

DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS POR EL MÉTODO RECUENTO EN PLACA

AOXLAB S.A.S

CONFIDENCIAL

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-020 Determinación de mohos y levaduras por el método recuento en placa

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris Mercedes Rinaldy	Analista de microbiología		2022-11-04
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Directora calidad		2022-11-04
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director técnico		2022-11-04
Localización del documento:				

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018/01/19	1	Ninguno (versión original).	LVLS	NBR	YELP
Vigente	2022-11-04	2	Se cambia estilo según manual identidad. Se agrega el tiempo de exposición de las placas inoculadas con la cepa <i>Aspergillus brasiliensis</i> , indicado en el numeral 2.2 y el tiempo requerido en la desinfección de la cabina en el numeral 4.1.1	YMRM	APPP	DPP

ÍNDICE

Sección	Página
1. OBJETIVO Y ALCANCE.	4
1.1 Objetivo.	4
1.2 Alcance.	4
2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.	4
2.1 Definiciones.	4
2.2 Notaciones.	4
3. REFERENCIAS.	5
4. Desarrollo	5
4.1 Actividades previas.	5
4.2 PATRONES DE MEDIDA.	6
5. INSPECCIÓN VISUAL	6
5.1 Revisión general.	6
5.2 Estabilización.	6
5.3 Verificación de patrones y otros equipos.	6
5.4 Manejo del ítem.	6
5.5 Medidas de seguridad.	7
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.	7
6.1 Preparación de soluciones	7
6.2 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa	7
6.3 Siembra por superficie o extensión	8
6.4 Siembra en profundidad	9
6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry TC	9
6.6 Recuento de UFC y Cálculos	10
7. INFORME.	10
8. RESPONSABILIDADES.	10
8.1 Líder de Calidad.	10
8.2 Líder de Laboratorio.	10
8.3 Analistas.	10
9. FORMATOS RELACIONADOS.	10
10. ANEXOS.	11

1.1 OBJETIVO: Determinar el contenido de Unidades formadoras de colonia (UFC) de Mohos y Levaduras mediante la técnica de recuento en placa de acuerdo con la Norma ISO 21527-2.

1.2 ALCANCE: Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Mohos [3]: microorganismos aerobios Mesófilos filamentosos que, crecen en la superficie del agar micológico, se desarrollan generalmente en forma plana o esponjosa.

Levaduras [2]: microorganismos aerobios Mesófilos que se desarrollan a 25°C usando un medio de agar micológico; desarrolla colonias redondas mate o brillante que crecen en la superficie del medio, que usualmente tienen un contorno regular y una superficie más o menos convexa. Poseen una morfología muy variable: esférica, ovoidea, piriforme, cilíndrica, triangular o, incluso, alargada en forma de micelio verdadero falso. Su tamaño supera al de las bacterias; al igual que los mohos, causan alteraciones de los productos alimenticios, especialmente los ácidos y presión osmótica elevada.

Recuento de mohos y levaduras viables:[2][4] Es la determinación del número de colonias típicas de levaduras y mohos que se desarrollan a partir de un gramo o centímetro cúbico de muestra, en un medio adecuado e incubado entre 22°C y 25°C.

Colonia [1]: acumulación localizada visible de la masa microbiana desarrollada sobre o en un medio nutriente sólido a partir de una célula viable.

Análisis microbiológico [5]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [5]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.

Incubadora [5]: cámara aislada que permite que la temperatura se mantenga estable y uniformemente distribuida dentro del rango de error de temperatura máximo permisible especificado en el método de ensayo.

Calibración [7]: Proceso de comparar los valores obtenidos por un instrumento de medición con la medida correspondiente de un patrón de referencia (o estándar).

2.2 Notaciones.

Para propósitos de este documento, se hacen las siguientes consideraciones:

“Laboratorio”: se refiere al laboratorio AOXLAB S.A.S.

“Informe de resultados”: se refiere a los informes de ensayo que emite el Laboratorio.

“Servicios”: para referir a los servicios de ensayo que el Laboratorio ofrece.

3. REFERENCIAS

[1] NTC4132: Microbiología. Guía general para el recuento de mohos y levaduras. Técnica de recuento decolonias a 25 °c

[2] NTC3954: Azúcar y productos azucarados. Determinación de mohos y levaduras. Método de recuento en placa.

[3] NTC5698: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (aw) superior a 0,95

[4] NTC4491-1: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para análisis microbiológico. Parte 1: reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y de diluciones decimales.

[5] NTC 4092:2009 Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. Requisitos generales y directrices para análisis microbiológicos-

[6] UNE-ISO 18593:2013 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Métodos horizontales para las técnicas de toma de muestras a partir de superficies utilizando placas de contacto e hisopos

[7] Vocabulario internacional de metrología: conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 1er edición en español, 2008

4. DESARROLLO.

4.1 Actividades previas.

4.1.1 Limpieza y desinfección de cabina

La limpieza y desinfección de la cabina de bioseguridad se realiza de acuerdo con el PROC-TC-031, adicionalmente diario se debe desinfectar con alcohol al 70 % después de cada uso, en el caso de realizar proceso de detección molecular se realiza la desinfección con solución de hipoclorito de sodio al 3%.

Todos los días después de realizar proceso de desinfección con alcohol se debe encender la lámpara UV durante al menos 60 minutos.

4.1.2. Verificación de equipos.

Se debe revisar que la lámpara UV y el sistema de filtros enciendan correctamente, se debe revisar que la cabina cuente con su calificación y mantenimiento preventivo al día.

4.1.2.1 Verificación de lámpara de luz Ultravioleta

Se debe verificar que las horas de uso de la lámpara de luz ultravioleta de la cabina de bioseguridad, no exceda su tiempo de vida útil, el cual equivale a 1000 horas aproximadamente o en su defecto no debe exceder el tiempo de vida útil declarado por el proveedor.

La verificación del correcto funcionamiento de la lámpara UV se debe realizar mensualmente, para esto, se debe registrar la información correspondiente en el formato FOR-TC 178.

4. 2 PATRONES DE MEDIDA.

Tubos de ensayo

Cajas Petri con medio de cultivo

Pipetas de 1 y 10 ml

Gradillas

Stomacher

Incubadora

Cámara o cabina de Siembra

Autoclave

Asa y/o rastrillo microbiológico

Material de vidrio necesario

- Material debidamente lavado, secado y esterilizado (Ver PROC-TC 026-027)
-

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

Al recibirse el ítem en el Laboratorio, éste es inspeccionado a fin de asegurar que se recibe en condiciones normales de operación y presentación física; y detectar cualquier anomalía en su recepción. Esta revisión es realizada conforme lo indicado en el procedimiento PROC-TC-009 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio

5.2 Estabilización.

Una vez revisado el ítem, se aplican las siguientes instrucciones:

Los patrones de referencia del laboratorio a intervenir en el ensayo y el ítem se mantienen en el lugar de ensayo, y encendidos (si es el caso), por lo menos una hora antes de realizar las mediciones, a fin de lograr su operación óptima o estabilización térmica. Se registra la hora de inicio y fin de esta estabilización.

Verificar y registrar en los formatos SOFT-TC-001 "Formato carta de control para humedad" y SOFT-TC-002 "Formato carta de control para temperatura ambiente" que las condiciones ambientales de afectación en el servicio se cumplan durante el ensayo del ítem:

Condición ambiental	Mínima	Máxima	Observación
Temperatura ambiente	19,00	27,00	
Humedad relativa	35,00	65,00	

Estas condiciones ambientales fueron identificadas con un efecto en el servicio realizado y sus límites permisibles fueron definidos en base a de los propios patrones del laboratorio, recomendaciones de normas aplicables y servicios realizados.

5.3 Verificación de patrones y otros equipos.

- Stock de los reactivos y medios de cultivo a utilizar en el proceso, fichas de bioseguridad y matriz de compatibilidad.
- Fecha de vencimiento de los reactivos y medios de cultivo.
- Cantidad necesaria a utilizar o preparar de reactivo o medio de cultivo dependiendo del número de muestras.
- Bitácora de uso de equipos y gasto de medios de cultivo.

Antes de cualquier uso de los equipos se debe revisar la carpeta de mantenimientos y calibraciones, verificar que el equipo se encuentra en las condiciones adecuadas para su uso y no requiere alguna intervención.

A fin de confirmar que los patrones de referencia a utilizar en el ensayo se encuentran en condiciones adecuadas para realizar el servicio, se realiza una verificación intermedia de acuerdo con PROC-TC-005 "Procedimiento de verificaciones intermedias de equipo.

5.4 Manejo del ítem.

Para la configuración y operación del ítem, se siguen las instrucciones del manual del fabricante y/o la normativa vigente.

Para la identificación, manejo, transporte, almacenamiento y preparación del ítem se siguen las siguientes instrucciones del procedimiento PROC-TC-009 Procedimiento de aseguramiento de integridad de las muestras bajo servicio.

5.5 Medidas de seguridad.

Se deben seguir las medidas de seguridad durante la realización del servicio las cuales puede encontrar en el procedimiento PROC-GC-015 Procedimiento estándar de Bioseguridad.

Verificar que todos los reactivos preparados en el laboratorio al momento de realizar el ensayo o los que se encontraban almacenados se encuentren identificados conforme al formato FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

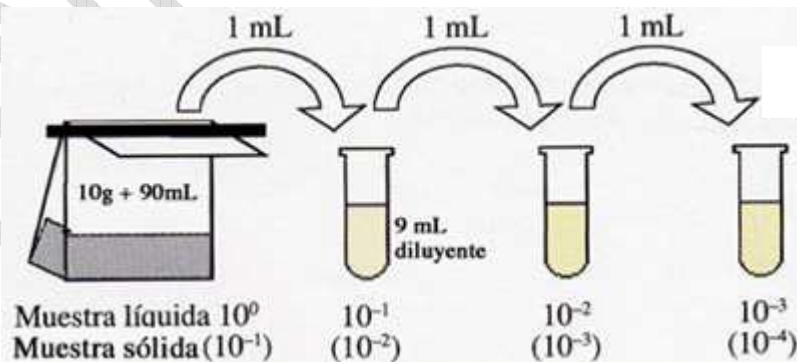
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Preparación de soluciones

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Rosa de bengala con cloranfenicol 0,2%	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agar Papa Dextrosa PDA con cloranfenicol 0,2%	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agar Saboreaud con cloranfenicol 0,2%	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Agar extracto de malta glucosa con cloranfenicol 0,2%			
Agua Peptonada estéril	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 9 ml por cada tubo de ensayo.

6.2 Preparación de las diluciones seriadas para recuento en placa

Transfiera 1 ml de la muestra original al tubo 1 con 9 ml de medio de cultivo o solución de agua peptonada estéril diluyente. Repita este procedimiento de tubo en tubo hasta obtener la dilución deseada.



Grafica 1: Diluciones seriadas

Nota: Tenga en cuenta el factor de dilución dependiendo de la naturaleza de la muestra (líquida o sólida).

Para la siembra en la caja Petri con el medio de cultivo, tenga en cuenta que lo puede hacer en siembra por superficie o siembra en profundidad.

6.3 Siembra por superficie o extensión (Ver gráfico 2)

1. Inocule 0.1ml de la muestra sobre el medio de cultivo ya solidificado y esparza con un asa o rastrillo microbiológico uniformemente sobre la superficie del agar. Selle la caja con papel parafilm o vinipel por el borde y lleve a incubación a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 - 5 días.



Grafica 2: Siembra por superficie

6.4 Siembra en profundidad

2. Inocular, 1.0 mL de la dilución correspondiente en cada caja, mediante pipeta estéril y verter de 12.0 a 15.0 mL del medio de cultivo fundido y mantenido a $45 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos.
3. Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio, mediante movimientos de derecha a izquierda, movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada.
4. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri sobre una superficie horizontal fría. No permitir que se mojen las tapas de las cajas.
5. Preparar una caja control con 18.0 a 20.0 mL de medio para verificar la esterilidad.
6. Solidificado el medio invertir las placas y colocarlas en la incubadora a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 - 5 días.

6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry TC

Compact Dry™ YM es una placacromogénica lista para usar en el recuento total de mohos y levaduras.

Para agua y alimentos líquidos:

Aplique 1ml de la muestra (diluya si es necesarios) en el centro de la placa de compact dry YM.

Para alimentos sólidos:

Agregue una solución buferada de 90 ml a la muestra (10 gramos), homogenícela en el Stomacher (diluya en caso de ser necesario). Aplique 1ml de la muestra en el centro de la lámina seca de Compact Dry YM.

Instrucciones de uso

1. Abra la cubierta y deje caer 1ml de la muestra sobre la parte central de la placa.
2. La muestra se dispersa automática y homogéneamente sobre la lámina, y transforma la lámina seca en un gel es pocos segundos.
3. Vuelva a colocar la cubierta sobre la placa.
4. Gire la placa cerrada y colóquela en la incubadora.
5. Después de la incubación, cuente el número de colonias coloreadas en la parte posterior de la placa. El papel blanco colocado debajo de la placa le ayudará a contar las colonias.

Temperatura de Incubación: 25°C ± 2°C durante 3 - 5 días.

Incubación: Debe ser registrada en el formato FOR-GC-017

Interpretación de Resultados con el Compact Dry

Después de la incubación, leer bandejas sobre un fondo blanco.

Colonias azules y verdes, formación de estructuras algodonosas.

Sobre los sustratos cromógenos de las placas Compact Dry YM, las levaduras y los mohos manifiestan diferentes reacciones cromáticas y son por tanto sumamente fáciles de distinguir: el sustrato cromógeno X-Phos provoca una coloración azul en prácticamente todas las levaduras.

El crecimiento bacteriano se inhibe mediante antibióticos. Gracias a la cavidad de las placas Compact Dry los mohos desarrollan su forma tridimensional característica en distintos colores

Nota:

- Algunos hongos no forman colonias azules.
- Los antibióticos que se encuentran en el medio inhiben el crecimiento de las bacterias.
- Las altas concentraciones en las placas (>300 UFC), hacen que toda el área de crecimiento se vuelva azul/verde, en este caso diluya la muestra.

6.6 Para las cajas que contienen menos de 150 colonias y al menos 15.

Se calcula el N de mohos y levaduras presentes en 1 ml o g de muestra usando la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{(V * 1,1 * d)}$$

Donde:

$\sum C$: Es la suma de las colonias contadas en todas las cajas de dos diluciones sucesivas, una de las cuales contiene al menos 15 colonias.

V : Volumen sembrado

d . Es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Los resultados se redondean a dos cifras significativas.

6.6.2 Estimado de los números pequeños:

Si las dos cajas correspondientes a la muestra e ensayo contienen menos de 15 colonias de *Clostridium sulfito reductores* se calcula el número estimado de N_E colonias en cada caja usando la siguiente ecuación:

Productos líquidos:

$$N_E = m$$

Otros productos:

$$N_E = m/d$$

En donde:

d : Es el factor de dilución de la suspensión inicial.

6.6.3 Sin colonias:

Si las dos cajas de la muestra de ensayo no contienen colonias de *clostridium sulfito reductores* el resultado se reporta:

-Menos de 1 *clostridium sulfito reductores* por mililitro (Productos líquidos)

-Menos de $1/d$ *Clostridium sulfito reductores* por gramo (otros productos) en donde d es el factor de dilución de la suspensión inicial.

6.6.4 Calculo del recuento de colonias de *Clostridium perfringes*

Para cada caja de SPS agar se calcula el numero N_a de de *Clostridium perfringes* en 1ml o 1g de producto, usando la siguiente ecuación:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

Donde:

b: es el número de colonias confirmadas como *C. perfringes*

A: es el número de colonias seleccionadas para confirmación

C: es el número de colonias típicas marcadas en la caja

El resultado se redondea a un número entero de colonias.

Recuento de UFC y Cálculos

Realizar el recuento de los microorganismos presentes en la muestra. Para realizar el contaje se debe tener en cuenta:

- Contar las placas cuyo número de colonias esté comprendido entre 30 y 300.
- Multiplicar por el factor de dilución y el volumen inoculado.
- Expresar el resultado en UFC/g o ml de alimento. (NO en bacterias por gramo o mililitro)

$$\text{UFC/g o ml} = \text{N}^\circ \text{ de colonias en placa (entre 30 y 300)} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

7. INFORME

Registro manual en los formatos del laboratorio: todas las anotaciones derivadas del desarrollo del método incluyendo cálculos y/o procedimientos anexos a la preparación de muestras, preparación de medios de cultivo, diluciones y/u otros y los resultados en los correspondientes formatos FOR-TC-014 (Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos), FOR-TC-015 (Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación), FOR-TC-018-(Formato de resultados de control de calidad interno en ambientes

del laboratorio), FOR-TC-035-(Formato de resultados de control de calidad internos de manipuladores del laboratorio), FOR-TC-036 (Formato de resultados de control de calidad internos de superficies del laboratorio).

8. RESPONSABILIDADES.

8.1 Líder de Calidad.

Asegurar la aplicación del presente documento y tomar decisiones en casos especiales no contemplados.

8.2 Líder de Laboratorio.

Asegurar la aplicación del presente documento por el personal subordinado o supervisado.

8.3 Analistas.

Aplicar el presente documento.

9. FORMATOS RELACIONADOS.

SOFT-TC-001 "Formato carta de control para la humedad"

SOFT-TC-002 "Formato carta de control para la temperatura ambiente"

FOR-TC-024 "Formato para rotular reactivos elaborados en el laboratorio"

FOR-TC-014 "Formato datos primarios de resultados de análisis Microbiológicos"

FOR-TC-015 "Formato para el control de tiempos y temperaturas de incubación."

10. ANEXOS.

No aplica