Instituto Politécnico

Universidad Nacional de Rosario Universidad Nacional de



Guía de Trabajos Prácticos II

5º Año

Microbiología de los Alimentos

Cód. 220503-26

García, María Eugenia

Dpto. de Tecnología de los alimentos

Masterización: RECURSOS PEDAGOGICOS

ÍNDICE

Muestreo ambiental 2
Objetivos 2
Toma de muestras de aire en placas 2
Recuento de viables 3
Actividad práctica 4
Muestreo de superficies 10
Objetivos 10
Introducción 10
Método del hisopo (Swab method) 11
Actividad práctica 12
Muestreo y análisis microbiológico de aguas 18
Objetivos 18
Introducción 18
Determinación de bacterias en agua 19
Procedimiento para la toma de muestra de agua para análisis microbiológico 20
Siembra en placa para bacterias mesófilas aerobias 22
Bibliografía 25

Trabajo Práctico N.°5

Muestreo ambiental

Objetivos

a. Recolectar muestras de aire en distintos ambientes mediante el método pasivo por sedimentación, utilizando placas de Petri con medio de cultivo adecuado.
b. Analizar la flora microbiana presente en el aire, a partir de su deposición por acción de la gravedad.
c. Interpretar los resultados del muestreo mediante el recuento de colonias desarrolladas en placa y su caracterización general.
d. Evaluar las condiciones higiénicas del área de trabajo a partir de la cuantificación y caracterización de los microorganismos ambientales sedimentados.

Toma de muestras de aire en placas

El control microbiológico del aire constituye una herramienta importante para evaluar las condiciones higiénico-sanitarias de los ambientes donde se elaboran, manipulan o almacenan alimentos. Los microorganismos presentes en el aire pueden encontrarse asociados a partículas de polvo, gotas o pequeñas partículas de origen biológico y, al depositarse sobre superficies, equipos o alimentos expuestos, pueden contribuir a la contaminación del proceso. Por este motivo, conocer la carga microbiológica ambiental permite detectar situaciones que podrían favorecer la contaminación y orientar medidas de higiene y control.

La toma de muestras de aire es un proceso crítico que requiere cuidado y precisión para obtener resultados representativos y confiables. El procedimiento se divide en las siguientes etapas:

Selección del lugar de muestreo: Es crucial seleccionar un lugar representativo que refleje las condiciones ambientales que se desean estudiar. Esto puede implicar considerar la presencia de fuentes de contaminación cercanas, la dirección del viento, la altura sobre el suelo y otros factores relevantes.

Elección del equipo de muestreo: En este práctico se utilizará el *método pasivo por sedimentación*, empleando placas de Petri con medios de cultivo adecuados. A diferencia de los métodos activos (que usan bombas de aspiración volumétrica), este método se basa en la deposición espontánea de las partículas por acción de la gravedad

Procedimiento de muestreo: Una vez que el material esté listo, se coloca en el lugar seleccionado y se inicia el proceso de toma de muestras

Registro de información: Durante el proceso de muestreo, se debe registrar toda información relevante como la fecha, hora, condiciones meteorológicas, y cualquier otro dato que pueda afectar los resultados.

Recuperación de la muestra: Una vez completado el período de exposición, se retira el material del lugar con cuidado para evitar contaminación cruzada de la muestra.

Almacenamiento y transporte: Almacenar la muestra de manera adecuada en un rack (figura 1) evitando abrir la placa hasta llegar al laboratorio donde se incubarán a las temperaturas indicadas.



Figura 1. Rack contenedor para transporte de placas de Petri

Recuento de viables

Si se desea contar solo células vivas, se consideran viables únicamente a aquellas capaces de dividirse para dar lugar a una descendencia. Para ello, se lleva a cabo el recuento de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido, razón por la cual se lo denomina recuento en placa o recuento de colonias.

El recuento de viables generalmente se expresa como Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Este método tiene una alta sensibilidad y, al usar medios selectivos, permite el recuento de un tipo particular de microorganismos.

Materiales y equipos

- Placas de Petri, medios de cultivo estériles
- Incubadoras, baños de agua
- Encendedor, timer, cinta de papel
- Fibrón indeleble, cuaderno de campo

Actividad práctica

1. **Preparación del medio de cultivo:** Acondicionar los tubos que contienen el medio de cultivo estéril mediante calentamiento en baño María, hasta lograr la licuefacción completa del medio.

Una vez fundido, transferir el medio de cultivo a las placas de Petri estériles, procurando conservar las condiciones de esterilidad durante toda la operación y evitar cualquier contaminación del medio. Distribuir de manera uniforme hasta cubrir la totalidad de la placa.

Dejar enfriar y solidificar a temperatura ambiente antes de proceder al muestreo.

2. **Selección del lugar de muestreo**: Seleccionar y registrar el sitio de muestreo de acuerdo con el objetivo del análisis. El muestreo podrá realizarse tanto en ambientes interiores, como laboratorios, salones, baños o áreas de trabajo, como en ambientes exteriores**,** tales como áreas urbanas, patios u otros sitios de interés.

3. **Toma de muestras por sedimentación:** El muestreo se realizará mediante el método de sedimentación pasiva, basado en la exposición directa de placas de Petri conteniendo un medio de cultivo sólido al aire ambiente. Durante el período de exposición, los microorganismos presentes en el aire y asociados a partículas en suspensión pueden depositarse por sedimentación gravitacional sobre la superficie del medio.

Utilizar los elementos de protección personal (EPP) y abrir cuidadosamente las placas estériles, evitando el contacto de la superficie del medio de cultivo con las manos u otras superficies.

Este método permite realizar una evaluación cualitativa de los microorganismos capaces de desarrollarse bajo las condiciones de cultivo seleccionadas y, en determinadas condiciones, una estimación semicuantitativa mediante el recuento de las colonias desarrolladas y su relación con el tiempo y el área de exposición. No permite determinar directamente la concentración de microorganismos por unidad de volumen de aire, dado que no se establece ni controla un volumen definido de aire muestreado, a diferencia de los métodos activos de captación de aire.

4. **Exposición al aire:** Colocar las placas de Petri abiertas en el sitio de muestreo y mantenerlas expuestas al ambiente durante un período de tiempo previamente establecido. Para ambientes interiores, se sugiere un tiempo no inferior a **15 minutos** a fin de favorecer una captación representativa de los microorganismos sedimentables presentes.

Para favorecer la estandarización del muestreo, ubicar las placas aproximadamente a **1 m por encima del nivel del suelo** y a una distancia aproximada de **1 m de las paredes** u otros obstáculos que puedan interferir con la sedimentación libre de las partículas**.**

Registrar el tiempo exacto de exposición, considerando que este debe ser ajustado según el objetivo del muestreo y las condiciones ambientales (en exteriores, el tiempo se ajusta según factores climáticos como el viento o la humedad).



5. **Recuperación y transporte de las placas:** Finalizado el período de exposición, cerrar inmediatamente las placas de Petri y asegurarlas con cinta para evitar su apertura accidental durante su manipulación y traslado.

Identificar y rotular cada placa de forma clara y legible, consignando como mínimo: sitio de muestreo, tiempo de exposición, operador responsable, medio de cultivo y cualquier otro dato relevante para la trazabilidad de la muestra.

Colocar las placas de Petri en bolsas o recipientes adecuados para su transporte, a fin de evitar su apertura, contaminación o deterioro. Trasladarlas al laboratorio y mantenerlas en condiciones apropiadas de conservación hasta el momento de su procesamiento e incubación.

6. **Análisis e incubación en el laboratorio**: Las placas se incubarán bajo condiciones específicas de temperatura y tiempo de acuerdo con el medio de cultivo utilizado y los grupos de microorganismos que se pretende detectar o cuantificar.

a. Encender las incubadoras y permitir que alcancen y estabilicen la temperatura de trabajo antes de introducir las placas.

b. Establecer la temperatura de incubación según el medio de cultivo:

- Para las placas con medio PCA (Plate Count Agar), destinadas al recuento de bacterias mesófilas aerobias, establecer una temperatura de 37 °C.

- Para las placas con medio HyL o agar Sabouraud, destinadas al desarrollo y recuento de hongos y levaduras, establecer una temperatura de 30 °C.

c. Colocar las placas en la incubadora en posición invertida, con el objetivo de minimizar la formación y caída de condensación sobre la superficie del medio.

d. Realizar una primera observación a las 24 horas de incubación y una segunda evaluación a las 48 horas, registrando el desarrollo de colonias y cualquier característica relevante.

e. Transcurridas las 48 horas de incubación, retirar las placas de la incubadora y proceder al registro y análisis de los resultados obtenidos.

7. **Análisis y resultados**: Registrar la presencia o ausencia de crecimiento microbiano en cada uno de los medios de cultivo utilizados.

✓ Realizar la caracterización macroscópica de las colonias, considerando aspectos como morfología, tamaño, forma, coloración, superficie y otras características observables.

✓ Cuando resulte necesario, complementar la caracterización mediante técnicas microbiológicas, tales como tinciones y observación microscópica.

✓ Realizar el recuento de las colonias desarrolladas en cada placa, expresando los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

✓ Relacionar el número de UFC obtenido con el tiempo de exposición de las placas, expresando los resultados como UFC/min cuando corresponda.

✓ Registrar los resultados obtenidos para cada placa, incluyendo el sitio de muestreo, medio de cultivo, tiempo de exposición, condiciones de incubación y observaciones relevantes. Presentar los resultados en el informe mediante una tabla comparativa, acompañada de la descripción de las observaciones realizadas y las conclusiones correspondientes.

8. Cálculos

En esta instancia en que la muestra es de aire, no se realizan diluciones y se utilizan placas del mismo tamaño (el mismo área en todas las placas), se calculará la ***Tasa de***

Acumulación Temporal (UFC por unidad de tiempo de exposición) de la siguiente manera:

$$\text{UFC/min} = \frac{colonias\ en\ placa}{tiempo\ exposición\ (minutos)}$$

Donde;

- *Colonias en placa*: número de colonias contabilizadas en las placas
- *Tiempo de exposición*: tiempo, en minutos, que la placa de Petri permaneció abierta y destapada en el lugar de muestreo

También puede utilizarse una fórmula de estandarización para comparar los resultados obtenidos con placas de Petri de diferentes tamaños o con resultados obtenidos en otros laboratorios. Esta fórmula permite obtener la ***Tasa de Deposición Superficial Real*** (o velocidad de sedimentación), considerando tanto el área de exposición como el tiempo de exposición. De esta manera, se obtiene la cantidad de microorganismos que sedimentan por unidad de superficie y por unidad de tiempo, expresada en UFC/(cm²·min):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{cm2} * \text{min}} = \frac{colonias\ en\ placa}{área\ de\ la\ placa\ (cm2) * tiempo\ de\ exposición\ (\text{minutos})}$$

Dónde;

- *Colonias en placa*: número de colonias contabilizadas en las placas
- *Área de la placa (cm²)*: superficie del agar expuesta durante el ensayo, calculada a partir del diámetro de la placa mediante la fórmula: $A = \pi \times r^2$
- *Tiempo de exposición*: tiempo, en minutos, que la placa de Petri permaneció abierta y destapada en el lugar de muestreo

Consideraciones generales

Durante el muestreo de aire es fundamental mantener condiciones de asepsia para evitar contaminaciones externas al muestreo que pudieran alterar los resultados. Asimismo, es importante *rotular correctamente* todo el material.

Trabajo Práctico N.°6

Muestreo de superficies

Objetivos

a. Comprender la importancia del control microbiológico de superficies como herramienta para evaluar la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección
b. Aplicar la técnica de hisopado para el muestreo de superficies, utilizando condiciones de muestreo asépticas y un área de superficie conocida
c. Determinar la carga microbiológica de las superficies muestreadas mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) y expresar los resultados de manera cuantitativa

Introducción

La limpieza es un paso previo a la desinfección, por lo que constituye un factor de importancia prioritaria. La desinfección es la eliminación de microorganismos patógenos (protozoos, hongos, bacterias y virus) por medio de la inactivación o destrucción, alterando su estructura o su metabolismo, con el objetivo de impedir su transmisión al medio ambiente.

Es importante tener en cuenta que la calidad e inocuidad de los procesos y productos depende de la limpieza que presente el aire, las superficies y el personal involucrado en los procesos. Es por esto que el monitoreo microbiológico de diferentes áreas de trabajo, de las superficies de contacto con el producto y de las manos del personal son aspectos cruciales a considerar.

Control microbiológico de superficies

Este método proporciona información sobre la cantidad de microorganismos presentes en una superficie de cualquier naturaleza; generalmente, se utiliza para determinar si un procedimiento de limpieza está o no resultando eficaz.

Los programas de limpieza y desinfección se diseñan con el objetivo de reducir y, en algunos casos, eliminar la carga bacteriana y los restos de materia orgánica e inorgánica de las superficies alimentarias. De esta forma, se pretende minimizar el riesgo de contaminación cruzada para garantizar un producto seguro y de calidad.

Las bacterias que colonizan las superficies pueden actuar como reservorio de microorganismos alterantes y/o patógenos. A su vez, pueden contaminar los productos alimenticios. Por lo tanto, la utilidad de los métodos de control microbiológico de superficies debe considerarse como un eslabón crucial, tanto para la detección de microorganismos banales como patógenos.

Método del hisopo (Swab method)

Consiste en frotar con un hisopo estéril en un área, que estará determinada por una plantilla metálica / plástica de superficie conocida. El hisopo se debe humedecer en solución diluyente si la superficie a muestrear está seca, sino se utiliza tal cual está envasado.

El tipo de muestreador usado puede variar: hisopos (generalmente de 12 cm) confeccionados a partir de diferentes materiales; también se usan telas, esponjas, gasas, paños, etc., dependiendo del tipo de superficie a muestrear y del material disponible en el laboratorio.



Figura 1. Plantilla e hisopos estériles para muestreo de superficies

Materiales y reactivos

- Plantilla estéril 10 x 10 cm
- Hisopos estériles, paños estériles o gasas
- Tubos estériles con y sin diluyente
- Fibrón indeleble
- Libro de campo para anotar detalles relevantes de la toma de muestra
- EPP (guardapolvo, guantes estériles, cofia, gafas)

Actividad práctica

Monitoreo Microbiológico de Superficies por el método del hisopado

- Seleccionar el lugar de muestreo

- Rotular el tubo o vial del hisopo con los datos de la superficie a muestrear, fecha y hora

- Lavarse las manos minuciosamente y colocarse guantes estériles o descartables nuevos

Humedecer del hisopo:

- Abrir el tubo que contiene el diluyente o medio de transporte.

- Introducir el hisopo para humedecer el mismo y presionar ligeramente contra la pared interna del tubo mediante un movimiento de rotación para retirar el exceso de líquido.

Colocación de la plantilla:

- Tomar la plantilla estéril y ubicarla firmemente sobre la superficie elegida a muestrear (delimitando el área estándar de 10 cm x 10 cm). Evitar contaminar la parte interna de la plantilla.

Toma de la muestra:

- Sostener el hisopo formando un ángulo de 30° respecto a la superficie de contacto.

- Frotar la superficie delimitada por la plantilla ejerciendo una presión firme.

- Realizar los movimientos 4 veces, cambiando la dirección de la frotación en cada pasada (por ejemplo: primero en sentido horizontal o vertical de arriba hacia abajo, y luego en diagonal o zigzag opuesto) para cubrir todo el área de manera uniforme.

- Girar el hisopo sobre su propio eje a medida que se frota para utilizar toda el área de la fibra.

- Para superficies irregulares (utensilios), repetir la operación con 3 utensilios más (total 4 como máximo), con el mismo hisopo. Registrar el número de piezas muestreadas.

Guardado y conservación:

- Regresar inmediatamente el hisopo al tubo con el medio de transporte sin tocar las paredes externas del envase ni ninguna otra superficie no estéril.

- Asegurar el cierre hermético del tubo.

- Colocar la muestra en heladera o caja térmica con refrigerantes (generalmente conservando a temperaturas menores a 10 °C) para su posterior traslado al laboratorio.

Preparación de la muestra madre y diluciones seriadas

Para realizar el recuento microbiológico de superficies, se debe preparar una muestra madre y, cuando sea necesario, realizar diluciones seriadas que permitan obtener recuentos dentro del rango contable.

Muestra Madre (Dilución 10^{-1}): Agitar vigorosamente en un mezclador vórtex durante 30 segundos el tubo que contiene el hisopo y los 9 ml de diluyente estéril (agua peptonada). Esto favorece la liberación de los microorganismos retenidos en las fibras del hisopo. Esta suspensión constituye la muestra madre y se considera la dilución inicial 10^{-1}.

Diluciones seriadas posteriores:

- Dilución 10^{-2}: Transferir con una pipeta estéril 1 ml de la muestra madre a un tubo con 9 ml de diluyente estéril y homogeneizar en vórtex.
- Dilución 10^{-3}: Transferir 1 ml de la dilución 10^{-2} a otro tubo con 9 ml de diluyente estéril y homogeneizar en vórtex.
- Diluciones sucesivas: Continuar de la misma manera si se requieren diluciones mayores.

Método de siembra en placa

Siembra por Superficie (Spread Plate)

- **Preparación:** Utilizar placas de Petri que ya contengan el medio previamente solidificado y seco.
- **Inoculación:** Pipetear 0,1 ml de la dilución elegida sobre el centro de la superficie del agar.
- **Dispersión:** Extender el líquido de forma homogénea por toda la superficie utilizando una espátula de Drigalsky estéril (de vidrio o plástico) rotando la placa al mismo tiempo.
- **Absorción:** Dejar la placa en posición normal unos minutos hasta que el volumen de inóculo sea completamente absorbido por el agar.

Incubación e Interpretación

- **Inversión de placas:** Una vez listas y sólidas, invertir las placas (colocar la tapa hacia abajo) para evitar que las gotas de condensación caigan sobre el cultivo.
- **Condiciones de incubación:**

✓ Las placas de **PCA** se incuban a **35 °C - 37 °C** durante 24-48 horas para bacterias mesófilas totales.

✓ Las placas de **HyL** se incuban 30°C durante 24-48 horas para Hongos y levaduras

Cálculos

A las 24-48 h se calcularán las UFC por cm^2 de superficie muestreada de la siguiente manera:

- $UFC/cm^2 = \frac{colonias\ en\ placa * inversa\ dilución}{área * vol\ inoculado}$

Dónde;

- *Colonias en placa*: número de colonias desarrolladas y contabilizadas en las placas de cultivo
- *Inversa de la dilución:* factor de corrección correspondiente a la dilución de la muestra sembrada. Se obtiene como el inverso del factor de dilución
- *Área (cm^2)*: área de la superficie muestreada que depende de la plantilla estéril utilizada
- *Volumen inoculado:* volumen de la dilución de la muestra que se sembró en la placa, expresado en ml.

Definiciones claves

Ambiente	
Ambiente	Cualquier ítem en contacto con el alimento o que represente una fuente de contaminación o recontaminación; ejemplo: materiales, consumibles, operadores.
Manipulador de alimentos	Toda persona que con sus manos toma contacto directo con alimentos envasados o no envasados, equipos y utensilios utilizados para su elaboración y preparación o con superficies que están en contacto con los alimentos.
MOs indicadores	Grupos o especies de MOs utilizadas para evaluar la calidad microbiológica general de un alimento. Advierten de un manejo inadecuado o de niveles altos de contaminación con riesgo de presencia de patógenos.
Biofilmes	Comunidad microbiana adherida a una superficie en la que las células se mantienen unidas por una matriz extracelular. Se trata de una bioincrustación. La adherencia se genera por producción de polímeros extracelulares (polisacáridos y glicoproteínas). Pueden ser desde una simple monocapa de bacterias sobre una superficie a un tapete microbiano. Las bacterias pueden crecer en contacto con superficies

	sucias y formar biofilms que son muy difíciles de eliminar durante las operaciones de limpieza, por incremento de su resistencia a los desinfectantes.
Nicho	Sitio dentro del entorno de las líneas de producción donde se establecen MOs y actúan como fuente de contaminación, alcanzando varias producciones. Los patógenos pueden dar origen a brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs). Los nichos pueden ser partes o sectores poco accesibles de equipos de proceso o sus piezas.
Superficies inertes	Partes externas y/o internas de los utensilios y enseres en contacto con alimentos, ej: equipos, mobiliario, vajilla, cubiertos, tabla de picar, etc.
Superficies vivas	Partes externas del cuerpo humano que entran en contacto con el equipo, utensilios y alimentos durante su preparación y consumo: las manos con o sin guantes del manipulador de alimentos

Materiales	
Hisopo	Instrumento contenido en un tubo o envoltura, que consta, en su versión básica, de un palillo rompible con un extremo recubierto con algodón o material sintético (como alginato o rayón) que se utiliza humedecido con una solución diluyente para facilitar la recuperación bacteriana en el muestreo de superficies.
Esponja	Cuadrado plano de celulosa o poliuretano (4x8 cm o 5x5 cm), estéril, sin inhibidores y empacados individualmente; Para muestreo de superficies grandes (>100 cm^2)
Paño/tela	Tipo de género (17 x 30 cm) libre de inhibidores, empacados individualmente en bolsas plásticas estériles, utilizados (humedecidos) para el muestreo de superficies grandes (>100 cm^2).
Sistema de muestreo	Conjunto formado por el elemento muestreador propiamente dicho (hisopo, paño/tela o esponja) dentro de un contenedor (tubo/bolsa) que contiene una solución diluyente.
Sanitizante	Agente antimicrobiano que se utiliza para destruir los MOs. Al proceso de aplicación se le conoce como **desinfección** o **sanitización**. Pueden ser alcoholes, aldehídos, halogenuros, fenoles o compuestos de amonio cuaternario (quats).
Dispositivo refrigerante	Producto acumulador de frío, de descongelamiento retardado, no tóxico, no comestible y re utilizable, usado para mantener la cadena de frío.

Operaciones	
Operaciones en campo	Aquellas que se realizan en el establecimiento donde se procesan, elaboran, almacenan, fraccionan o expenden alimentos y bebidas, sea fábrica, almacén, servicios de alimentos, puesto, comedor u otros. Comprende las siguientes operaciones consecutivas realizadas por personal capacitado: 1) Procedimiento para la selección de la muestra. 2) Selección del método de muestreo. 3) Procedimiento para la toma de muestra.

Recuperación de MOs	Aplicación de un método de extracción de MOs residentes sobre diferentes superficies para luego proceder a su análisis microbiológico.
Método del hisopo	Denominación general, referida a un tipo de muestreo que puede utilizar distintos dispositivos de muestreo (hisopos con punta de tela, algodón o rayón, telas, esponjas, gasas, paños, etc.), dependiendo de la naturaleza de la superficie a muestrear y del material disponible en el laboratorio.
Desinfección	Proceso que elimina agentes patógenos reconocidos, pero no necesariamente todas las formas de vida microbianas. Existen diversos niveles de desinfección, desde una esterilización química a una mínima reducción del número de MOs contaminantes. Estos procedimientos se aplican sólo a objetos inanimados

Operaciones	
Operaciones en campo	Aquellas que se realizan en el establecimiento donde se procesan, elaboran, almacenan, fraccionan o expenden alimentos y bebidas, sea fábrica, almacén, servicios de alimentos, puesto, comedor u otros. Comprende las siguientes operaciones consecutivas realizadas por personal capacitado: 1) Procedimiento para la selección de la muestra. 2) Selección del método de muestreo. 3) Procedimiento para la toma de muestra.

Recuperación de MOs	Aplicación de un método de extracción de MOs residentes sobre diferentes superficies para luego proceder a su análisis microbiológico.
Método del hisopo	Denominación general, referida a un tipo de muestreo que puede utilizar distintos dispositivos de muestreo (hisopos con punta de tela, algodón o rayón, telas, esponjas, gasas, paños, etc.), dependiendo de la naturaleza de la superficie a muestrear y del material disponible en el laboratorio.
Desinfección	Proceso que elimina agentes patógenos reconocidos, pero no necesariamente todas las formas de vida microbianas. Existen diversos niveles de desinfección, desde una esterilización química a una mínima reducción del número de MOs contaminantes. Estos procedimientos se aplican sólo a objetos inanimados

Trabajo Práctico N.º 7

Muestreo y análisis microbiológico de aguas

Objetivos

a. Conocer y aplicar los procedimientos estándares de muestreo de agua, asegurando la preservación de las muestras y el registro adecuado.
b. Obtener información sobre la calidad microbiológica general del agua mediante del recuento de bacterias mesófilas aerobias, relacionando los resultados con parámetros de referencia.
c. Reconocer la importancia de otros indicadores específicos de contaminación, como *Escherichia coli*, *Coliformes totales* y *Pseudomonas aeruginosa*, aunque en esta práctica se aborde únicamente el análisis de mesófilos aerobios.

Introducción

El muestreo de aguas es una práctica fundamental en la gestión de la seguridad alimentaria. El agua es un recurso indispensable en la producción de alimentos, utilizada en el riego de cultivos, la cría de ganado y los procesos industriales de transformación y limpieza. Por lo tanto, garantizar su calidad es esencial para asegurar que los alimentos que consumimos sean seguros y saludables.

El objetivo del muestreo de aguas en el contexto de la seguridad alimentaria es detectar y controlar la presencia de contaminantes que puedan afectar la salud humana. Estos contaminantes pueden incluir, además de microorganismos patógenos, sustancias químicas tóxicas y materiales orgánicos que, si no se gestionan adecuadamente, pueden ingresar a la cadena alimentaria y causar enfermedades.

El técnico/a responsable debe conocer los métodos y técnicas de muestreo de agua utilizados específicamente para garantizar la seguridad en la producción de alimentos. Debe conocer y saber aplicar los procedimientos estándares para la toma de muestras microbiológicas y la importancia de la correcta manipulación y análisis de las muestras para evitar contaminaciones cruzadas y asegurar la precisión de los resultados.

Determinación de bacterias en agua

El análisis de *bacterias mesófilas aerobias* no busca un tipo específico de bacteria, sino que realiza un recuento general de todas las que pueden crecer en presencia de oxígeno (aerobias) y a temperaturas moderadas (mesófilas, similares a la del cuerpo humano). Un recuento elevado no indica necesariamente un riesgo para la salud, pero sí aporta información sobre la calidad microbiológica del agua. Valores altos pueden estar asociados a estancamiento, presencia de biofilms en tuberías o tanques, o deficiencias en la desinfección. Por ello, constituye un buen indicador de la higiene y el mantenimiento del sistema de distribución.

La cantidad de colonias obtenidas refleja, de manera indirecta, la carga de materia orgánica disponible para el crecimiento microbiano. Las aguas tratadas o de alta pureza presentan recuentos muy bajos, mientras que las aguas superficiales sin tratamiento, aquellas contaminadas con aportes orgánicos o provenientes de filtros sobreutilizados y mal lavados, suelen mostrar cifras considerablemente más elevadas, especialmente en épocas de mayor demanda como el verano.

Además, según el Código Alimentario Argentino (CAA), para completar el análisis microbiológico de aguas para consumo también se debe incluir la detección de otras bacterias específicas como *Escherichia coli, Coliformes totales y Pseudomonas aeruginosa*, ya que estos microorganismos actúan como indicadores de contaminación fecal, calidad higiénica y posibles riesgos de infección.

Materiales y reactivos para muestreo

- Alcohol etílico
- Algodón, paños estériles o gasas
- Encendedor o mechero de alcohol
- Frascos estériles con tapa para toma de muestras
- Heladera (sachet de hielo)
- Fibrón indeleble
- Libro de campo
- EPP (guardapolvo, guantes estériles, cofia, etc.)

Envases para la toma de muestra para análisis bacteriológico



Para la obtención de muestras representativas deben utilizarse frascos esterilizados, de vidrio neutro (vidrio de borosilicato tipo Pyrex® o similar que es químicamente neutro frente al agua y no libera compuestos que puedan interferir en el análisis), con tapa a rosca o con tapón de goma y envoltura protectora de papel que impidan las contaminación externa. En el mercado se pueden adquirir también envases de plásticos esterilizados.

La capacidad más adecuada para un examen corriente es de 250 ml aproximadamente pero no hay inconveniente en utilizar frascos de distinto volumen si fuese necesario. La esterilización se efectúa por calor seco o por autoclave a 121 °C durante 15-20 minutos.

En frascos destinados a la toma de muestras de agua que contengan cloro residual, debe agregarse una sustancia que neutralice la acción del cloro para evitar que continúe su acción bactericida durante el tiempo que transcurre entre la extracción de la muestra y la iniciación del examen. A tal efecto, debe tomarse la muestra en frascos que contengan tiosulfato de sodio estéril.

Procedimiento para la toma de muestra de agua para análisis microbiológico

Preparación previa

- Agregar entre 0,1 y 0,2 ml de solución de Tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$) al 10% p/v en cada frasco de 250 ml destinado a la toma de muestras de aguas cloradas. Posteriormente, esterilizar los frascos en autoclave a 121 °C durante 15–20 minutos.

- Identificar y rotular claramente los envases estériles que se utilizarán para la toma de muestra.

- Retirar de la canilla anillos de goma, mangueras u otros dispositivos que puedan estar acoplados al grifo.

Limpieza inicial de la canilla

- Eliminar la suciedad visible de la canilla utilizando un paño limpio o dejando correr agua para arrastrar restos adheridos.

Purgado de la cañería

- Abrir el grifo a caudal máximo durante algunos segundos y luego mantener un caudal medio por al menos 2 a 3 minutos para purgar la cañería.

- Cerrar perfectamente el grifo para proceder a su desinfección.

Esterilización del grifo

- *Canillas metálicas*: flamear el pico de la canilla por dentro y por fuera utilizando la llama de una lámpara de alcohol, mechero o soplete portátil.

- *Canillas plásticas*: no flamear. Desinfectar con alcohol etílico (70–96%) utilizando un paño limpio o una gasa embebida. Luego enjuagar con agua estéril o destilada para eliminar residuos de alcohol y dejar secar al aire.

Enfriado del grifo (solo metálicas flameadas)

- Abrir nuevamente la canilla y dejar correr agua a caudal suave durante aproximadamente 30 segundos para enfriar el metal antes de la toma.

Toma de la muestra

- Sostener el frasco estéril por la parte inferior. Destaparlo cuidadosamente evitando tocar con los dedos la boca del frasco o la parte interna de la tapa.

- Si el frasco posee capuchón de papel aluminio, mantenerlo unido a la tapa y siempre orientado hacia abajo.

- Llenar el frasco directamente con el chorro de agua, sin enjuagarlo previamente, evitando desbordes.

- Dejar una pequeña cámara de aire para permitir la agitación posterior de la muestra.

Conservación y transporte

- Proteger la muestra de la luz.
- Transportar lo antes posible al laboratorio.
- Si no se analiza de inmediato, conservar el frasco en recipientes aislantes (cajas térmicas o conservadoras) con hielo o sachet refrigerantes para mantener la temperatura entre 4°C y 15°C.

Siembra en placa para bacterias mesófilas aerobias

Efectuar la siembra por el método de vertido en placa (ver anexo), colocando en el fondo de una caja de Petri 1 ml de la muestra o de la dilución correspondiente. Durante esta operación la tapa de la caja se levanta lo suficiente para permitir el paso de la pipeta, debiéndola cubrir después de haber depositado la muestra.

A cada caja de Petri se le agregan 14 ml del medio de cultivo PCA fundido. Previamente se flamea la boca del tubo de ensayo que contiene el agar. **Atención**: El agar fundido se deja enfriar en el tubo de ensayo hasta alcanzar aproximadamente 42-45 °C, temperatura segura para no afectar las bacterias de la muestra. Este control térmico puede realizarse de manera cualitativa abrazando el cuerpo del tubo durante unos segundos; si no se percibe sensación de calor que pueda dañar la muestra, el medio se puede verter sobre la placa de Petri.

Una vez el medio en la placa se imprime sucesivos movimientos rotatorios y rectilíneos con objeto de lograr una distribución uniforme de las bacterias en el medio de cultivo y obtener así colonias aisladas, más fáciles de contar. Durante esta operación se mantiene la caja apoyada sobre la superficie plana de la mesa.

Una vez solidificado el medio se coloca en la estufa en posición invertida, para su incubación a 37 °C, durante 24-48 h.

Una vez transcurrido el periodo de incubación, se retiran las cajas de la estufa y se procede a contar las colonias presentes en las placas. Para realizar el conteo, se

seleccionan aquellas cajas que contengan un número de colonias dentro del rango de 30 a 300 para medio para bacterias mesófilas aerobias.

Cálculos

Se calcularán las UFC por mililitro de muestra de la siguiente manera:

$$\text{UFC/ml} = \frac{colonias\ en\ placa * inversa\ dilución}{ml\ inoculado}$$

Anexo

- *Toma de muestra para análisis microbiológico de agua de grifo*

Metodología empleada para la toma de la muestra, detallando la importancia de flamear el grifo, dejar correr el agua por unos minutos, la utilización de recipientes estériles y por último la refrigeración de la muestra. Observar que en ningún momento el responsable técnico permite el contacto de la superficie de la tapa de los recipientes estériles con alguna superficie no estéril.



- Siembra en placa


Método de placa por dispersión o superficie
La muestra se pipetea sobre la superficie del agar (0,1 ml).
La muestra se extiende uniformemente sobre la superficie del agar usando un espaciador o espátula de Drigalsky.
INCUBACIÓN
Colonias de superficie
Resultado típico de placa por superficie.
Método vertido en placa
La muestra se pipetea en una placa estéril (1 ml).
Se agrega el medio estéril y se mezcla bien con el inóculo. (La temperatura no debe ser muy alta para no quemar el inóculo).
INCUBACIÓN
Colonias subsuperficiales
Colonias de superficie
Resultado típico de vertido en placa.

Bibliografía

Aquiahuatl Ramos, M. Á., & Pérez Chabela, M. L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Andino Rugama, F., & Castillo, Y. (s.f.). *Curso microbiología de los alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria*. Universidad Nacional de Ingeniería UNI – Norte.

Boronat Gil, R., & López Pérez, J. P. (2019). *Una visión cercana de la microscopía en el laboratorio de educación secundaria* (1ª ed.). Consejería de Educación y Cultura, Región de Murcia.

Camacho, A., Ortegón, M., & Palao, B. (2009). *Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos* (2ª ed.). Facultad de Química, UNAM.

Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (s.f.). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*. Asociación Argentina de Microbiología.

Comité Regional de Estandarización de Laboratorios Bioquímicos. (2021). *Recolección de muestras de análisis de agua para consumo* (Documento CRELAB, DTC-DBR-003-GA-A1).

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Cuyo. (2023). *Trabajo práctico: Microscopía óptica B101 – Biología General*. https://fcen.uncuyo.edu.ar/upload/tp1y23.pdf

Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (2008). *Microbiología de los alimentos*.

INTI – Instituto Nacional de Tecnología Industrial. (2024, octubre). *Muestreo ambiental para la detección de microorganismos en plantas de elaboración de alimentos* [Material de curso no publicado].

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2022). *Brock: Biología de los microorganismos* (14ª ed.). Pearson Educación.

Pasquarella, C., Pitzurra, O., & Savino, A. (2000). The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 241-256. doi.org

Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., & Demo, M. (2016). *Manual de microbiología general*. UniRío Editora.