



PROCOLOS

**ANÁLISIS
MICROBIOLÓGICO
EN LA INDUSTRIA
LÁCTEA**

Índice

INDUSTRIA LÁCTEA: PRESENTE Y FUTURO _____ **02**

PARTE I: FASES INICIALES Y PREPARACIÓN

**CULTIVOS INICIALES PARA PRODUCTOS LÁCTEOS
FERMENTADOS** _____ **06**

Procedimiento según ISO 27205:2010

**REGLAS ESPECÍFICAS PARA LA PREPARACIÓN DE LECHE Y
PRODUCTOS LÁCTEOS** _____ **07**

Procedimiento según ISO 6887-5:2017

PARTE II: MÉTODOS ESTANDAR PARA EL ANÁLISIS DE PRODUCTOS LÁCTEOS

ENUMERACIÓN DE HONGOS Y/O LEVADURAS _____ **09**

Procedimiento según ISO 6611:2011

**ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS
CARACTERÍSTICOS DEL YOGURT** _____ **10**

Procedure as defined by ISO 7889: 2003

ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS EN LA LECHE **11**

Procedimiento según ISO 8553:2004

**IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CARACTERÍSTICOS
(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus
thermophilus*)** _____ **12**

Procedimiento según ISO 9232:2003

**ENUMERACIÓN DE PSEUDOMONAS SPP. EN LECHE Y
PRODUCTOS LÁCTEOS** _____ **13**

Procedimiento según ISO 11059:2009

ENUMERACIÓN DE E. COLI PRESUNTIVA EN LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS _____ **14**

Procedimiento según ISO 11866-1:2005

ENUMERACIÓN DE E. COLI PRESUNTIVA. RECuento A 44°C _____ **15**

Procedimiento según ISO 11866-2:2005

ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES. RECuento A 30°C _____ **16**

Procedimiento según ISO 13559:2002

ENUMERACIÓN DE BIFIDOBACTERIAS PRESUNTIVAS _ **17**

Procedimiento según ISO 29981:2010

ENUMERACIÓN DE ESPORAS ESPECIALMENTE TERMORRESISTENTES DE BACTERIAS TERMÓFILAS EN LECHE EN POLVO _____ **18**

Procedimiento según ISO 27265:2009

Industria láctea: presente y futuro.

La producción mundial de leche creció un 1,3% en 2020, ascendiendo a **852 millones de toneladas** según la OCDE, siendo el 81% de vaca, el 15% de búfalo y el 4% de cabra, oveja y camello en conjunto. Durante los próximos 10 años, se estima que este mercado crecerá un **1,6% anualmente**. También se prevé una mayor participación de productos lácteos frescos en este mercado durante la próxima década, precursor de muchos otros productos.

Esta dimensión del mercado muestra una realidad, los productos lácteos y sus derivados se encuentran en todos los frigoríficos y despensas del mundo, por lo que su control es fundamental, incluso vital, para evitar la **contaminación por patógenos**. *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* son los potenciales agentes de deterioro en esta industria y los que deberían estar **ausentes** en estos productos.

La ausencia de estos controles a lo largo de la historia ha tenido como consecuencia brotes de difteria, polio, tifus, o tuberculosis a lo largo y ancho del planeta. Incluso con los protocolos básicos de pasteurización en Europa, entre el 1 y el 6% de los casos por intoxicación alimentaria que se produjeron entre 1993 y 1998 se debieron a productos de esta industria, acorde con la OMS, con **Salmonella** y **S. aureus** como las más comunes. Otras menos comunes, como *Listeria* o *E. coli* presentaron una letalidad del 16%.

Para mejorar e incrementar el control de la industria, se establecieron **normativas ISO** que establecen métodos de referencia para el **control de calidad** de los productos de la industria láctea.



A photograph of an elderly man in a field, reaching out to touch the nose of a cow. The image is overlaid with a semi-transparent green filter. The man is on the left, looking towards the cow on the right. The background shows a grassy field with other cows in the distance.

PARTE I:
Fases iniciales y preparación

Cultivos iniciales para productos lácteos fermentados

Procedimiento según ISO 27205:2010

Introducción

La preparación de cultivos iniciadores es predominantemente para bacterias del ácido láctico, pero también incluye bacterias propiónicas y bifidobacterias para la fabricación de productos lácteos fermentados. No se contemplan las bacterias utilizadas en la industria alimentaria por sus propiedades probióticas.



ENUMERACIÓN DE BACTERIAS ACIDOLÁCTICAS EN CULTIVOS INICIALES:

- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*: Método del Caldo MRS (ISO 7889).
- *Lactobacillus acidophilus*: Método Agar MRS con clindamicina y ciproflaxina (ISO 20128).
- *Enterococcus faecium*, *pediococci* y *lactobacilli*: Agar MRS siguiendo la ISO 7889, con un pH en el medio entre 6 - 6,4. Incubar por 72h a 37°C.
- *Lactococci* y *Streptococcus thermophilus*: Agar M17 (CAT. 1318) (ISO 7889), con pH 7,2 para *Lactococcus* (cultivar a 20°C por 5 días) y a pH 6,8 para *S. thermophilus* (aeróbico, cultivar a 45°C por 48h).
- Bacterias ácido lácticas fermentadoras de citrato: (ISO 17792) Método Nickels y Leesment.
- *Leuconostoc spp.*: (ISO 17792) Método Nickels y Leesment con vancomicina.

MÉTODOS PARA LA ENUMERACIÓN DE PROPIONOBACTERIUM SPP. EN CULTIVOS INICIALES

- Medio modificado para levaduras con extracto de lactato.

MÉTODOS PARA LA ENUMERACIÓN DE BIFIDOBACTERIUM SPP. EN CULTIVOS INICIALES

- Usando el Agar TOS (CAT. 2011) con Suplemento Selectivo MUP (CAT. 6074).

MÉTODOS PARA LA ENUMERACIÓN Y DETECCIÓN DE CONTAMINANTES

- Bacterias no ácido lácticas: ISO 13559.
- Hongos y levaduras: OSP 6611, ISO 21257.
- *Enterobacteriaceae*: ISO 21528.
- *Staphylococcus coagulasa positivo*: ISO 6888.
- *Lysteria monocytogenes*: ISO 11290. Para el ensayo de patógenos, diluir 1g de muestra en diluyente estéril. Mezclar y añadir 225g de medio de cultivo líquido a la concentración conveniente.
- *Salmonella spp.*: Si se analiza en presencia de bacterias ácido lácticas: modificar el medio de pre-enriquecimiento en función de las UFC:
 - Hasta 108 UFC: Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402) + vancomicina 10mg/L.
 - Hasta 1011 UFC: Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402) + vancomicina 10mg/L + verde malaquita 40mg/L + leche 10g/L.
 - Más de 1011 UFC: Agua Peptonada Tamponada (CAT. 1402) + vancomicina 10mg/L + verde malaquita 40mg/L + leche 10g/L.



Reglas específicas para la preparación de leche y productos lácteos

Procedure as defined by ISO 6887-5:2017



Introducción

La leche, compuesta en un 87% de agua, es propensa a la adulteración debido a las malas prácticas agrícolas. Además, su alto valor nutritivo lo convierte en un medio ideal para la rápida multiplicación de bacterias, particularmente bajo un proceso de producción antihigiénico y almacenamiento a temperatura ambiente.

Sabemos que, para que cualquier fabricante pueda ofrecer productos lácteos seguros, es fundamental contar con materias primas de buena calidad. Un procesador o manipulador de leche solo se asegurará de la calidad de leche cruda si se realizan determinadas pruebas básicas de calidad en las distintas etapas del transporte de la leche, desde el productor hasta el transformador y finalmente hasta el consumidor.

1. Preparaciones

- Seguir la ISO 6887-1 para productos congelados.
- Los compuestos deshidratados se mezclan con diluyente (precaución con la temperatura).
- Productos heterogéneos: homogeneizar.

2. Procedimientos generales

Siguiendo las buenas prácticas de laboratorio y procedimientos apropiados, deben hacerse algunas observaciones:

- Neutralizar el pH en los productos ácidos.
- Productos dietéticos con alto contenido graso deben ser diluidos para mejorar la emulsión durante la suspensión.

3. Procedimientos específicos

- **3.1. Leche y productos lácteos:** mezclar 25 veces y diluir 1:10 con **Agua Peptonada Salina ISO (CAT. 1405)** (diluyente general).
- **3.2. Leche en polvo, Suero de leche en polvo, suero ácido de leche en polvo, suero de mantequilla deshidratada y lactosa:** mezclar debidamente. Pesar 10g y diluir en **diluyente general**.
- **3.3. Quesos y derivados:** pesar 10g y diluir en 90mL de **diluyente general**.
- **3.4. Mantequilla:** calentar 10g de muestra a 45°C, y añadir 90mL de **diluyente general** a 45°C.

Se diluye una porción de 50g en el mismo **diluyente general** buscando tener 1mL de diluyente por cada gramo de mantequilla. Calentar en baño a 45°C no más de 15'.

- **3.5 Helado:** diluir 10g de muestra en 90mL de **diluyente general** a temperatura ambiente.

- **3.6 Natillas, nata y postres:** añadir 10g de muestra a un frasco con cuentas de cristal, diluir con 90mL de **diluyente general** a temperatura ambiente.

- **3.7 Leche fermentada y crema agria:** mezclar 10g de muestra en 90mL de **diluyente general** (pH 7,5).

- **3.8 Productos infantiles basados en leche:** mezcla exhaustiva. Diluir 10g de muestra en 90mL de **diluyente general**.

Si la muestra es difícil de homogeneizar, añadir el doble de **diluyente general**.



PARTE II:
**Métodos Estándar para el
Análisis de Productos Lácteos**

Enumeración de Hongos y Levaduras

Procedimiento según ISO 6611:2004



Introducción

El crecimiento de levaduras y mohos es una causa común del deterioro de los productos lácteos, que causa entre el 5% y el 10% del deterioro de los alimentos. En las leches fermentadas, el riesgo es aún mayor porque estos microbios pueden crecer en rangos de pH bajos. El deterioro del producto conlleva el desperdicio de una gran cantidad de alimentos y su consecuente impacto económico, pero, lo que es más importante, puede acarrear graves consecuencias para el consumidor. Las levaduras y los mohos no son muy peligrosos por sí mismos. Sin embargo, producen micotoxinas, partículas tóxicas que, en grandes dosis y mantenidas en el tiempo, pueden provocar graves problemas de salud.

1. Preparación de la muestra

Prepare la muestra siguiendo la norma ISO 8261. La duración del procedimiento se indica en ISO 6887-1.

2. Inoculación e incubación

Passar a dos placas Petri 1 mL de muestra si es líquida o 1 mL de suspensión inicial. Repetir "n" veces, siendo "n" el número de diluciones preparadas.

Transferir 15 mL de **YGC (CAT. 1301)** precalentado e incubar a 25°C por 5 días.

3. Interpretación

Conservar las placas con 10 - 150 colonias. En caso de tener placas con demasiado crecimiento, mantener una dilución mayor, aunque se obtengan menos de diez colonias.

4. Confirmación al microscopio

La identidad de las colonias puntuales o dudosas deberá ser investigado por examen microscópico.



Enumeración de microorganismos característicos del yogurt

Procedimiento según ISO 7889:2003

Introducción

El yogurt es un elemento esencial en muchas culturas, y ha estado presente en la historia durante más de 10.000 años. Durante todo este tiempo, incluso cuando la gente no lo sabía, se han utilizado microorganismos para su producción.

Hoy en día sabemos en plenitud qué microorganismos se utilizan en este proceso, siendo los dos más importantes *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. termophilus*. De ahí la necesidad de su control microbiológico.

Este método estándar permite contar y controlar la población de estos dos microorganismos en el yogurt.

1. Preparación de la muestra

- Para requerimientos generales sigue la ISO 8261.
- Para yogures sin fruta: tras mezclar la muestra, pesar 10g.
- Para yogures con fruta: mezclar los contenidos por 1', pesar 10g de muestra.

2. Examen al microscopio

- Para la determinación correcta de rangos de dilución. Teñir la muestra con **Azul de Metileno (CAT. 5058)**. Estimar la densidad de cocos y bacilos.

3. Preparación de la dilución primaria

- Seguir la ISO 8261. El peso máximo de la muestra con diluyente no debe superar los 50 g. Licuar por 1' y luego diluir hasta 100 g de peso para obtener una dilución 1:10.
- Las diluciones seriadas se realizan siguiendo la ISO 8261, donde también se indica la duración del proceso.

4. Inoculación e incubación

- Procediendo con duplicados, transferir 1 mL de cada dilución a placas Petri:
- Para *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, verter 15 mL de **Medio MRS acidificado** precalentado a 45°C en cada placa Petri.
- Para *S. termophilus* verter 15 mL de **medio M17 (CAT. 1318)** precalentado a 44 - 47°C.

Mezclar por rotación y dejar solidificar la mezcla.

En el primero de los casos, cultivar en condiciones anaerobias a 37°C por 72h. En el segundo caso, cultivar en condiciones aerobias a 37°C por 48h.

5. Enumeración de colonias

- Proceder con las placas con 15 - 300 colonias, contar solo aquellas con características propias de cada microorganismo, examinar las placas bajo luz tenue.

6. Confirmación

- Teñir las colonias seleccionadas usando la **tinción de Gram (CAT. 4600)**:
- Los bacilos Gram positivos no formadores de esporas, y catalasa negativos crecen en colonias marrones en el **Medio MRS Acidificado**.

- Los diplococos Grampositivo, catalasa negativa para cadenas de cocos o diplococos crecidos en **Medio M17 (CAT. 1318)**.

Las colonias o cepas dudosas deben ser consultadas siguiendo la ISO 9232.

Enumeración de microorganismos en leche

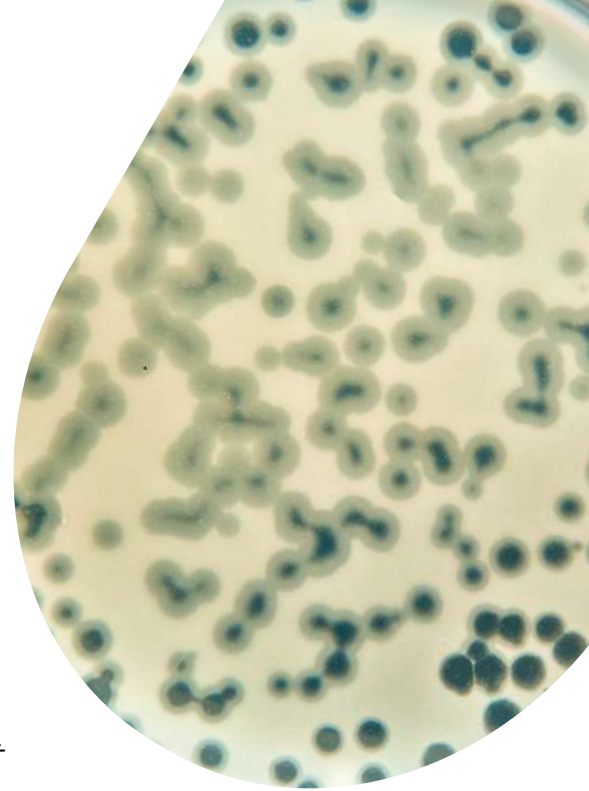
Procedimiento según ISO 8553:2004

Introducción

La leche puede contener microorganismos patógenos como *Salmonella*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus* y *Brucella melitensis*. Estos patógenos se introducen en la leche a través de la glándula mamaria, incluso si el animal no muestra signos de infección o enfermedad.

Son el principal motivo por el que la leche cruda pasa por diferentes procesos de esterilización como UHT, esterilización habitual o pasteurización. El consumo de leche cruda tiene una probabilidad considerablemente mayor de provocar efectos adversos en el consumidor que la ingestión de leche pretratada.

Este método estándar especifica una técnica para el recuento de microorganismos en la leche cruda utilizando la técnica de vertido en placa a 30°C.



1. Preparación de la muestra

- Calentar la muestra a 15 - 20°C y agitar.

2. Inoculación e incubación

- 0,001 mL de muestra en placas Petri y lavar el instrumento con la muestra con 1 mL de diluyente estéril. Repetir tantas veces como sea necesario. Esterilizar el instrumento cada 20 usos.
- Añadir 10 – 12 mL de **Agar Métodos Estándar con Leche en Polvo APHA/ISO (CAT. 1033)** para luego incubar a 30°C por 72h.

3. Enumeración de colonias

- Contaje manual. Sólo se tendrán en cuenta las placas con 10 - 300 UFC.



Identificación de microorganismos característicos (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*)

Procedimiento según ISO 9232:2003

Introducción

Lactobacillus bulgaricus y *Streptococcus thermophilus* han sido utilizados desde la antigua Tracia para la fermentación de leche de oveja en queso y yogurt en 6000 - 7000 a.e.c.

Hoy en día, estos microorganismos siguen utilizándose para el mismo proceso, por lo que su identificación y confirmación son cruciales para el correcto desarrollo del proceso en la industria. Para ello, esta norma ISO establece protocolos de referencia y recursos que permiten llevar a cabo la fabricación de estos productos bajo condiciones controladas.

1. Aislamiento

- Seleccionar colonias para el aislamiento de placas sembradas como se indica en ISO 7889, utilizando los caldos estipulados para obtener cultivos puros después de la incubación. Incubar a 37°C por 24h.

2. Identificación y confirmación

2.1 Identificación de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Usar leche desnatada y Caldo MRS (CAT. 1215) previo a cualquier ensayo.

- **Morfología:** incubar a 37°C por 24h en leche desnatada y teñir en **Azul Metileno (CAT. 5058)** por 10'.
- **Crecimiento a 15°C y 45°C:** usar una gota de **Caldo MRS** cultivado. Incubar a ambas temperaturas por 7 días.
- **Fermentación de azúcares:** seguir instrucciones del kit de fermentación.
- **Reacción catalasa:** mezclar volúmenes iguales de **Caldo MRS**. Incubar a 37°C por 18 - 24h con peróxido de hidrógeno 1,5%. Observar la posible formación de burbujas a temperatura ambiente por 20'.
- **Producción de CO₂:** inocular 10mL de medio de cultivo con 0,1mL **Caldo MRS** de la cepa de interés e incubar a 37°C por 24h con el tubo cubierto con una capa de agar.
- **Enantiómeros de ácido láctico:** subcultivar dos veces, analizar pureza con **Azul de Metileno (CAT. 5058)** y después realizar un tercer subcultivo. Tras analizar la pureza al microscopio, analizar los enantiómeros.

2.2 Identificación de *S. thermophilus*.

- **Morfología:** incubar a 37°C por 24h en leche desnatada y teñir en **Azul Metileno (CAT. 5058)** por 10'.
- **Reacción catalasa:** mezclar volúmenes iguales de **Caldo MRS**. Incubar a 37°C por 18 - 24h con peróxido de hidrógeno 1,5%. Observar la posible formación de burbujas a temperatura ambiente por 20'.
- **Crecimiento a 10°C y 45°C en leche tornasolada:** a tubos con leche tornasolada añadir una gota de **Caldo M17**. Incubar por 7 días a ambas temperaturas.
- **Crecimiento en presencia de cloruro de sodio:** inocular tubos de ensayo con una gota de **Caldo M17** preincubado durante la noche a 37°C. Incubar a 37°C por 7 días.
- **Acción en leche tornasolada:** la leche tornasolada acidificada por *S. thermophilus* se vuelve rosa.

Enumeración de *Pseudomonas* spp. en leche y productos lácteos

Procedimiento según ISO 11059:2009

Introducción

La contaminación por *Pseudomonas* generalmente significa defectos en la apariencia, el sabor, la textura y el olor, que a veces pueden llevar a la pérdida de confianza en la marca, aun no teniendo efectos sobre la salud del consumidor.

Pueden aparecer fácilmente después de la fermentación y la producción de lactato cálcico, ya que el pH aumenta lo suficiente como para que crezca *Pseudomonas*. Su presencia suele ser detectable por el sabor amargo y el olor rancio.

Por estos motivos deben ser detectados y descartados los productos contaminados.



1. Preparación de la muestra

- Preparar acorde a la ISO 6887-5.

2. Inoculación e incubación

- Cultivar en **placas PPA** las diluciones seriadas.
- Pipetear 0.1 mL de muestra en cada placa e incubar a 25°C por 48h.

3. Enumeración y Selección

- Contaje y selección de colonias de las placas con 150 UFC o menos, seleccionando 5 colonias de cada placa.

4. Confirmación

- Primeramente, se debe realizar un subcultivo con **Agar Nutritivo (CAT. 1060)**. Incubar a 25°C por 24 - 48h.
- Reacción oxidasa: +, incubar por 5 - 30s en presencia del **Reactivo Oxidasa (CAT. 6007)**.
- Fermentación de Glucosa: -, Incubar a 25°C por 24h en **Agar BCP Glucosa (CAT. 1320)**.

Enumeración de *E. coli* presuntiva en leche y productos lácteos

Procedimiento según ISO 11866-1: 2005



Introducción

Escherichia coli es un grupo de microorganismos con una gran diversidad y solo unos pocos son patógenos cuando se ingieren. Sin embargo, sigue siendo una de las especies más comunes asociadas a toxiinfecciones, incluida la leche y los productos lácteos. Generalmente, la consecuencia de su infección es la enterocolitis inespecífica. Se encuentra más comúnmente en la leche cruda, pero puede sobrevivir a ciertos procesos y condiciones posteriores al proceso, por lo que su detección es necesaria y obligatoria.

1. Preparación

- Según el método ofrecido por la ISO 8261.

2. Suspensión inicial

- La porción de prueba debe prepararse y diluirse siguiendo la norma ISO 8261.

3. Inoculación

- Tres tubos de **Lauril Sulfato** modificado de doble concentración, transferir a cada uno 10 ml de muestra si es líquido o 10 ml de dilución primaria.
- A continuación, transferir a 3 tubos con medio de enriquecimiento 1 ml de muestra si es líquido o 1 ml de dilución primaria en el caso de otros productos. (Repita si es necesario).
- Mezclar los inóculos con el medio.

4. Incubación

- Incubar tubos a 30°C por 24h.

5. Confirmación

- Añadir 0,5ml de **Reactivo de Kovac (CAT. 5205)** y mezclar por 1'.
- Deberán observarse fluorescencia y formación de gases.

Enumeración de *E. coli* presuntiva. Recuento a 44°C

Procedimiento según ISO 11866-2:2005

Introducción

Se prefiere este método para aquellas muestras en las que, comparativamente, hay un gran número de *E. coli* presuntiva: más de 100 UFC por gramo o 10 UFC por mililitro. Se debe tener precaución en la interpretación de los resultados, ya que algunas cepas patógenas de *E. coli* no crecen a 44°C.



1. Preparación de muestras y diluciones

- Acorde con el método indicado en la ISO 8261.

2. Recuperación

- Colocar membranas de acetato de celulosa en **Agar MMG**. Verter sobre ellas diferentes diluciones de la muestra. Incubar a 32°C por 4h.

3. Aislamiento en medio selectivo

- Transferir membranas al **Medio TBA (CAT. 1013)**.
- Incubar a 44°C por 24h.

4. Detección y enumeración

- Pipetear 2mL de **Reactivo de Kovac (CAT. 5205)** sobre las membranas. Después sumergir las membranas en el reactivo.
- Remover el exceso de reactivo. Para un grabado permanente de los resultados, exponer la muestra 30' a luz UV.

5. Confirmación

- Añadir 0,5mL de **Reactivo Kovac (CAT. 5205)** y mezclar por 1'.
- Deberán observarse fluorescencia y formación de gases.

Enumeración de microorganismos contaminantes. Recuento a 30°C

Procedimiento según ISO 13559:2002



Introducción

Estos microorganismos suponen un grave peligro potencial para la salud humana. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 y *Campylobacter* spp. son los patógenos más comunes asociados al consumo de leche cruda.

1. Preparación de la muestra y suspensión inicial

Para los requisitos generales sigue lo indicado en la ISO 6887-1, para los específicos seguir la ISO 8261. Lo mismo para las diluciones.

2. Inoculación

Inoculación en un medio de cultivo general para requisitos generales (ISO 6887-1) o específicos como mantequilla, queso fresco o leche fermentada (ISO 8261).

Incubar a 30°C durante 70 ± 2 h en **Agar Gelisato** (CAT. 1187).

3. Enumeración

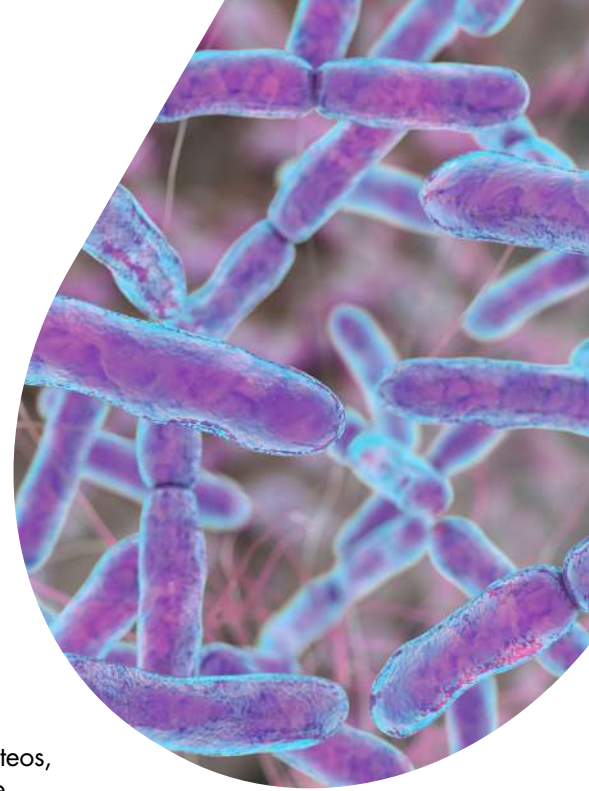
Contar colonias con características típicas de los microorganismos contaminantes.

Enumeración de bifidobacterias presuntivas

Procedimiento según ISO 29981:2010

Introducción

Bifidobacterium es un agente probiótico importante para muchos productos lácteos, ya que ofrecen numerosos beneficios para la salud: reducción de los niveles de colesterol sérico, mejora de la función inmunológica o reducción de la intolerancia a la lactosa. Generalmente se utiliza un componente del cultivo iniciador destinado a producir bebidas fermentadas, quesos frescos, helados y postres congelados.



1. Preparación de la muestra

1.1 Productos de leche en polvo.

Pesar 90 g de **Agua Peptonada Salina (CAT. 1405)** o **Solución Ringer 1/4 (CAT. 4101)** en cada botella y calentar en baño a 45°C. Luego agregar 10 g de muestra de prueba. Calentar durante 5' y dejar enfriar mientras se agita durante 2'.

1.2 Productos similares al yogurt (ISO 6887-5).

Pesar a temperatura ambiente 90 g de **diluyente**, y vertir en botellas cerradas y mezclar. Agregue 10 g de muestras de prueba y vuelva a mezclar.

2. Examen al microscopio

Examen microscópico para determinar las diluciones a utilizar. Alternativamente, utilizar microscopía de fase.

3. Preparación de diluciones decimales

Se realizarán 1:10 en diluyente estéril. Mezclar antes y después. Se recomiendan cuatro pasos de dilución.

4. Inoculación e incubación

1 mL por dilución en placas Petri con **Base de Agar Propionato TOS ISO (CAT. 2011)** suplementado con **MUP (CAT. 6074)**, 2 replicados por cada uno. Añadir 12 - 15 mL de medio y mezclar. Cultivar a 37°C por 72h.

5. Contaje de colonias

Las colonias de bifidobacterias son las de color blanquecino. Contar esas placas con una cantidad contable de colonias.

Enumeración de esporas especialmente termorresistentes de bacterias termófilas en leche en polvo

Procedimiento según ISO 27265:2009

Introducción

Este método está limitado a productos lácteos deshidratados. La ausencia de esporas en ellos es fundamental, para que el producto final no tenga agentes tóxicos potenciales. Los microorganismos formadores de esporas pueden adaptarse para sobrevivir a los procesos de UHT formando esporas, creciendo y contaminando el producto final una vez que las condiciones son menos agresivas.

Las esporas pueden sobrevivir a procesos por debajo de los 140°C, como aquellos entre 90°C y 121°C. Una vez que estos productos se dejan a temperatura ambiente, esas esporas pueden desarrollar microorganismos, como ocurre con *Clostridium* o *Cronobacter*.

La infección por *Cronobacter* en lactantes no es frecuente, pero es muy peligrosa, incluso letal (septicemia o meningitis). Se encuentran principalmente en la leche en polvo para bebés.



1. Preparación

- Preparar la dilución primaria acorde a ISO 6887-5.

2. Tratamiento de calor de la muestra

Después de diluir la muestra 1:10, transferir 10 ml a diferentes tubos. Colocar en un baño de agua hirviendo. Registrar los tiempos de los siguientes sucesos:

- La muestra alcanza los 100°C. Cerrar ventilación.
- Muestra control alcanza los 105,5°C (max.6').
- Mantener constantes los 106°C por 30' desde que se alcanzó el segundo punto.
- Apagar fuente de calor. Cuando el tubo control esté por debajo de los 100°C, liberar la presión de los recipientes y dejar enfriar en una gradilla a 15 - 25°C.

3. Inoculación e incubación

- Transferir 1 mL de dilución primaria, secundaria y piloto a 3 placas de **Agar de Contaje de Leche Desnatada con 0,2% de Almidón BCP**. Ahora, verter 1.5mL de medio en cada placa. Mezclar y cultivar a 55°C por 48h.

4. Contaje de colonias

- Registrar el número total de colonias contadas por las tres placas para cada dilución como el contaje específico de cada dilución. Mantener las placas con 300 colonias o menos.



Condalab

Inspired by knowledge

export@condalab.com | www.condalab.com