frac{1,239}{34} = 36.44$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum d^2}{N-1}} = \sqrt{\frac{7,550.26}{33}} = 15.12$$

$$S_x = \frac{S}{\sqrt{N}} = \frac{15.12}{\sqrt{34}} = \frac{15.12}{5.831} = 2.60$$

T = 1.81, valor de T para 10 muestras o más.

L = 40 para calidad superior (Howard %).

$$L + (T \times S_x) = 40 + (1.81 \times 2.60) = 40 + 4.706$$

$$L + (T \times S_x) = 44.76$$

Cuando  $\bar{x} < L + (T \times S_x)$  el lote está en el marco del standard.

En este caso  $36.44 < 44.76$  por lo tanto el lote se puede considerar como standard.

Bibliografía Consultada:

Normas Búlgaras.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES METODOS DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS <u>DETERMINACION DEL CONTROL MICROBIO- LÓGICA EN ALIMENTOS ENLATADOS SOMETIDOS A TRATAMIENTO TÉRMICO</u>	N.E.  03-17 1992
---	---	---------------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación del control microbiológico en alimentos enlatados sometidos a tratamiento térmico.

2.- GENERALIDADES:

2.1. El método de ensayo microbiológico establecido en esta norma se realiza por duplicado.

2.2. Por agua destilada se entenderá el agua para análisis y por agua estéril el agua para análisis sometida a esterilización con vapor a presión a 121°C durante 20 minutos.

2.3. Para la preparación de medios de cultivo y reactivos se emplearán productos químicos analíticos de calidad P.A.

2.4. Para efectuar las operaciones del ensayo microbiológico se realizará en condiciones estériles.

2.5. Todos los aparatos y utensilios, utilizados para efectuar los análisis microbiológicos, estarán estrictamente limpios y esterilizados.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El método se base en la siembra microbiológica, aeróbica, anaeróbica, termofila, sobre un medio de cultivo sólido o líquido adecuado, que depende del PH de la conserva, para detectar la presencia o ausencia de microorganismos capaces de desarrollarse en condiciones normales de almacenamiento.

Para la elección del medio de cultivo se tendrá en cuenta el PH de los productos en conserva; de igual manera se ha observado que las conservas sufren descomposición de acuerdo al grupo al que pertenecen en la clasificación de los alimentos por su PH.

Así las conservas esterilizadas sufren las siguientes alteraciones:

- 1.- Grupo I, alimentos de baja o poca acidez con un PH entre 5,3 especialmente susceptibles al agriado y a la putrefacción, pero que pueden sufrir también la alteración termofílica anaeróbica; la fermentación butírica y putrefacción sulfhídrica, así como alteraciones causadas por especies mesófilas del género Bacillus.
- 2.- Grupo II, alimentos de mediana acidez con un PH entre 5,3 y 4,5 suelen sufrir alteración termofílica anaerobia, pero pueden también la putrefacción por mesófilos, la fermentación butírica y ser atacados por especies mesófilas del genero Bacillus.
- 3.- Grupo III, Alimentos ácidos con PH entre 4,5 y 3,7 frecuentemente alterados por una bacteria de la fermentación simple o agriado y por el clostridium mesófilo de la fermentación butírica; aunque pueden sufrir también el ataque de especies mesófilas del genero Bacillus.
- 4.- Grupo IV, Alimentos muy ácidos con PH inferior a 3,7; no sufren regularmente alteraciones microbianas, pero las latas pueden abombarse por la producción de hidrógeno causada por la reacción del contenido de la conserva con el envase.

Existen factores que influyen sobre la descomposición de las conservas esterilizadas, los principales son:

- 1.- La no hermeticidad en el cierre; aunque todo el proceso se realice de forma correcta, si existen fugas en el cierre, entrarán los microorganismos y producirán la descomposición de la conserva.
- 2.- Un régimen de esterilización inadecuado o una mala realización de el; si no se elige correctamente el régimen de esterilización ó se realiza mal el elegido, queda microflora restante la cual puede descomponer la conserva.
- 3.- La existencia de microflora restante: Si existe microflora restante, cosa que se pueda deber a muchos factores, hay posibilidad de descomposición.
- 4.- El enfriamiento incorrecto: Si después de la esterilización no se realiza un enfriamiento correcto, es decir rápido y hasta temperaturas relativamente bajas, se crean condiciones de temperatura para el desarrollo de la microflora restante que se desarrollaría y provocaría la descomposición de la conserva.

- 5.- El almacenamiento a alta temperatura: si el local donde se almacenan las conservas terminadas existen temperaturas elevadas, facilitará el desarrollo de la microflora restante. Esto sucede también cuando no se enfría el producto lo suficiente y posteriormente se empaacan los pomos o latas muy unidas sin permitir la expulsión del calor de los envases que están en el centro de las cajas.
- 6.- El PH elevado: como ya se ha visto, en la medida en que el PH sea mas elevado, la conserva tendrá mas posibilidades de descomposición, pues los microorganismos generalmente no se desarrollan a un PH muy bajo.

#### 4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

- 1- Vaso estéril debidamente pesado.
- 2- Agua estéril.
- 3- Abridor.
- 4- Balanza.
- 5- Cuchara metálica.
- 6- Pipetas de 10 ml estériles.
- 7- Tubos de ensayo.
- 8- Placas de Petri.

#### 5.- PROCEDIMIENTO:

##### 5.1. Preparación de la muestra a analizar:

Preparación y toma de muestra de productos enlatados. VEASE la N.E.04-02\_ "Conservas de Frutas y Vegetales". Métodos de Ensayos Microbiológicos. Preparación y toma de muestra de productos enlatados.

##### 5.2. Siembra:

- 5.2.1. Siembra Aeróbica: Se toman 2 tubos de cultivos conteniendo 10 ml aproximadamente de caldo nutritivo se inocula con 1 gr ó 1 ml de la porción de ensayo de forma aséptica. Se toma un tubo de caldo nutritivo sin inocular como testigo y se incuban a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas.

Se toman 2 placas de petri se inoculan con 1 gr ó 1 ml. de la porción de ensayo de forma aséptica, se agrega agar standard o nutritivo de 10 a 15 ml. previamente fundido y enfriado a unos 45°C, se mezcla bien y uniformemente y se deja solidificar.

Se toma una placa con agar standard o nutritivo sin inocular como testigo y se incuban a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas.

### 5.3. Muestras de esporas:

- La muestra de análisis se toma en dos tubos de ensayo estéril y en condiciones estéril en cantidades de 10 a 15 ml.
- En uno de los tubos se introduce un termómetro de 0 a 100°C y se rotula como tubo de control de temperatura.
- El tratamiento térmico se lleva a cabo en un baño María donde se calientan los 2 tubos a temperatura de 80°C; y se da el tiempo requerido a partir que la temperatura en el tubo de control llega a la cifra necesaria.
- Después de cumplido el tiempo de tratamiento térmico se enfrían inmediatamente el tubo muestra con agua de grifo.

#### 5.3.1. Siembra de esporas aérobicas:

- Se toman 2 tubos de cultivo conteniendo 10 ml aproximadamente de caldo nutritivo, se inocula con 1 gr. o 1 ml de la porción de ensayo de forma aséptica. Se toma un tubo de caldo sin inocular como testigo.
- Se toman dos placas de petri se inoculan con 1 gr. ó 1 ml de la porción de ensayo de forma aséptica y se agrega agar standard o nutritivo de 10 a 15 ml. previamente fundido y enfriado a unos 45°C, se mezcla bien y uniformemente y se deja solidificar. Se toma una placa con agar standard sin inocular como testigo y se incuban a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas.

#### 5.4. Siembra Anaeróbica:

Se toman 2 tubos de cultivo conteniendo 10 ml. aproximadamente de caldo de hígado o medio líquido de tioglicolato con campana Durham; que previamente han sido sometidos a baño de agua a 100°C durante 15 min. con el objeto de expulsar el oxígeno disuelto y se inoculan con 1 gr ó 1 ml de la porción de ensayo. Se adiciona parafina o agar para estratificar, previamente fundido y enfriado a unos 45°C, deslizandolo suavemente por las paredes del tubo, hasta formar un estrato de unos 20 mm por encima del medio inoculado.

Se toman 2 placas de petri se inoculan con 1 gr. o 1 ml de la porción de ensayo de forma aséptica y se agrega agar para anaerobios de 10 a 15 ml. previamente fundido y enfriado a unos 45°C, se mezcla bien y uniformemente y se deja solidificar. Se toma una placa con agar para anaerobios sin inocular como testigo y se incuba a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas en una incubadora al vacío.

##### 5.4.1. Siembra de esporas anaerobios:

La muestra se prepara igual que el punto 5.3. "Muestra para esporas" y la siembra se realiza igual que el punto 5.4. "siembra anaeróbica".

#### 5.5. Siembra de termofilos aerobios:

Igual que el punto 5.2.1. "Siembra aeróbica", excepto la temperatura de incubación que debe ser  $56 \pm 1^\circ\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas.

##### 5.5.1. Siembra de termofilos anaerobios:

Igual que el punto 5.4. "Siembra anaeróbica" excepto la temperatura de incubación que debe ser  $56 \pm 1^\circ\text{C}$  de  $72 \pm 3$  horas.

#### 5.6. Siembra de microorganismos coliformes:

En dos tubos de cultivo que contengan 10 ml de caldo lactosado de doble concentración y posean en su interior tubos de fermentación Durham, se inoculan con 10 ml de la porción de ensayo.

Se incuban a temperatura de 35 a 37°C durante 24 horas; si no hay formación de gas se esperan las 48 horas. La formación de gas dentro de las 48 horas constituye una prueba presuntiva positiva y la ausencia de gas constituye una prueba negativa.

#### 5.7. Siembra de mohos y levaduras viables:

Se extrae asépticamente 1 ml de la porción de ensayo, utilizando una pipeta y se lleva a 2 placas de petri; se funde el medio de cultivo en un baño de agua, se enfria a temperatura de 45°C y se manatiene a esa temperatura hasta que sea utilizado, el tiempo no podrá ser mayor de 3 horas. A cada frasco del medio de cultivo a utilizar, se añade solución de ácido cítrico al 1% hasta lograr un PH de 3,5 a 4. La cantidad de ácido a añadir estará previamente calculada. Se vierte en cada placa de 10 a 15 ml del medio de cultivo acidificado y se procede inmediatamente a mezclarlo con la porción de ensayo, haciendo rotar suavemente la placa durante 5 a 10 segundos, teniendo cuidado de no salpicar los bordes si la tapa de la placa.

Se deja solidificar durante 10 min.

Se utiliza un placa de control ambiental y otra de control del medio por cada serie de placas sembradas, se incuban a la temperatura de 25 a 30°C durante 3 a 5 días con observación diaria.

#### 6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

En caso de encontrar crecimiento en las placas de petri o tubos de ensayos, se procede hacer tinció de Gram y hacer diluciones para la determinación del conteo total de microorganismos viables.

Normas Extranjeras Consultadas:

Normas Búlgaras.

NC 76 - 04 : 82

Productos Alimenticios y Bebidas. Métodos de ensayo microbiológico prueba de esterilidad.

A N E X O      N O 5

EMPRESA AGROINDUS- TRIAL DEL VALLE DE SEBACO	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES. METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS  <u>TECNICA DE TOMA DE MUESTRAS</u>	N.E. 04-01 1992
--	---	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la determinación de las técnicas de toma de muestra para frutas y hortalizas frescas.

2.- GENERALIDADES:

- 2.1. La elevación de la calidad de los análisis exige un control sobre la técnica de toma de muestras.
- 2.2. No modificar la microflora del producto.
- 2.3. No llevar microorganismos extraños.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

La muestra es el material recogido y está compuesta de muestras unitarias. Muestras unitarias es la cantidad de substancia que se utiliza para el análisis. La muestra y la muestra unitaria puede ser una misma, pero a fin de obtener una representatividad más grande, es preferible que la muestra esté compuesta de más de una muestra unitaria.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

1. Vasos estériles.
2. Instrumentos estériles
3. Alcohol de 70°
4. Algodón esterilizado.

5.- PROCEDIMIENTO:

- 5.1. Tomar las muestras, siempre que sea posible de recipientes intactos y sin abrir.

5.2. Cuando el producto está en grandes recipientes (caso de materias primas), se pasa la muestra representativa a recipientes esterilizados, con instrumentos también esterilizados y en las debidas condiciones de asepsia, para lo cual se procede en la forma siguiente:

- Se limpian las manos lavándolas y frotándolas con alcohol de 70° sobre algodón esterilizado.
- Se limpian de la misma manera la superficie exterior de los recipientes que contienen el alimento a analizar.
- Se limpian también todos los instrumentos útiles para la toma de muestra.
- Se abre el recipiente con el instrumento esterilizado adecuado.
- Cuando no sea fácil mezclar el contenido, las muestras se toman de diversos lugares del recipiente, si son líquidos se agitan.
- Se llena el recipiente esterilizado con la muestra y se cierra.

Norma Extranjera Consultada:

Norma Búlgara.

Bibliografía consultada:

Norma y procedimientos de Higiene.  
Ministerio de Salud.

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO.	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES. METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS. <u>PREPARACION Y TOMA DE MUESTRA DE PRODUCTOS ENLATADOS.</u>	N.E. 04-02 1992
---	--	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece la preparación y toma de muestra de productos enlatados.

2.- GENERALIDADES:

- 2.1. La elevación de la calidad de los análisis exige un control sobre la preparación y toma de muestra.
- 2.2. No modificar la microflora del producto.
- 2.3. No llevar microorganismos extraños.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El laboratorio recibe muestras de productos enlatados de forma sistemática y rutinarias a través de un plan de muestreo, para vigilar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos procesados, o bien cualquier otro que pueda considerarse insatisfactorio por cualquier razón.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

1. Detergente.
2. Alcohol de 75°
3. Paños de tela.

5.- PROCEDIMIENTO:

5.1. Preparación de la muestra:

- Examinar el envase e identificarlo.
- Lavar con detergente.
- Secar con paño limpio.

- Limpiar con alcohol de 75°
- Introducir el envase al cuarto de siembra.
- Esterilizar por 30 minutos con lámparas bactericidas.
- Remover enérgicamente el envase durante 5 minutos para distribuir el contenido.

#### 5.2. Toma de muestra:

- El envase se abre entre las llamas de los mecheros quemando algodón con alcohol sobre la superficie de la tapa.
- Mediante cuchara o espátula estéril se toma la muestra en cantidad de 25 a 50 gr. y se pone en recipiente estéril previamente pesado y contenido superior a 100 ml.
- La muestra se diluye con agua estéril o solución fisiológica en proporción 1:1 (peso).
- La muestra se agita enérgicamente durante 3 minutos y se deja reposar durante 15 minutos.

Norma Extranjera Consultada:

Norma Búlgara.



EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO.	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES. METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS. ETIQUETAJE DE LAS MUESTRAS.	N.E 04-03 1992
---	---	----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el procedimiento para el etiquetaje de las muestras durante la toma de éstas.

2.- GENERALIDADES:

2.1. La elevación de la calidad de los análisis exige un control sobre el etiquetaje de las muestras.

2.2. La normalización del etiquetaje de las muestras es la vía idónea para identificarlas después en el laboratorio.

2.3. La normalización del etiquetaje de las muestras tiene como objetivos establecer un orden único para la identificación de éstas.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

El valor de los resultados del análisis microbiológico depende del etiquetaje de las muestras que se toman en los diferentes puntos para la identificación de cada una de ellas.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

1. Crayones de alcohol
2. Algodón.
3. Alcohol.
4. Etiquetas.

5.- PROCEDIMIENTO:

5.1. Se marcan etiquetas en todos los recipientes que recogen las muestras, inmediatamente antes o después de tomarlas, para identificarlas después en el laboratorio.

5.2. En la etiqueta se escribe lo siguiente:

- Nombre de la persona que ha tomado la muestra.
- Lugar, fecha y hora del muestreo.
- Motivo del muestreo.
- Tipo de alimento.
- Número y marcación del lote, número y tamaño de sus unidades.
- Procedencia del envío y lugar de destino.
- Método de muestreo.
- Tamaño y número de las muestras.
- Temperatura del producto en el momento del muestreo.
- Ensayos que se sugieren.
- Otras informaciones útiles.

Bibliografía consultada:

FAO Análisis Microbiológico. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. Serie 14/4 Roma, 1981.

EMPRESA AGROINDUS- TRIAL DEL VALLE DE SEBACO.	CONSERVAS DE FRUTAS Y VEGETALES. METODO DE ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS. <u>MUESTREO PARA LA TOMA DE DECISION</u> <u>SOBRE UN LOTE DE PRODUCTOS.</u>	N.E. 04-04 1992
---	--	-----------------------

1.- ALCANCE:

Esta norma establece el muestreo para toma de decisión sobre un lote de producto.

2.- GENERALIDADES:

2.1. La toma de muestra es el acto de seleccionar una determinada porción o número de recipientes o unidades de un lote del mismo producto alimenticio.

2.2. La muestra deberá ser lo más representativa posible del lote del que se haya tomado.

2.3. Para efectuar el control sanitario de los alimentos se puede tomar muestras de forma sistemática y rutinaria a través de una plan de muestreo para vigilar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos o bien se toman muestras sin programación por considerar a un alimento sospechoso de alteración, contaminación, adulteración, etc.

3.- FUNDAMENTO DEL METODO:

Un lote de producto es la cantidad de alimentos fabricados y manejados en condiciones uniformes: En la práctica, se trata usualmente de alimentos pertenecientes a una misma partida o, en el caso de un procedimiento continuo de elaboración, los fabricados en un período de tiempo limitado, en un solo lugar; para identificar los diferentes lotes, los fabricantes suelen utilizar un código de marcas.

4.- APARATOS Y UTENSILIOS:

1. Crayones de alcohol.

## 5.- PROCEDIMIENTO:

### 5.1. Para el control sistemático y rutinario:

Se tomará un mínimo de tres unidades por producto para el análisis (microbiológico), de los productos a granel sean líquidos, sólidos o semi-sólidos, se tomarán tres unidades de 1 Lt. ó 1 Lb., cada una por producto, en envases adecuados, independientes uno de otro y debidamente enumerados, siguiendo el procedimiento de protección y conservación de las muestras.

### 5.2. Para la toma de muestras de alimentos sospechosa de alteración, contaminación, etc.

Esta debe ser lo más representativa posible del lote en cuestión tomando el número de unidades para cada análisis de acuerdo a la tabla siguiente:

<u>Número de envases en lote:</u>			<u>Número de unidades a seleccionar</u>
			N
Hasta		200 -----	6
201	a	300 -----	8
301	a	500 -----	10
501	a	800 -----	12
801	a	1.301 -----	14
1.302	a	3.200 -----	16
3.201	a	más -----	20

Para las muestras en lotes constituidos por cajas, se deben abrir como mínimo el número de cajas señaladas en la tabla siguiente:

<u>Número de envases y lotes:</u>			<u>Número de cajas que debe abrir:</u>
Hasta	-	200 -----	3
201	a	300 -----	4
301	a	500 -----	5
501	a	800 -----	6
801	a	1.300 -----	7
1.301	a	3.200 -----	8
3.201	a	más -----	10

6.- EXPRESION DE LOS RESULTADOS:

Los resultados de los análisis del producto permitirá efectuar una evaluación de los mismos, donde se considerará apto o no para el consumo humano.

Bibliografía consultada:

FAO Análisis Microbiológico. Manuales para el Control de Calidad de los Alimentos. Estudio FAO: Alimentación y Nutrición. Serie 14/4 Roma, 1981.

.../...



A N E X O      N O 6

ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLOGICO EN LA PRODUCCION DE  
 CONSERVAS ESTERILIZADAS CON PH < 3.7 (JUGO DE FUTAS,  
 JUGO DE HORTALIZAS CON AGREGACION DE ACIDOS ORGANICOS,  
 ENSALADAS Y OTROS).

Nº	OBJETO DE CONTROL	PARAMETRO	FRECUENCIA
1	Materia Prima lavada.	N.T.M. Mohos y levaduras.	1 vez semanal
2	Salmuera	N.T.M. Esporas	2 a 3 veces semanal.
3	Pomos o latas	N.T.M.	3 veces semanal.
4	Producto Terminado	N.T.M. Esporas Aerobias Mesófilas.	2 pomos cada turno al inicio y final del proceso de esterilización.
5	Producto después de incubar.	N.T.M. Esporas Aerobias Mesófilas.	Se analiza solamente en caso de cambios visuales.

**ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN  
DE CONSERVAS ESTERILIZADAS CON PH ENTRE 4.2 A 3.7  
(PEPINOS EN SALMUERAS, CHILTOMAS EN SALMUERA,  
HORTALIZAS MIXTAS Y OTROS).**

Nº	OBJETIVO DEL CONTROL	PARAMETROS	FRECUENCIA
1	Materia Prima lavada.	N.T.M.	1 vez semanal
2	Efecto del blanqueo.	N.T.M. Esporas Aerobias Mesófilas.	1 vez semanal o según las necesidades.
3	Salmueras	Esporas Mesófilas Aerobias. Mohos y Levaduras.	1 vez semanal.
4	Condimentos o Especies.	N.T.M. Esporas Aerobias y Aerobias Mesófilas.	1 vez semanal.
5	Pomos o Latas (Envases)	N.T.M.	3 veces a la semana.
6	Producto Terminado.	N.T.M. Esporas Aerobias Mesófilas. Mohos y Levaduras. Aerobias Mesófilos Vegetativos y Esporas.	Cada turno 2 pomos al inicio y final del proceso de esterilización.
7	Producto después de incubado.	Igual que el punto Nº 6.	Se analiza solamente en casos de cambios visuales en el aspecto exterior. En cada turno un pomo.

**ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLOGICO EN LA PRODUCCION  
DE CONSERVAS, ESTERILIZADAS CON PH > 4.2  
(HABICHUELAS, GUISANTES, PAPAS Y OTROS).**

Nº	OBJETIVO DE CONTROL	PARAMETROS	FRECUENCIA
1	Materia Prima lavada.	N.T.M.	1 vez semanal.
2	Efecto del blanqueo.	N.T.M. Esporas Aerobias Mesófilas.	1 vez semanal y según las necesidades.
3	Salmueras.	N.T.M.	1 vez semanal.
4	Pomos	N.T.M.	3 veces a la semana.
5	Conservas antes de la Esterilización.	N.T.M. - Esporas de Aerobias Mesófilas y Aerobias Termófilas. - Aerobias Mesófilas. - Aerobias Termófilas.	1 vez semanal y según las necesidades. En caso que los resultados obtenidos del análisis del producto terminado, no corresponden a los parámetros requeridos.
6	Producto Terminado.	N.T.M. - Esporas de Aerobias Mesófilas. - Aerobias Termófilas. - Anaerobias Termófilos. - Mohos y Levaduras.	En cada turno 2 pomos al inicio y final del proceso de esterilización.
7	Producto después de incubado.	Igual que el punto Nº 6	En cada turno 1 pomo después de cumplirse el período de incubación.

**ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO EN LA PRODUCCIÓN DE  
CONSERVAS ESTERILIZADAS EN PRODUCTOS DE TOMATE CON  
MATERIA SECA < 12% (TOMATE PELADO, SIN PELAR, JUGO DE TOMATE  
Y TODO TIPO DE CONSERVA CON JUGO DE TOMATE).**

Nº	OBJETO DE CONTROL	PARAMETROS	FRECUENCIA
1	Materia Prima lavada.	N.T.M.	1 vez semanal.
2	Jugo de Tomate.	N.T.M. Esporas Mohos y Levaduras. Howard	1 vez semanal.  Cada 2 horas.
3	Envases	N.T.M.	3 veces semanal o según las necesidades.
4	Producto Terminado.	VEGETATIVAS: - Aerobias Mesófilas. - Aerobias Termófilas. - Anaerobias Mesófilas. - Anaerobias Termófilas.  ESPORAS: - Aerobias Mesófilas. - Aerobias Termófilas. - Anaerobias Mesófilas. - Anaerobias Termófilas.	2 Pomos o Lata cada turno al inicio y final del proceso de esterilización.
5	Producto después de incubado.	Igual al punto Nº 4	Un pomo por cada turno. 7 días a 37º C 3 días a 57º C

**ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DURANTE EL PROCESO DE  
CONCENTRADO DE TOMATE Y PRODUCTO ESTERILIZADO  
EN ENVASES HERMÉTICOS.**

Nº	OBJETO DE CONTROL	PARAMETROS	FRECUENCIA
1	Materia Prima lavada	N.T.M.	1 vez semanal.
2	Jugo de Tomate.	Howard %	Cada 2 horas.
3	Llenadora.	Anaerobios Mesó- filos.	3 veces en cada turno.
4	Conservas antes de esterilizado. (Llenadora)	Howard %	Cada 2 horas.
5	Conservas después de esterilizada.	Vegetativos: - Aerobios Mesófilos. - Esporas Aerobias Mesófilos. - Anaerobias Mesófilas. - Esporas Anaerobias. - Howard %	2 Pomos o Latas al inicio y fi- nal del proceso de esteriliza- ción.
6	Conservas después de incubación.	Igual que el Punto Nº 5.	Se analiza sola- mente en caso de cambios visuales en el aspecto exterior.

ESQUEMA DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO  
DE HIGIENE

No	OBJETO DE CONTROL	PARAMETRO	FRECUENCIA
1	Agua	N.T.M. Coliformes	1 vez semanal
2	Maquinaria	N.T.M.	1 vez semanal y según las nece- sidades.
3	Pomos o Latas.	N.T.M.	3 veces semanal y según las ne- cesidades.
4	Manos del personal.	Coli bacterias (±)	1 vez semanal y según las nece- sidades.





## EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO

## DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

## LABORATORIO INDUSTRIAL

## REGISTRO DEL CONTROL DE OPERACION DE LAS INCUBADORAS.

FECHA	TEMPERATURA AL INICIO DE JORNADA ° C		TEMPERATURA AL FINALIZAR LA JORNADA ° C		F I R M A
	37° C	57° C	37° C	57°	





## EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO

## DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

## LABORATORIO INDUSTRIAL

REGISTRO DEL CONTROL DE ESTABILIDAD 37° C x 7 DIAS

PRODUCTO	FECHA DE PRODUCCION	LOTE Nº	FECHA DE ENTRADA	FECHA DE SALIDA	OBSERVACIONES

## EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO

## DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

## LABORATORIO INDUSTRIAL

REGISTRO DEL CONTROL DE ESTABILIDAD 57° C x 3 DIAS

PRODUCTO	FECHA DE PRODUCCION	LOTE Nº	FECHA DE ENTRADA	FECHA DE SALIDA	OBSERVACIONES

## EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

LABORATORIO INDUSTRIAL

REGISTRO DE ANALISIS DE MAQUINARIA

FECHA DE ANALISIS	PUNTO DE INSPECCION	NTM Col/Cm <sup>2</sup>	COLIFORMES (±)	CANTIDAD DE MICROORGANISMOS EN 1 Cm <sup>2</sup> DE SUPERFICIE (%)

EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SEBACO  
DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD  
LABORATORIO INDUSTRIAL



REGISTRO DE ANALISIS DE AGUA

FECHA	FUENTE DE AGUA	PPm DE CLORO	NMP DE COLIFORMES FECALES/100	NMP COLIFORMES TOTALES/100	OBSERVACIONES

## EMPRESA AGROINDUSTRIAL DEL VALLE DE SIBACO

DEPARTAMENTO DE CONTROL DE CALIDAD

LABORATORIO INDUSTRIAL

## REGISTRO DE ANALISIS DE MATERIA PRIMA

FECHA DE PRODUCCION	FECHA DE ANALISIS	OBJETO DEL CONTROL	MESOFILOS		EFECTO DEL LAVADO	OBSERVACIONES
			AEROBIOS NTM-1 Col/gr o ml	AEROBIOS NTM-2 Col/gr o ml		

