




Procedimiento para la determinación de bacterias ácido-lácticas por el método recuento en placa

AOXLAB S.A.S

DOCUMENTO CONTROLADO

PROC-TC-021 Determinación de bacterias ácido-lácticas por el método recuento en placa

Copia controlada No. :1

	Nombre	Puesto o función	Firma	Fecha
Elaboró:	Yeris M. Rinaldy Mojica	Analista de microbiología		2023-02-10
Revisó:	Angela P. Patiño Pérez	Líder de calidad		2023-02-10
Aprobó:	Dario Pardo Pardo	Director Técnico		2023-02-10
Localización del documento:	http://107.190.139.42/~aoxlabsgc/sig/			

Control de Cambios

Estado	Fecha de inicio de vigencia	Revisión	Descripción del cambio realizado	Realizó	Revisó	Aprobó
Obsoleto	2018-01-18	1	Ninguno (versión original).	LVLS	NBR	YELP
Vigente	2023-02-10	2	Se cambia estilo según manual identidad	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.	5
3. REFERENCIAS.	5
4. PATRONES DE MEDIDA.	5
5. INSPECCIÓN VISUAL	5
5.1 Revisión general.	5
5.2 Estabilización.	5
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	8
6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry TC	9
7. INFORME.	9
8. RESPONSABILIDADES.	9
8.1 Líder de Calidad.	9
8.2 Líder de Laboratorio.	9
8.3 Analistas.	9
9. FORMATOS RELACIONADOS.	10
10. ANEXOS.	

1. OBJETIVO Y ALCANCE

1.1 OBJETIVO: Determinar el contenido de Unidades formadoras de colonia (UFC) de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) mediante la técnica de recuento en placa.

1.2 ALCANCE: Aplica para el personal técnico del Laboratorio.

2. DEFINICIONES Y NOTACIONES.

2.1 Definiciones.

Lactobacilos[1]: (también *Lactobacillus* o bacterias del ácido láctico) son un género de bacterias Gram positivas anaerobias aerotolerantes, denominadas así debido a que la mayoría de sus miembros convierte a la lactosa y algunos monosacáridos en ácido láctico, dando lugar a la fermentación láctica. Habitualmente son benignas e incluso necesarias, habitan en el cuerpo humano y en el de otros animales; por ejemplo, están presentes en el tracto gastrointestinal y en la vagina. Muchas especies son importantes en la descomposición de la materia vegetal.

El Recuento en placa [1] es un método muy utilizado cuando se necesita determinar el tamaño de la población bacteriana de una muestra. El recuento de microorganismos, en este caso, se basa en que cada uno desarrollará una colonia visible. Pero debido a que una muestra no es totalmente homogénea con respecto a su composición microbiológica, es posible que una colonia se origine de un microorganismo o de cientos de ellos, dando en este último caso un recuento menor del real. También es posible que muchas de las bacterias presentes en la muestra no puedan crecer en las condiciones elegidas (pH, temperatura, medio de cultivo, tiempo, etc.).

Análisis microbiológico [4]: Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra.

Límites microbiológicos [4]: Son los valores permisibles de microorganismos presentes en una muestra, que indican la aceptabilidad higiénico-sanitaria de una superficie.


Incubadora [4]: 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 [6]: 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.

	Procedimiento para la determinación de bacterias ácido-lácticas por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-021
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

“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. REFERENCIA

[1] NTC5034: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de bacterias mesofílicas de ácido láctico. Técnica de recuento de colonias a 30°C.

[2] ISO 6887-1: -1 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1. General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. (NTC 4491).

[3] ISO 7218:1996, Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff. General Rules for Microbiological Examinations. (NTC 4092).

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

[2] 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

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

[4] NTC4519: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30 °c.

4. 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


Cámara de anaerobiosis

Bolsa de anaerobiosis o anaerogen

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

5. INSPECCIÓN VISUAL.

5.1 Revisión general.

	Procedimiento para la determinación de bacterias ácido-lácticas por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S	Identificación: PROC-TC-021
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

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 a 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"

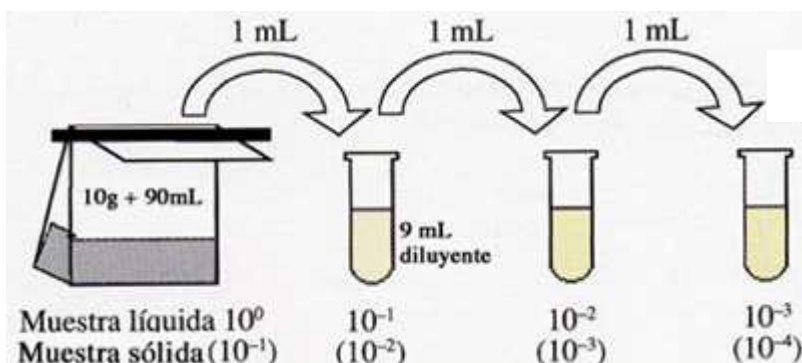
6. INSTRUCCIONES DE ENSAYO.

6.1 Preparación de soluciones

Solución	Cantidad reactivo	Cantidad Solvente	Observaciones
Agar Man RogosaSharper (MRS)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
Caldo Man RogosaSharper (MRS)	Según especificaciones de casa comercial	Según especificaciones de casa comercial	Preparar 15 a 20 ml por cada caja de Petri.
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 buferada 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 (liquida o solida).

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 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas en cámara de anaerobiosis.



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.

	<p align="center"> Procedimiento para la determinación de bacterias ácido-lácticas por el método recuento en placa AOXLAB S.A. S </p>	Identificación: PROC-TC-021
		Revisión: 2
		Inicio de vigencia: 2023-02-10

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 35°C ± 2°C durante 72 horas en cámara de anaerobiosis.

6.5 Recuento en Placa utilizando la metodología de Compact Dry TC

Realizar el recuento de los microorganismos presentes en la muestra. Para realizar el conteo 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).

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