

T  
576.163  
R 173



**ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL**  
**Escuela de Tecnología de Alimentos**

*Informe de las Prácticas realizadas en la Sección*

**MICROBIOLOGIA**

*del*

***Instituto Nacional de Pesca***

***Previa a la obtención del Título de:***  
**TECNOLOGO EN ALIMENTOS**

PRESENTADA POR:

**Dolly Annabell Ramírez Aspíazu**

**Profesor Guía: Dra. Nelly Camba**



**GUAYAQUIL - ECUADOR**

**1986**

Guayaquil, 6 de octubre de 1986

Ing.Qco.  
Luis Miranda Sánchez  
Coordinador  
Escuela de Tecnología de Alimentos  
Ciudad.

De mis consideraciones:

Como requisito previo para la obtención del Título de Tecnólogo en Alimentos, por intermedio de la presente adjunto el informe de actividades correspondientes a mis prácticas profesionales.

Estas prácticas profesionales las realicé en el Instituto Nacional de Pesca, Departamento de Productos Pesqueros, Sección Microbiología, en el período comprendido desde el 31 de Marzo hasta el 2 de octubre del presente año.

Adjunto a la presente, el certificado respectivo extendido - por la Institución ya mencionada; ante lo cual hago saber a usted mi disposición para la disertación de este trabajo de prácticas profesionales.



De usted, me suscribo muy atentamente

*Dolly Ramirez A*  
-----  
DOLLY A. RAMIREZ ASPIAZU



# Instituto Nacional de Pesca

Letamendi 102 y la Ría  
Cañilla (P. O. Box): 5918  
Cables: INSNAPE  
Teléfonos Conmutador:  
401657 - 401776 - 401779  
GUAYAQUIL - ECUADOR

## A QUIEN INTERESE

Quien suscribe Dr. Francisco García Rangel, Jefe de la Sección de Microbiología del Instituto Nacional de Pesca, Certifica:

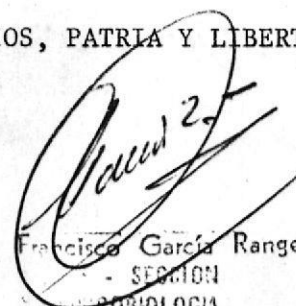
Que la señorita DOLLY RAMIREZ ASPIAZU, estudiante del Nivel 300 de la Escuela de Tecnología de Alimentos de la Escuela Superior Politécnica, realizó sus prácticas vacacionales en esta Sección desde el 31 de Marzo hasta el 2 de Octubre del presente año. Tiempo en el cual demostró capacidad, esmero dedicación a todo trabajo encomendado a ella, con el seguimiento de las guías microbiológicas practicadas en la Sección.

Extiendo esta certificación para que la interesada haga del mismo el uso que a bien tuviere.

GUayaquil, Octubre 2 de 1986

Atentamente,

DIOS, PATRIA Y LIBERTAD


  
Dr. Francisco García Rangel  
- SECCIÓN  
MICROBIOLOGÍA

FGR/sadet.-



BIBLIOTECA

## INDICE

	PAG
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
AGRADECIMIENTO	3
DEDICATORIA	4
	
<b>CAPITULO I</b>	
1.- Detalle de la tecnología desarrollada en el INP, Sección Microbiología	6
1a.- Generalidades	7
1b.- Empleo de los medios de cultivo	9
1c.- Preparación de los medios de cultivo	11
1d.- Métodos empleados para análisis micro- biológicos en alimentos	18
1.1d-Bacterias enteropatógenas en alimentos	24
- Enumeración de coliformes	25
1.2d-Bacterias que producen daños a los ali- mentos	32
- Identificación de Pseudomonas	33
- Microorganismos Aerobios Mesófilos	36
1.3d-Bacterias patógenas en alimentos	40
- Enumeración y aislamiento de Stafylococcus	41
- Determinación de Salmonella	47
 <b>CAPITULO II</b>	
2.- Aspectos Generales de la Empresa	63
2a - Generalidades	63
2b - Mercado	64
2c - Tamaño	65
2d - Aspecto Financiero	69
 <b>CAPITULO III</b>	
3.- Conclusiones	75
4.- Recomendaciones	76
5.- Bibliografía	77
6.- Anexos	78

## RESUMEN

La presentación de este informe sobre las actividades realizadas durante seis meses en el Instituto Nacional de Pesca, Sección Microbiología se expone en tres capítulos que nos dá una visión global de:

- La tecnología rutinaria usada para la realización de una serie de análisis microbiológicos en alimentos marinos como es el camarón como producto procesado y la harina de pescado. Además se incluye la preparación de los medios de cultivo.
- Un aspecto general de la empresa estatal mencionada anteriormente y un breve análisis de los costos tanto de materiales, equipos, medios de cultivo y reactivos, así como de la mano de obra directa y costos de análisis.
- Las conclusiones y recomendaciones que he llegado a establecer durante las prácticas en dicho laboratorio. Finalmente se incluye el soporte bibliográfico que utilicé para realizar este informe, los anexos donde se muestran fotografías tomadas en la Sección Microbiología y una copia del certificado que extiende la Institución a la empresa indicando la presencia o ausencia de Salmonellas y Shigellas en harina de pescado.



BIBLIOTECA

## INTRODUCCION

El principal objetivo del presente trabajo radica en describir los conocimientos adquiridos durante mis prácticas profesionales; conocimientos que se basan en el aprendizaje de rutina para realizar diversos análisis microbiológicos en camarón congelado y harina de pescado, además de aplicar estas mismas técnicas en otros alimentos. Estas prácticas fueron realizadas en la Sección Microbiología del Instituto Nacional de Pesca localizado en Guayaquil, en las calles Letamendi - Nº 102 y la Ría, siendo su Director el Dr. Roberto Jiménez.

El objetivo de la Sección de Microbiología es el de desempeñar funciones tales como:

- 1.- Analizar
- 2.- Extender certificados luego de los análisis correspondientes y
- 3.- Realizar investigaciones.

El laboratorio de Microbiología realiza los siguientes análisis a las diversas empresas empacadoras de camarón y harinas existentes en nuestro país entre los que mencionaré:

- a.- Enumeración de coliformes totales y fecales.
- b.- Determinación de *Stafylococcus aureus*.
- c.- Contaje de microorganismos aeróbios mesófilos.
- d.- Presencia de *Pseudomonas* y Hongos.
- e.- Determinación de *Salmonella tífica*.



BIBLIOTECA

### AGRADECIMIENTO

Al Dr. Francisco García, Jefe de la Sección de Microbiología y a todo el personal que labora junto a él, en prueba de agradecimiento y cordial afecto.

A la Dra. Nelly Camba por haberme guiado en la realización de este informe.



#### A MIS PADRES

Entrego a mis padres este trabajo, fruto de mi esfuerzo personal, que sin su tenaz ayuda, amor y comprensión no hubiese sido posible.

CAPITULO I

DETALLE DE LA TECNOLOGIA  
DESARROLLADA EN EL INSTITUTO  
NACIONAL DE PESCA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS  
PESQUEROS: SECCION MICROBIOLOGIA

El desarrollo de este capítulo describe el trabajo rutinario-referente a los métodos y técnicas empleados para realizar análisis microbiológicos aprendidos durante mis prácticas profesionales.

Este trabajo de rutina se me facilitó en todo momento ya que el personal que opera en él me brindó la oportunidad para realizar los análisis con amplias facilidades pudiendo así colaborar en todas sus áreas como una analista más en dicho laboratorio.

El trabajo realizado es el siguiente:

- Recibir las muestras de harina de las empresas que solicitan este servicio.
- Partir desde el primer día de rutina con el pesado de las muestras de harina de pescado en un promedio de 27 a 30, luego seguir la técnica que ellos utilizan como es el pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento de colonias para detectar salmonella.
- Realizar pruebas bioquímicas y serológica.
- Hacer siembra de stafylococcus aureus en un promedio de 35 a 40 muestras de camarón, y de los tubos positivos de coliformes.
- Contar placas en un promedio de 80.
- Preparación de medios de cultivos.
- Investigación del grado de contaminación de aguas de una represa de Bucay, aplicando las técnicas conocidas.
- Aislamiento de microorganismos de cultivos puros.
- Muestrear a las diferentes empresas empacadoras.
- Preparación de materiales para el primer día de trabajo rutinario.



## GENERALIDADES

Prácticamente todos los microorganismos, pero en particular - las bacterias y los hongos, pueden cultivarse sobre substratos nutritivos para el estudio de sus propiedades o para la utilización de algunas de ellas en condiciones controladas. - De ahí que el cultivo de microorganismos en el laboratorio involucra muchos factores, ya que los distintos microorganismos exigen requisitos al medio de cultivo.

Se necesita en el laboratorio microbiológico una serie completa de medios de cultivos especiales que deben contener las sustancias químicas precisas y la correcta concentración de hidrogeniones que los microorganismos precisan para su crecimiento y reproducción. Los requerimientos de temperatura, oxígeno y humedad deben observarse cuidadosamente.

Actualmente muchos laboratorios preparan sus medios de cultivo con productos secos o deshidratados que pueden obtenerse de firmas comerciales. Estos productos dan resultados excelentes y son muy comerciales. A pesar de ello un técnico debe conocer la preparación de los medios y el empleo de determinados reactivos.

## CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LOS MICROORGANISMOS

La proliferación de bacterias es el resultado de una interacción compleja de diferentes sustancias alimenticias y principios activos, en la cual intervienen factores físicos como la temperatura, el pH, el potencial redox, etc.

Para el crecimiento, todos los microorganismos necesitan agua, además deben estar presentes en forma utilizable el carbono, - el oxígeno, el hidrógeno, el nitrógeno, el azufre, el fósforo, - el potasio, el calcio, el magnesio y el hierro. Muchos microorganismos dependen además de oligoelementos como el manganeso, el molibdeno, el zinc, el cobre, el cloro, etc.

Los microorganismos exigentes tienen necesidad además de factores de crecimiento como los aminoácidos, vitaminas, purinas u otras sustancias que no pueden sintetizar ellos mismos.

Algunos microorganismos son capaces de crecer fácilmente en un

medio simple que no cumpla con rigor las condiciones habituales requeridas, pero otros son más exigentes y necesitan factores adicionales de crecimiento y condiciones óptimas como las anotadas anteriormente.

Los materiales utilizados en la preparación de los medios de cultivo, están generalmente, en la forma más perfecta que pueda asimilar la bacteria. Por ejemplo, la fuente de nitrógenos invariablemente la peptona, que se obtiene por digestión péptica de proteínas y consiste en una mezcla de proteasas, polipéptidos y aminoácidos. Es fácilmente soluble y se incorpora bien en los medios de cultivo. El carbono se obtiene mediante una degradación enzimática de los hidratos de carbono.

Las sales minerales son esenciales para el crecimiento de las bacterias y entre ellas se incluyen iones de fosfato y magnesio. Estos últimos también actúan como catalizadores para muchos enzimas. El potasio ha demostrado que tiene un papel en la glucólisis, el de los iones de calcio es esencial en ciertas reacciones enzimáticas.

Las bacterias más exigentes pueden necesitar factores de crecimiento adicionales, por ejemplo, el *Haemophilus influenzae* precisa dos factores, el factor V y el factor X, ambos presentes en la sangre.

En el caso de bacterias patógenas, la energía deriva de la desintegración oxidativa de proteínas e hidratos de carbono. Los productos de hidrólisis de estas sustancias tales como: aminoácidos, alcoholes, etc, logrados por los sistemas enzimáticos del organismo, se utilizan en la síntesis de un nuevo protoplasma por la célula.

## EMPLEO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

### MEDIOS SOLIDOS.



BIBLIOTECA

En medios líquidos las bacterias tienen libertad para moverse pero cuando crecen en medio sólido se multiplican en el lugar en que han sido inoculados y forman colonias.

Las características de estas colonias son típicas para cada especie.

Al medio se le puede añadir sin alterar su valor nutritivo, una sustancia solidificante, siendo el agar el más ampliamente utilizado en los medios de cultivo.

### TIPOS DE MEDIOS

Los caldos nutritivos constituyen la base de la mayor parte de los medios de cultivo. Realmente proveen el crecimiento de una amplia variedad de bacterias y están constituidas principalmente por extractos de carne, peptona y sales minerales en solución purificada y con pH aproximado de 7,4.

Se consideran los siguientes tipos:

- 1.- Caldo por maceración
- 2.- Caldo de extracto de carne
- 3.- Caldo digerido
- 4.- Medios enriquecidos
- 5.- Medios Diferenciales
- 6.- Medios Selectivos
- 7.- Medios de enriquecimiento.

#### 1.- Medios enriquecidos.

Se emplean para el cultivo de microorganismos delicados que no crecerían en un medio básico. Si la sangre, suero u otros factores de enriquecimiento se agregan al medio (caldo nutritivo o agar) se dice que el medio ha sido enriquecido.

#### 2.- Medios Diferenciales

Son aquellos que contienen sustancias o indicadores que diferenciarán un microorganismo de otro. Por ejemplo el Agar de MacConkey distingue los microorganismos por su -

capacidad de producir diferentes tipos de hemólisis, estos medios suelen llamarse medios indicadores.

### 3.- Medios Selectivos

Son medios sólidos que contienen sustancias que inhiben el crecimiento de muchos microorganismos en tanto que favorecen el desarrollo de otros, por ejemplo, el desoxicolato-citrato agar para los grupos de Salmonella-Shigella.

### 4.- Medios de Enriquecimiento

Son medios líquidos a los que se incorpora sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos para los cuales el medio era anteriormente adecuado, por ejemplo, el Selenito-Cistina inhibe el crecimiento del coliforme en tanto que los bacilos tipo paratíficos crecen libremente - proporcionando un cultivo enriquecido de estos últimos.

PREPARACION DE LOS MEDIOS

DE CULTIVO

MEDIOS SIN AGAR: FASE LIQUIDA

MEDIOS CON AGAR: FASE SOLIDA

## MANERA DE PREPARAR LOS MEDIOS DE CULTIVO

### a.- MEDIOS SIN AGAR (CALDOS)

La cantidad pesada del medio de cultivo seco se añade a una pequeña cantidad de agua destilada o desmineralizada fría y se distribuye uniformemente por agitación o mezclado. Seguidamente se añade la cantidad restante de agua y se va balanceando el recipiente de vidrio hasta la completa homogenización del granulado o del polvo. Luego el medio líquido se distribuye en tubos de ensayos, frascos universales y botellas pasando a autoclavarse por un tiempo y presión especificados.

### b.- MEDIOS CON AGAR

Todas las preparaciones con agar deben suspenderse en agua destilada y ser disueltas, llevando la suspensión a ebullición, antes de autoclavarlas. Un medio con agar puede disolverse por un autoclavado rápido o sea elevando la presión momentáneamente para alcanzar una temperatura de 115 °C, hirviéndole sobre una rejilla metálica. Se enfría a 50 - 60 °C antes de distribuirlo a los recipientes definitivos.

## ESTERILIZACION

Los medios de cultivo disueltos se esterilizan en autoclave.- La duración del calentamiento no debe ser excesivo para así evitar una disminución de la calidad.

El tiempo recomendado para la esterilización es de 15 minutos asegurándose de que la temperatura esté a 121 °C durante este tiempo prescrito.

Para la esterilización, los cierres de rosca de las botellas deben estar semi-cerrados para permitir el flujo del aire durante el tratamiento por calor. Estos cierres se apretarán firmemente sólo después de que esté completa la esterilización.

No se deben retirar las botellas del esterilizador mientras que aún esté caliente, puesto que un cambio brusco en la presión del vapor interna de los recipientes pueden dar lugar a ebulliciones explosivas. Antes de abrir el esterilizador se-

debe enfriar a 70 - 80 °C.

#### ADICIONES AL MEDIO DESPUES DE LA ESTERILIZACION

Cuando las instrucciones requieran la adición de un reactivo-estéril en el medio después del autoclavado, se debe llevar a cabo con precauciones asépticas, teniendo cuidado de observar las condiciones de temperatura prescritas.

#### AJUSTE DEL pH

Los medios de cultivo deshidratados están normalmente ajustados de tal manera que no es necesario corregir el pH.

En caso de conservación inadecuada, en particular de substratos con un contenido elevado en hidratos de carbono, puede disminuir el pH. El pH debe ajustarse en este caso con NaOH ( 2 N ) o ClH ( 2 N ).

Para ciertos medios de cultivo se recomienda la utilización de carbonato sódico, ácido cítrico, ácido tartárico o de ácido láctico en solución al 10%.

El pH debe medirse antes de la esterilización. Esta medida, realizada después de la esterilización, exige procedimientos asépticos operatorios suplementarios.

#### PREPARACION DE LAS PLACAS DE AGAR

Después de la esterilización, el medio agarificado, todavía líquido o de nuevo licuado, se vierte a una temperatura de 50 o 60 °C en las cajas de Petri estériles.

La capa de las placas debe de tener un espesor entre 3 y 4 mm, es decir, que 15 o 18 ml del substrato son suficientes para cajas de Petri de 9 cm de diámetro.

La capa de las placas debe ser uniforme, se utilizan cajas de Petri de material plástico esterilizadas previamente y tienen la ventaja adicional de que poseyendo una base plana no necesitan adición de una base de agar. Se desechan después de emplearlas. (ver fig N° 1).



## PREPARACION DEL AGAR INCLINADO CULTIVOS INCLINADOS

Muchas pruebas utilizadas para la diferenciación de microorganismos requieren cultivos sólidos. No siempre es necesario - que crezca un organismo en una placa de Petri puesto que los cultivos inclinados son a menudo suficiente.

Para la preparación del agar inclinado, el medio agarificado-líquido se pipetea en los tubos de ensayos definitivos, se autoclavan y se enfrían ligeramente inclinados por su extremo - cerrado. (ver fig. N° 2).

Para hacer los cultivos profundos se preparan los medios igual que el anterior con la diferencia de que no se inclina.

### MODO DE INOCULAR UNA PLACA DE AGAR

Para aislar colonias, el medio en la caja de Petri debe inocu- larse así:

Utilizando una asa de platino estéril se lleva una pequeña por- ción sobre el área A y se trazan estrías. El asa se esterili- za en la llama de Bunsen y cuando está fría se trazan estrías sobre el área B, se repite la operación sobre las áreas C, D y E, se incuban las placas a 37°C. (ver fig. N° 3)

### CONSERVACION Y ALMACENAMIENTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO LISTOS PARA EL USO

La sección de Microbiología del Instituto Nacional de Pesca u- tiliza para el almacenamiento de sus medios de cultivo, fras- cos con tapón de rosca a diferencia de otros laboratorios que suelen emplear rutinariamente frascos o tubos tapados con al- godón. Para los tubos que no tienen reborde se prefiere los- tapones de plástico o de aluminio.

La estabilidad de los medios de cultivo listos para el uso es limitada. Si no se pueden utilizar inmediatamente, lo mejor - es conservarlos a 4- 10°C, a oscuras, por ejemplo, en un refri- gerador). Ciertos medios de cultivo, por ejemplo los que contie- nen tioglicolato, se conservan mejor a temperatura ambiente.





BIBLIOTECA

## SIMBOLOGIA

TET	CALDO DE TETRACIONATO.-
SEL	CALDO DE SELENITO-CISTINA.-
LSB	CALDO LAURYL-SULFATO
BGBB	CALDO BILI VERDE BRILLANTE AL 2%
PW	AGUA DE PEPTONA
BP	BAIRD PARKER
PCA	AGAR PARA CONTAJE DE PLACA
TSI	AGAR HIERRO TRIPLE AZUCAR
LIA	AGAR HIERRO LISINA
SIM	AGAR PARA SH <sub>2</sub> , INDOL Y MOTILIDAD
MB	CALDO MALONATO
C	CITRATO
UA	AGAR UREA
XLD	AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO
BHI	CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON
BHIA	AGAR INFUSION CEREBRO CORAZON
BPW	AGUA DE PEPTONA BUFERADA

Los medios de cultivo deben sacarse del refrigerador antes de su empleo para que alcancen la temperatura ambiente.

Fig №2

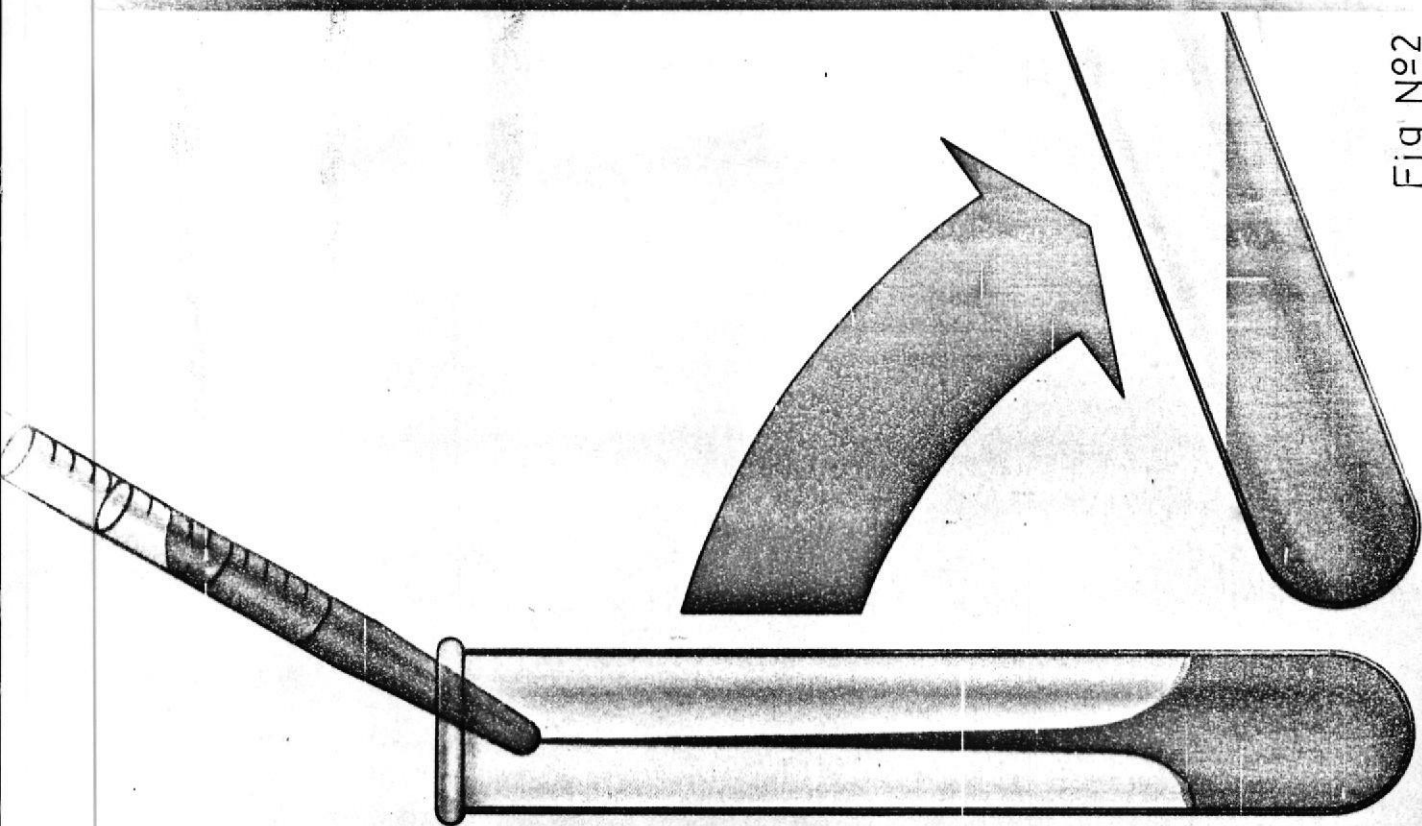
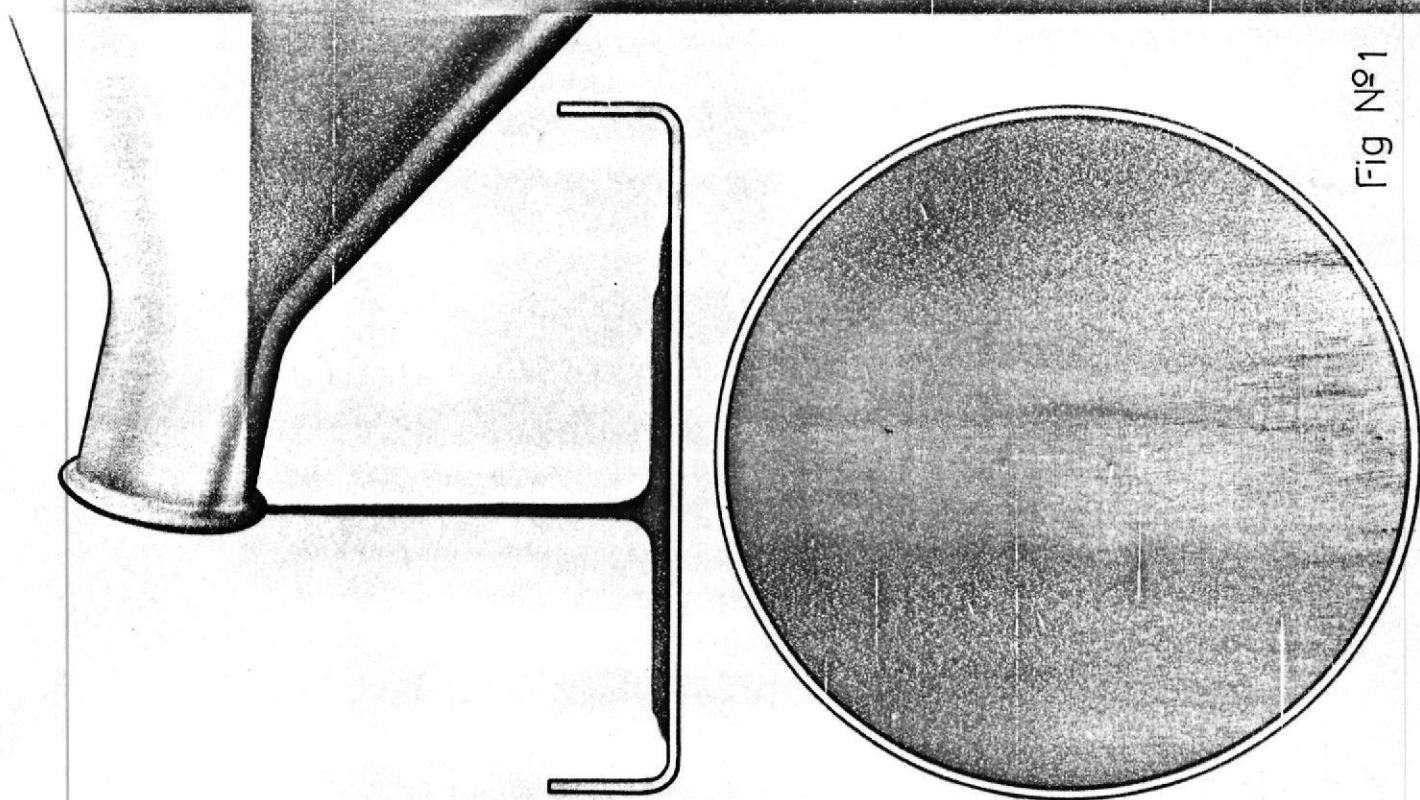


Fig №1



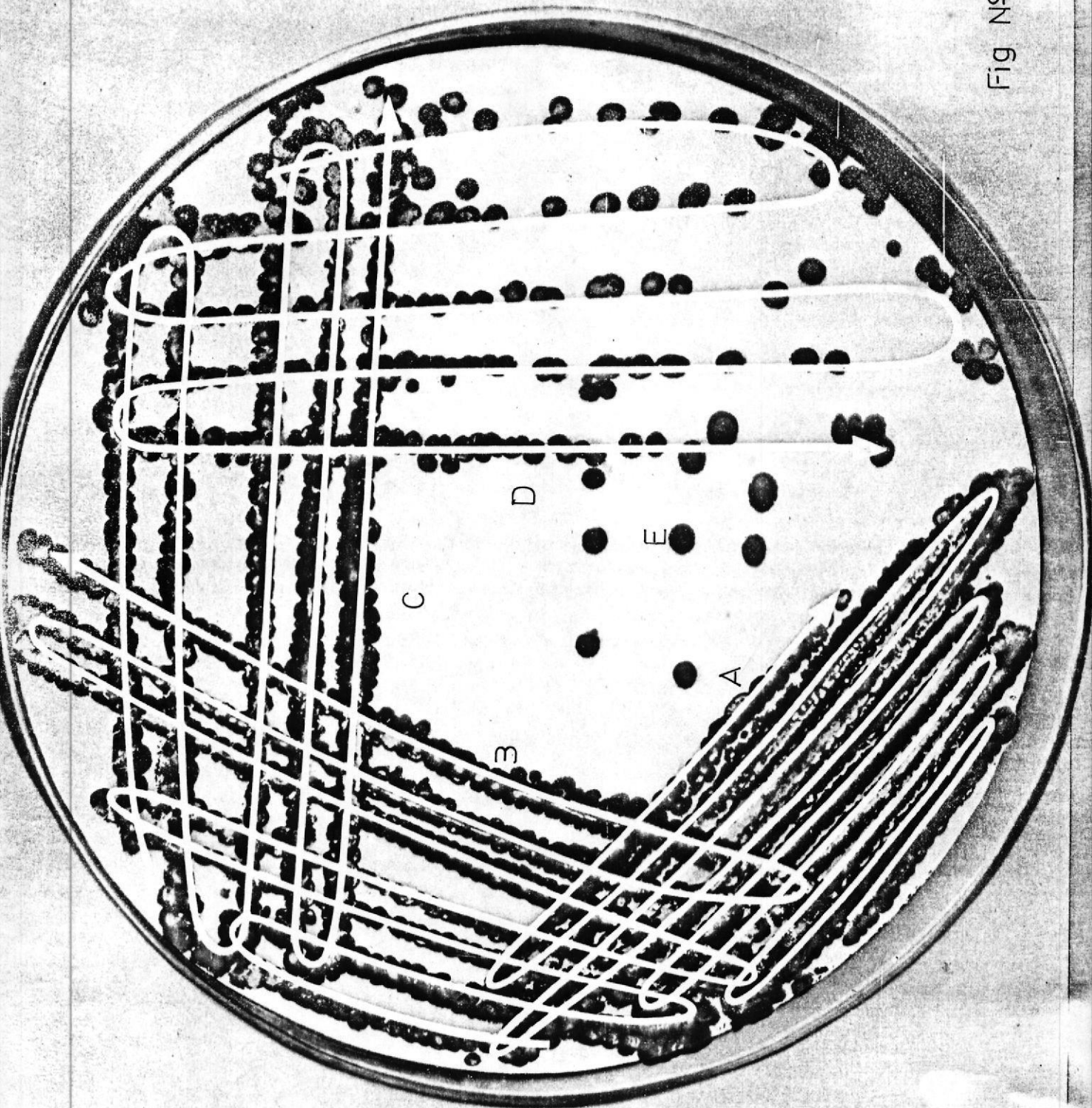


Fig No 3



METODOS EMPLEADOS EN LA SECCION MICRO  
BIOLOGIA DEL INSTITUTO NACIONAL DE -  
PESCA PARA REALIZAR LOS EXAMENES MI -  
CROBIOLOGICOS EN CAMARONES CONGELADOS  
( PRODUCTO TERMINADO EN CAMARA ) Y -  
HARINA DE PESCADO

Los tipos de bacterias que se analizan microbiológicamente - en las muestras que llegan a la Sección de Microbiología y - que ésta se ha encargado de clasificarlos de acuerdo al grado de daño o patogenicidad que tienen son las siguientes y - que en capítulos posteriores detallaré:

I.- BACTERIAS ENTEROPATOGENAS EN LOS ALIMENTOS

- Coliformes totales
- Coliformes fecales

II.- BACTERIAS QUE PRODUCEN DAÑOS A LOS ALIMENTOS

- Pseudomonas
- Microorganismos Mesófilos Aerobios

III.- BACTERIAS PATOGENAS EN LOS ALIMENTOS

- Stafylococcus Aureus
- Salmonella

## MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE CAMARONES CONGELADOS, HARINA DE PESCADO Y CUALQUIER OTRO ALIMENTO.

### 1.- TÉCNICAS GENERALES

#### 1.1. SERIES DE DILUCIONES

Se pesan 30 gr de muestra a analizar, agregar 270 ml de diluyente estéril (peptona 0,1%) y mezclar el contenido en un Atomix Blender o un Stomacher por dos minutos, obteniéndose la dilución de  $10^1$ .

Utilizando una pipeta estéril se transfieren 2 ml de la dilución de  $10^1$  a una botella o tubo conteniendo 18 ml del diluyente estéril, resultando una dilución de  $10^2$ . De esta dilución obtenida  $10^2$ , transferimos igualmente 2 ml a un tubo conteniendo 18 ml del diluyente estéril, agitamos 25 veces fuertemente y obtenemos la dilución  $10^3$ . - Las demás diluciones se obtienen en forma análoga de tal forma que se obtiene relaciones de dilución de la muestra de partida desde  $10^1$  hasta  $10^6$ .

#### 1.1.1 MATERIALES Y APARATOS NECESARIOS

- a.- Stomacher (homogenizador)
- b.- Fundas plásticas estériles
- c.- Pipetas graduadas esterilizadas
- d.- Tubos de ensayo con rosca (150 x 18)
- e.- Reloj
- f.- Rejillas para tubos
- g.- Diluyente estéril
- h.- Muestra pesada (30 gr de camarón) o muestra a utilizar.

#### 1.1.2 PREPARACION DEL DILUYENTE ESTERIL

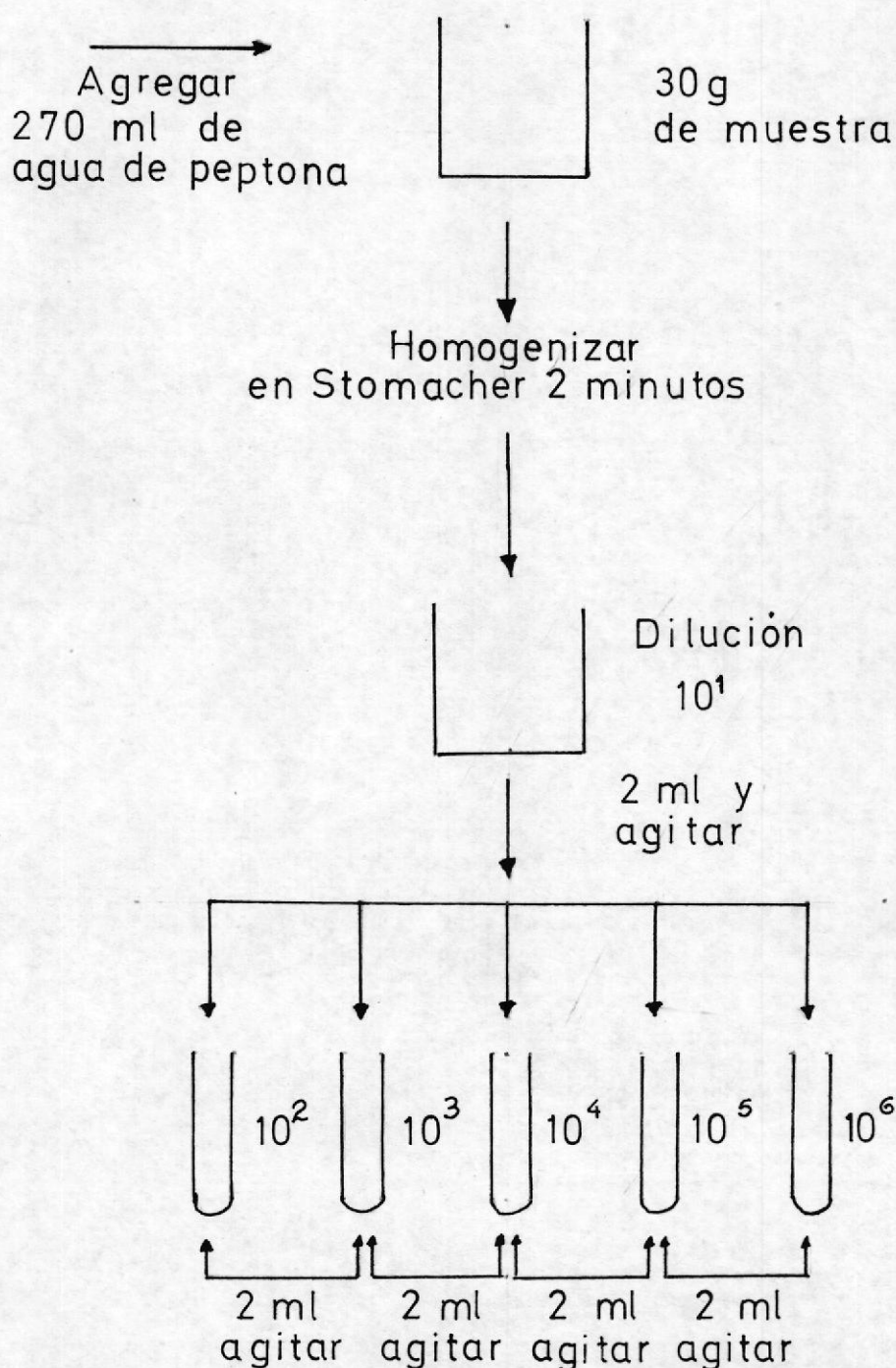
##### AGUA DE PEPTONA

Fórmula	en g por litro
Peptona	10,0
ClNa	5,0

## INSTRUCCIONES

Se añade 1 gramo a un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se distribuye en los recipientes definitivos. Se esteriliza en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.

SERIES DE DILUCIONES  
(diagrama)



## 1.2. CONTAJE TOTAL

## 1.2.1 METODO DE DILUCION EN PLACA (POUR PLATE)

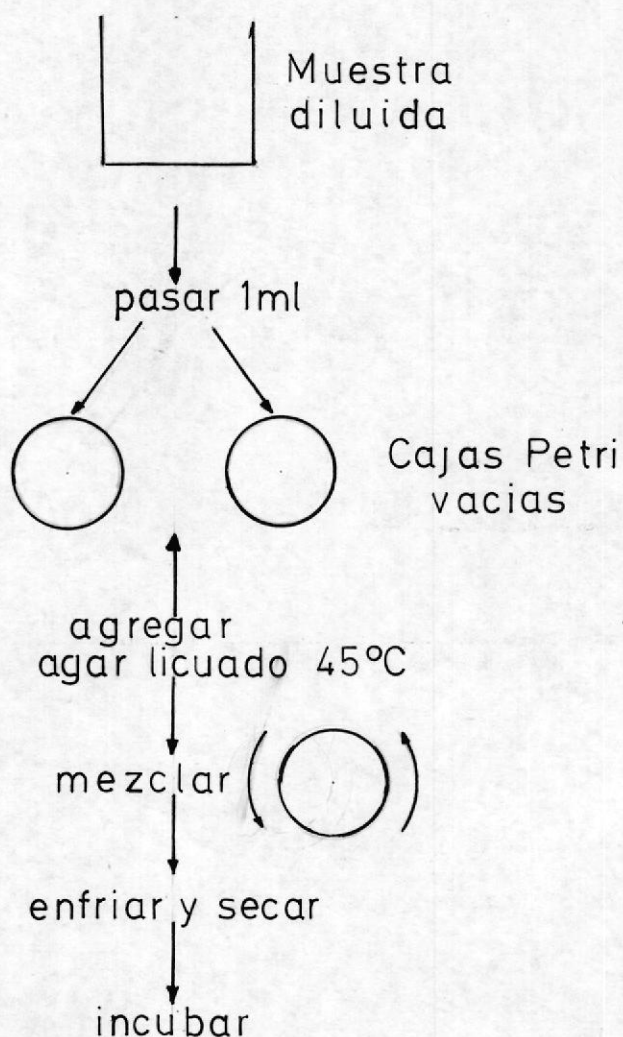
Transferir una alícuota de 1 ml de la muestra diluída a cajas de Petri por duplicado. Agregar 15-18 ml de agar, el cual ha sido licuado a una temperatura de 45°C. Mezclar la muestra con el agar, dejar enfriar hasta completa coagulación del agar.

Antes de transferir las cajas de Petri a la incubadora asegurarse de que estén bien secos. Incubar a 25°C por 72 horas en posición invertida.

## 1.2.2 MATERIALES Y APARATOS NECESARIOS

- a.- Pipetas graduadas estériles
- b.- Cajas de Petri desechables
- c.- Tubos de ensayos que contengan diluciones
- d.- Incubadora a 25°C
- e.- Agar licuado a 45°C.

## DIAGRAMA



### 1.3 METODO DE SIEMBRA POR EXTENSION EN SUPERFICIE

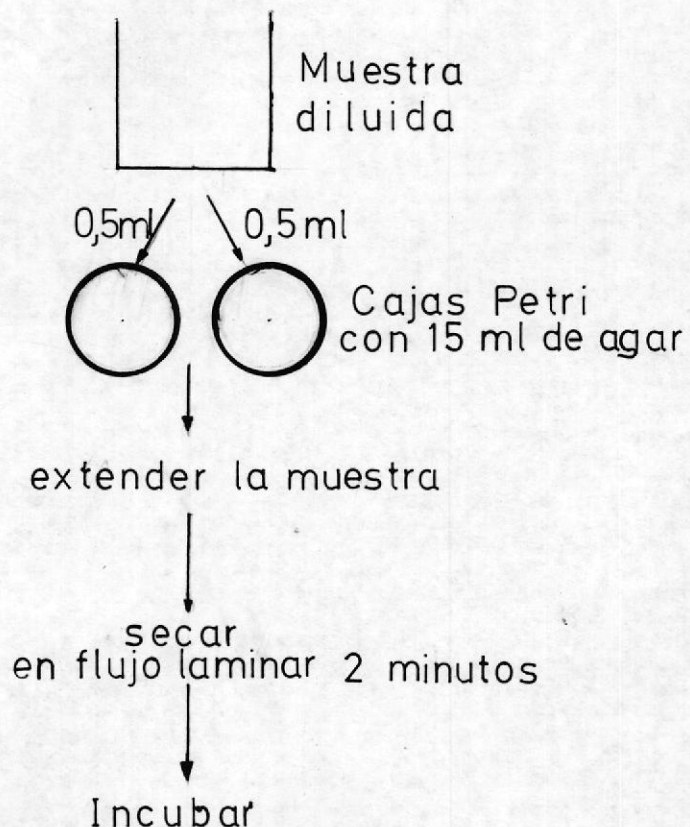
Utilizar cajas de Petri que contengan 15 ml de agar. Pipetear 0,5 ml de muestra diluida en la superficie del - agar y extender el inóculo utilizando un bastón de cristal estéril (hockey stick).

Cajas de Petri por duplicado deben ser preparados para cada dilución, luego dejar al ambiente por espacio de al gunos minutos en el aire laminar. Incubar a 37°C por - 48 horas en posición invertida.

#### 1.3.1 MATERIALES Y APARATOS NECESARIOS

- a.- Cajas de Petri desechables con 15 ml de agar
- b.- Pipetas esterilizadas
- c.- Bastón de cristal estéril
- d.- Mechero Bunsen
- e.- Vasos pequeños de aluminio
- f.- Encendedor
- g.- Alcohol
- h.- Agua destilada
- i.- Diluciones de la muestra a analizar
- j.- Incubadora a 37°C
- k.- Flujo laminar (para secar cajas de Petri)

#### DIAGRAMA





I.- BACTERIAS ENTEROPATOGENAS  
EN ALIMENTOS

## ENUMERACION DE COLIFORMES

### CARACTERISTICA DE LA BACTERIA

Dentro de las enterobacterias se incluye los coliformes, las cuales constituyen parte de la flora normal y patógena.

El tipo más común de los coliformes fecales es la *Escherichia coli*, produciendo infecciones del tracto intestinal y urinario. Produce gastroenteritis en los niños. Fermenta la lactosa y otros azúcares, casi siempre dá reacción positivo, produce gas en el Medio de MacConkey a 44 °C.

La *Escherichia coli* es un gérmen cuyo habitat natural es el tracto entérico del hombre y de los animales. Por ello la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal.

La *Escherichia coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en agua, en los moluscos, en los productos lácteos y en otros alimentos.

La enumeración de *E. coli* en el agua constituye una medida de la cuantía de la polución, mientras que los niveles detectados en los alimentos pueden estar influenciados por otros factores, tales como la multiplicación de microorganismo, su muerte o inactivación o su adherencia a la partícula del alimento.

Con todo, cifras sustanciales de *E. coli* en un alimento sugiere una falta general de limpieza en el manejo del mismo y un almacenamiento inadecuado. La presencia de *E. coli* en un alimento no constituye una contaminación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica sólo un cierto riesgo de que pudieran estar presentes.

#### a.- FUNDAMENTO

Los coliformes fecales comprenden un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44,5 °C).

## b.- MATERIALES

- 1.- Tubos de ensayo (150 x 16) con tapa de aluminio
- 2.- Tubos de Durhan
- 3.- Asa de platino (redonda)
- 4.- Mechero Bunsen
- 5.- Pipetas graduadas estériles
- 6.- Rejillas
- 7.- Marcadores

## c.- EQUIPOS

- 1.- Baño de María a 44.5 °C
- 2.- Incubadora a 37°C

## d.- MUESTRAS

- 1.- Diluciones de la muestra de  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$

## e.- MEDIOS DE CULTIVO

- 1.- Caldo Lauryl Sulfato (LSB)
- 2.- Caldo Bili Verde Brillante al 2% (BGGB)
- 3.- Agua de Triptona

## f.- REACTIVOS

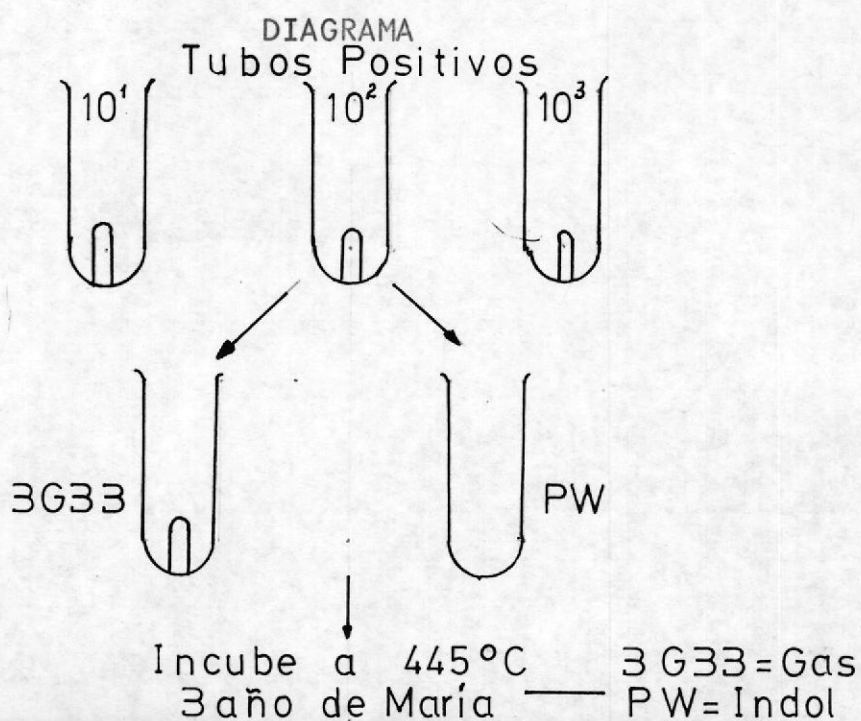
- 1.- Reactivo de Kovacs

## g.- MEDIO DE DILUCION

- 1.- Agua de peptona al 0.1%

## h.- TECNICA EMPLEADA

- 1.- Series de diluciones
- 2.- Técnica del Número más probable (NMP)



## i.- METODO

## ENUMERACION DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES

- 1.- Se prepara la muestra siguiendo la técnica de series de diluciones descrita en la sección de técnicas generales es decir se obtienen diluciones de  $10^1$  a  $10^3$  de la muestra de camarón homogenizada.
- 2.- Pipetear 1 ml de la dilución decimal en cada uno de 3 tubos de Caldo Lauryl Sulfato ( $10^1, 10^2, 10^3$ ) que contienen tubos de Durhan invertidos.
- 3.- Incubar los tubos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
- 4.- Después de 48 horas registrar los tubos que muestran producción de gas y turbidez.
- 5.- Anotar el número de tubos confirmados como positivos de organismos coliformes totales en cada dilución.
- 6.- Para confirmar que los tubos de caldo Lauryl Sulfato son positivos para organismos totales y fecales se los separa y se procede de la siguiente manera:
  - 6a- Inocular con una asa de platino redonda los tubos positivos de LSB, en tubos de caldo Verde Brillante al 2% que contengan tubos de fermentación Durhan invertidos con volúmenes de 10 ml y en tubos que contengan Agua de Triptona.
  - 6b- Incubar los tubos de caldo Verde Brillante al 2% y tubos de Agua de Triptona en el baño de agua circulante o baño de María a  $44.5^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.
  - 6c.- Transcurridas las 24 horas anotar los tubos que produjeron gas en el tubo Durhan del Caldo Verde Brillante al 2%
  - 6d- Luego se hace la prueba de indol en el Agua de Triptona, usando el reactivo de Kovacs. Para hacer esta prueba se agrega aproximadamente 0,3 ml del reactivo indicado a los tubos de Agua de Triptona.

- 6e.- Esperar algunos segundos y observar la aparición de un color púrpura o cereza en la superficie del reactivo lo que constituye una reacción positiva.
- 7.- Cultivos que produjeron gas en presencia de Bili Verde-Brillante al 2% y además Indol a 44,5°C son considerados presuntivos positivos de organismos coliformes fecales.
- 8.- Determinar el NMP de coliformes fecales por gramo de muestra usando la tabla de 3 tubos por cada dilución.

## TABLA

NUMERO MAS PROBABLE (NMP) DE BACTERIAS; TRES TUBOS POR CADA DILUCION

NUMERO DE TUBOS POSITIVOS EN CADA DILUCION

Dilución $10^1$	Dilución $10^2$	Dilución $10^3$	NMP por gramo
0	1	0	3
1	0	0	4
1	0	1	7
1	1	0	7
1	2	0	11
2	0	0	9
2	0	1	14
2	1	0	15
2	1	1	20
2	2	0	21
3	0	0	23
3	0	1	40
3	1	0	40
3	1	1	70
3	2	0	90
3	2	1	150
3	2	2	210
3	3	0	200
3	3	1	500
3	3	2	1100



BIBLIOTECA

TABLA DE LIMITES DE TOLERANCIA

MICROORGANISMO	N	C	LIMITES x G	
			m	M
Coliforme fecal	5	3	4	400

De donde:

N= Representa el número de muestras tomadas de cada master y de cada caja de 5 libras, es decir tomamos 5 porciones de cada 5 cajas de 5 master.

C= Máximo de muestras buenas que se debe de aceptar para dar como bueno el lote.

m= Cantidad mínima de coliforme fecal por g de muestra

M= Cantidad máxima de coliforme fecal por g de muestra

#### EJEMPLO PRACTICO

MUESTRA DE CAMARON Nº	COLIFORMES: TOTALES/ FECALES			
	10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	NMP
1	2/2	2/2	0/0	21
2	3/3	3/3	0/0	200
3	3/2	3/0	2/0	9
4	2/0	0/0	1/0	< 3
5	3/2	0/0	0/0	9

Para anotar los resultados en el casillero correspondiente anotamos los tubos positivos (tubos con gas). Luego vemos en la tabla del NMP según el resultado de cada dilución y obtenemos el número de coliformes fecales por g de muestra.

El límite de tolerancia por g de muestra es un mínimo de 4 y un máximo de 400 y toleramos tan sólo 3 muestras de las 5 tomadas.

## PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

## 1.- CALDO LAURYL SULFATO (LSB)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Triptona	20,0
Lactosa	5,0
ClNa	5,0
Fosfato dipotásico	2,75
Fosfato dipotásico	2,75
Sulfato sódico de Lauryl	0,1

## Instrucciones

Se disuelven 35,6 g en un litro de agua destilada. Se distribuyen 10 ml en los recipientes definitivos y se introducen tubos de Durhan invertidos, se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

## 2.- CALDO DE BILI VERDE BRILLANTE AL 2% (BGBB)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Péptona	10,0
Lactosa	10,0
Bilis de Buey(purificada)	20,0
Verde Brillante	0,0133

## Instrucciones

Se suspenden 40 g en un litro de agua destilada. Se mezcla bien, se distribuye en los recipientes equipados con los tubos de Durhan y se esteriliza en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.

## 3.- AGUA DE TRIPTONA (TW)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Triptona	10,0
Cloruro de sodio	5,0

## Instrucciones

Se añaden 15 gramos en un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se distribuye en los recipientes definitivos y se esteriliza en el autoclave a 121 °C por 15 minutos.

## REACTIVO DE KOVACS

Fórmula

Para-dimetil-amino-benzaldehído	5,0 g
Alcohol iso-amílico	75,0 ml
Acido clorhídrico concentrado	25,0 ml

## Instrucciones

Disolver el aldehído en el alcohol por calentamiento suave en un baño de agua a 50 °C. Enfriar y agregar el ácido. Conservar en frascos oscuros a 4 °C.

II .- BACTERIAS QUE PRODUCEN DAÑOS A  
LOS ALIMENTOS

## IDENTIFICACION DE PSEUDOMONAS

### CARACTERISTICA DE LA BACTERIA

Las Pseudomonas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza: suelo, animales, plantas y agua. Sólo unas pocas especies son peligrosas para los animales y el hombre, mientras que otras muchas son patógenas para las plantas.

Unicamente dos especies, *Ps aeruginosa* y *Ps. cocovenans* han sido señaladas como causa de intoxicación alimentaria. La enfermedad en los adultos causa una enteritis leve; por el contrario, en niños puede ser grave e incluso mortal, a causa de la diarrea profusa que se produce.

Antiguamente sólo se consideraba patógena para el hombre y los animales a la *Ps. Aeruginosa*. Sin embargo, especies consideradas como no patógenas pueden causar infecciones humanas importantes.

La *Ps. Aeruginosa* ha creado un serio problema en los hospitales, especialmente en pacientes con pocas defensas frente a las enfermedades infecciosas. Diversos estudios epidemiológicos realizados en hospitales han revelado que los vegetales, las carnes y los alimentos congelados están a veces contaminados con *Ps. Aeruginosa*.

Las necesidades nutritivas de las pseudomonas son bastantes simples. Para su cultivo selectivo se han recomendado varios medios de uso común adicionados con diversos suplementos.

## IDENTIFICACION

### MATERIALES Y EQUIPOS

Se utilizan los mismos materiales y equipos que para la determinación de coliformes totales, tomando en cuenta las mismas diluciones .

### MEDIOS DE CULTIVO

- a.- Cetricimide
- b.- Lauryl Sulfato caldo

## METODO

- a.- Preparar muestras de alimentos como se describe en la sección 1.1. de técnicas generales.
- b.- Se seleccionan las diluciones  $10^1$ ,  $10^2$  y  $10^3$ , transferimos 1 ml de la dilución  $10^1$  a tres tubos conteniendo Caldo de Lauryl Sulfato, agitamos. Repetimos la operación con las siguientes diluciones e incubamos a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 horas.
- c.- Después de 48 horas, seleccionamos los tubos que presentan en la parte superior del menisco del líquido un color amarillo verdoso.
- d.- Preparar cajas de Petri conteniendo agar de Cetrimide.
- e.- Con una varilla de vidrio cultivamos la placa conteniendo el agar.
- f.- Incubamos a  $43^{\circ}\text{C}$  por 24 horas y confirmamos la presencia de Pseudomonas por la coloración verdosa en la placa inoculada.
- g.- Luego anotamos la presencia o no de Pseudomona, sabiendo que la prueba sólo es cualitativa.

## PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

## CETRIMIDE AGAR BASE

<u>Fórmula</u>	<u>gr</u>
Bacto-peptona	20,0
Cloruro de Mg	1,4
Sulfato de potasio	10,0
Cetrimide	0,3
Cetyltrimetil Amonio Bromide	
Bacto Agar	13,6

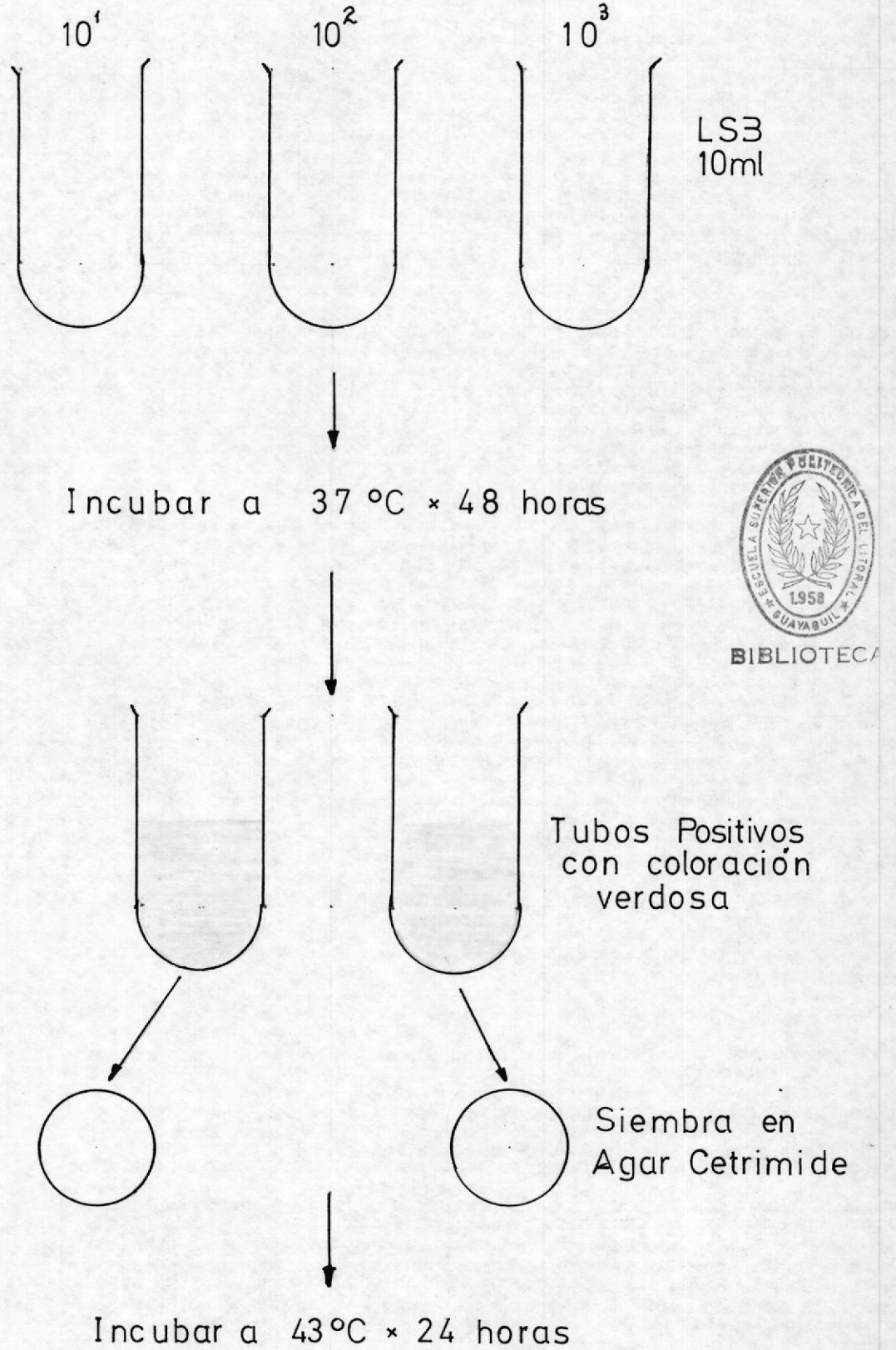
## Instrucciones

Rehidratar el medio suspendiendo 45,3 g en 990 ml de agua purificada y adicionar 10 ml de glicerina. Calentar a ebullición hasta disolver el medio completamente. Ponga en tubos o frascos y esterilice en el autoclave por 15 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$ .

Este medio es recomendado para el aislamiento y cultivo de Pseudomona Aeruginosa.



## DIAGRAMA



## MICROORGANISMOS AEROBIOS MESOFILOS

## CONTAJE DE MICROORGANISMOS VIABLES A 25 °C

El número de microorganismos aérobios mesófilos ("Recuento en placa"), encontrados en un alimento ha sido uno de los indicadores microbiológicos de calidad de los alimentos más comúnmente utilizado. El recuento de la flora aerobia mesófila tiene un valor limitado a la hora de juzgar la seguridad de los alimentos. Resulta útil no obstante, en muchos alimentos por diversos motivos ya que por ejemplo, indica si la limpieza, la desinfección y el control de la temperatura durante los procesos de tratamiento industrial, transporte y almacenamiento se han realizado de forma adecuada.

El recuento en placa tiene especial aplicación en los alimentos importados porque en este caso el país importador no tiene la posibilidad de poder controlar el grado de limpieza y desinfección practicado en las industrias productoras.

En los métodos de recuento en placa utilizados para la enumeración de grupos de microorganismos que se multiplican dentro de rangos de temperaturas diferentes debe especificarse la temperatura de incubación. Así tenemos que los mesófilos tienen un rango de 30-35 °C. La temperatura elegida dependerá del fin que se pretende con la realización del recuento. Un recuento a 25-30 °C proporcionaría la información más adecuada sobre la limpieza y desinfección observadas en las industrias de alimentos.

## 1.- METODO UTILIZADO

Es el método de recuento en placas de microorganismos aérobios.

## 2.- MATERIALES Y EQUIPOS

- a.- Estufa a 25°C
- b.- Placas de Petri desechables
- c.- Pipetas graduadas esterilizadas
- d.- Rejillas
- e.- Marcadores para rotular las cajas

### 3.- MUESTRAS

- a.- Diluciones de  $10^4$  y  $10^5$

### 4.- MEDIO DE CULTIVO

- a.- AGAR PARA RECUENTO DE PLACA (PCA)

### 5.- TECNICA UTILIZADA (RUTINA)

- a.- Tomar una alícuota de 1 ml de las diluciones  $10^4$  y  $10^5$  y transferirlas a cajas de Petri vacías. Para cada dilución se hace por duplicado la técnica.
- b.- Agregar aproximadamente de 15-18 ml de agar PCA, el que ha sido previamente licuado a una temperatura de 45 °C en Baño de María.
- c.- Mezclar el contenido de las cajas, rotándolas en forma contraria a las manecillas del reloj (4 veces) y luego en forma inversa. (Técnica del vaciado).
- d.- Enfriar y permitir que se solidifique en una superficie plana.
- e.- Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 25 °C por 72 horas.
- f.- Al cabo de este tiempo se realiza el contaje de las colonias de bacterias viables utilizando el contador de colonias.

### 6.- MANERA DE REPORTAR

Una vez que las placas han cumplido las 72 horas se cuentan las colonias de placas de  $10^4$  y  $10^5$  que se han hecho por duplicado, anotamos en los casilleros correspondiente del informe de resultados. Para considerarlas contables a las placas no debe sobrepasar las 300 colonias, si sucede lo contrario se la reporta como incontable.

A la vez que se cuenta las colonias, observamos la presencia de hongos que aparecen en forma esponjosa, anotamos en el casillero correspondiente, la presencia o no de ello.

Luego se calcula el número de microorganismos presente en la muestra, sacando la media de las 4 cajas, el cual se

hace de la siguiente manera:

### EJEMPLO PRACTICO

MUESTRA DE CAMARON Nº	CONTAJE		A 25 °C
	$10^4$	$10^5$	unidades/g
3	274/269	27/26	$270,9 \times 10^5$

De donde:

$$\text{Unid/g} = \frac{274 + 269 + 27 + 26}{2,2}$$

$$\text{Unid/g} = 270,9 \times 10^5 \quad \text{ó} \quad 2,7 \times 10^7$$

2,2 = Representa la media de las 4 cajas



### LIMITE DE TOLERANCIA

El límite de tolerancia por gramo de muestra como un mínimo - es de  $10^6$  y el máximo de  $10^7$ . Para aceptar como bueno el lote, sólo toleramos 3 muestras que estén dentro de éste rango del total de 5 analizadas.

### CALIFICACION

Nº DE MUESTRAS DE CAMARON	TOLERANCIA	LOTE
5	0	
5	1	
5	2	Bueno=ACEPTADO
5	3	
5	4	
5	5	Malo =RECHAZADO

## PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO

## AGAR PARA RECUENTO EN PLACA (PCA)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Extracto de levadura en polvo	2,5
Digerido pancreático de caseína	5,0
Glucosa	1,0
Agar	15,0

## Instrucciones

Se suspenden 23,5 g en un litro de agua destilada y se hierva hasta disolver el medio por completo. Se distribuye en frascos y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

III.- BACTERIAS PATOGENAS EN ALIMENTOS

## ENUMERACION Y AISLAMIENTO DE STAFYLOCOCCUS AUREUS

### CARACTERISTICA DE LA BACTERIA

Los stafilococos son cocos gram positivos, habitualmente agrupados en racimo. La especie más importante es el *Stafylococcus Aureus*, es el de mayor poder patógeno del grupo de los *stafylococcus*. Produce una sustancia (casi con seguridad una enzima) llamada coagulasa que en vitro es capaz de formar coágulo en el plasma. El *stafylococcus aureus* forma exo y enterotoxinas. Sabiendo que al producir enterotoxinas será el responsable de intoxicaciones alimenticias. Cuando el *stafylococcus aureus* crece en alimentos ricos en hidratos de carbono, la enterotoxina se produce en grandes cantidades y al ser consumidos ocasiona vómitos, diarreas, náuseas, malestar y debilidad general. Los síntomas comienzan a partir de las 6 horas después de consumido el alimento. La enfermedad no es mortal, el cuadro clínico se complica al presentarse a veces deshidratación y shock. Las toxinas son liberadas por el mismo alimento por ciertas cepas de *Stafylococcus aureus*.

Debido a la elevada incidencia de la intoxicación estafilocócica y a la ubicuidad del microorganismo responsable, todo laboratorio oficial debe tener actualizadas las técnicas del recuento de *stafylococcus coagulasa* positivos.

### SIGNIFICADO DE LA PRESENCIA DEL STAFYLOCOCCUS AUREUS EN UN ALIMENTO

La presencia de *Stafylococcus Aureus* en un alimento se interpreta, por lo general, como indicativo de contaminación a partir de la piel, boca y las fosas nasales de los manipuladores de alimentos, si bien el material y equipos sucios y materias primas de origen animal pueden ser así mismo la fuente de la contaminación. Cuando se encuentra un gran número de *stafylococcus* en un alimento, ello significa por lo general que las prácticas de limpieza, desinfección y el control de la temperatura no han sido, en algún lugar adecuados, cabe indicar que los *stafylococcus* pueden multiplicarse exponencialmente a temperaturas entre 6,7 y 45,5 °C.

Las bacterias del género *Stafylococcus* pueden ser indicadoras de un manejo humano excesivo, un peligro de intoxicación alimento

taria o un contaminante de escaso significado.

## RECUESTO DE STAFYLOCOCCUS AUREUS COAGULASA POSITIVOS

- 1.- TECNICA DE RUTINA
  - a.- Conteo directo en placas
- 2.- EQUIPOS
  - a.- Incubadora a 37 °C
  - b.- Cámara de aire laminar para secar las cajas de Petri
- 3.- MATERIALES
  - a.- Cajas Petri desechables estériles
  - b.- Pipetas graduadas de 1 ml
  - c.- Varilla de vidrio en forma de bastón de hockey
  - d.- 2 vasos pequeños de aluminio
  - e.- Mechero de Bunsen
  - f.- Encendedor y gasa
- 4.- MUESTRAS
  - a.- Diluciones de  $10^2$  y  $10^3$
- 5.- MEDIO DE CULTIVO
  - a.- Agar de Baird-Parker
- 6.- SOLUCION
  - a.- Emulsión de Yema de Huevo-Telurito
- 7.- TECNICA
  - a.- Preparar la muestra de camarón utilizando la técnica de series de diluciones descrita en la sección 1.1. de técnicas generales.
  - b.- Seleccionar las diluciones de  $10^2$  y  $10^3$
  - c.- Preparar cajas Petri de agar de Baird-Parker, agregando aproximadamente 15 ml de dicho agar, dejar solidificar en una superficie plana dentro del flujo laminar.
  - d.- Pipetear 0,5 ml de la dilución de  $10^2$  y colocar en la superficie de la placa conteniendo el agar ,ex-



tender el inóculo sobre la superficie del agar por medio de una varilla de vidrio de hockey que previamente ha sido sumergido en alcohol y flameada en la llama del mechero de Bunsen. Para cada dilución se debe preparar placas por duplicado. Se repite la operación de igual manera para la dilución  $10^3$ .

- e.- Observar que todo el inóculo esté distribuido uniformemente en la placa.
- f.- Secar en flujo laminar
- g.- Incubar las placas en posición invertida a 35-37 °C por 48 horas.
- h.- Transcurridas las 48 horas se cuentan las colonias que sean negras-brillantes con márgenes angostos blancos - transparentes o zonas claras bordeando el crecimiento.
- i.- Escoger un mínimo de 5 colonias de cada caja y realizar la prueba de la coagulasa, estas colonias escogidas deben ser marcadas.
- j.- Anotar el resultado sumando las colonias sospechosas de una dilución más las presentes en la otra placa, ya que se hizo por duplicado.
- k.- Se calcula el número de stafylococcus por gramo de muestra, después de la prueba de la coagulasa

#### 7.1.- PRUEBA DE COAGULASA (PARA COLONIAS SOSPECHOSAS DE COAGULASA POSITIVO)

##### a.- MATERIALES Y EQUIPOS

- 1a.- Pipetas bacteriológicas graduadas de 1 ml de capacidad.
- 2a.- Aguja de inoculación (redonda)
- 3a.- Frascos universales
- 4a.- Mechero de Bunsen
- 5a.- Incubadora de 35-37°C
- 6a.- Tubo de ensayo de 10 x 75 mm
- 7a.- Gradilla

## b.- MEDIOS DE CULTIVO

1b.- Caldo de Infusión Cerebro Corazón repartido en volúmenes de 10 ml por frasco

## c.- REACTIVO

1c.- Plasma de conejo rehidratado

## d.- TECNICA

## METODO DE TUBO



BIBLIOTECA

1d.- Pasar las colonias elegidas a frascos que contengan caldo infusión cerebro-corazón (BHI Caldo) con una asa de inoculación previamente esterilizada.

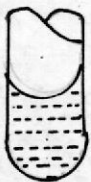
2d.- Incubar por 24 horas a 35-37 °C.

3d.- Transcurrido este tiempo, pipetear 0,1 ml del caldo incubado y transferir a tubos de 10 x 75 mm que contienen 0,3 ml de plasma de conejo.

4d.- Incubar a 35-37 °C por 4-6 horas.

5d.- Examinar los tubos a las 4 horas con el fin de detectar el coágulo. La aparición de un coágulo perfectamente diferenciado es indicativo de la actividad de la coagulasa

En el esquema siguiente se puede observar claramente las reacciones en la prueba de la coagulasa.

NEGATIVASPOSITIVAS

NEGATIVA



1+



2+



3+



4+

No se observa evidencia en la formación de fibrina

1 POSITIVA

Aparecen coágulos muy pequeños desorganizados

2 POSITIVA

Aparece un coágulo pequeño organizado

3 POSITIVA

Aparece un gran coágulo organizado

4 POSITIVA

Aparece coagulado todo el contenido del tubo; el coágulo se mantiene aún cuando se invierte el tubo

## LIMITES DE TOLERANCIA

El límite de tolerancia por gramo de muestra es el mínimo de  $10^3$  y un máximo de  $2 \times 10^3$ .

## MANERA DE REPORTAR

Si por ejemplo al realizar las lecturas en las placas de Baird Parker se encontraron 6 colonias en una placa de la dilución  $10^2$  y 4 colonias en otra placa de la misma dilución ( $10^2$ ), se suman las colonias y reportamos  $10 \times 10^2$ .

Se realiza la misma operación con la dilución de  $10^3$ .

## PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

## 1.- MEDIO DE BAIRD PARKER

<u>Fórmula</u>	<u>gr en litro</u>
Triptona	10,0
Extracto de carne	5,0
Extracto de levadura	1,0
Cloruro de Litio, hexahidrato	5,0
Agar	20,0

## Instrucciones

Añadir los ingredientes mencionados a un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición y obtener una completa solución, enfriar a  $50-60$  °C y ajustar el pH a 6.8. Distribuir el medio en botellas para esterilizar a  $121$  °C durante 15 minutos. Se enfría a  $50$  °C y se añaden asepticamente 50 ml de Emulsión Yema de Huevo-Telurito (Egg Yolk-Tellurite Emulsion). Se mezcla antes de verter en porciones de 15-18 ml a cajas de Petri.

Las cajas de Petri con agar Baird-Parker deben ser usadas preferentemente el mismo día de su preparación.

Las placas preparadas pueden almacenarse a  $4$  °C.

## 2.- CALDO INFUSION CEREBRO CORAZON (BHI)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
----------------	---------------------

Infusión de cerebro de ternera en forma sólida	12,5
Infusión de corazón de vaca en forma sólida	5,0
Peptona proteosa	10,0
Dextrosa	2,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato disódico	0,1

## Instrucciones

Se suspenden 34,5 gr en un litro de agua destilada y calentar hasta ebullición. Distribuir el medio en frascos universales ( 10 ml ) y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

## 3.- PLASMA DE CONEJO

Utilizar el Bacto-coagulasa Plasma EDTA. Para disolver la pastilla se utiliza 3 ml de agua destilada estéril o solución salina al 0,85%.

## DETERMINACION DE SALMONELLA TIFICA

### CARACTERISTICA DE LA BACTERIA

El grupo Salmonella está constituido por microorganismos móviles Gram-negativos que no fermentan la lactosa y que están estrechamente relacionados antigénicamente, fermentan la glucosa y la manita, la mayoría con producción de gas. Son bacterias-patógenas para el hombre y habitualmente aisladas en las heces, orina o sangre y ocasionalmente del pus, las variedades del tipo salmonellas son responsables de las fiebres intestinales, intoxicaciones alimenticias, septicemia e invariablemente de cualquier infección causada por microorganismos que entran en el cuerpo por vía oral.

Con respecto a los síntomas clínicos, modos de difusión y patogenicidad las salmonellas pueden ser convenientemente divididas en dos grupos principales:

- 1.- Fiebres tifoideas y paratifoideas producidas por S. typhi y S. Parathypi A, B y C.
- 2.- Las infecciones entéricas producidas por las otras salmonellas.

Las primeras se las obtiene por contagio a través de la ingestión de unos alimentos y el agua, así como por contacto directo.

La epidemiología de la salmonelosis es extremadamente compleja. Algunas fases no son bien conocidas. Por ej. S Typhi y S. Parathypi infectan al hombre principalmente, mientras que otras salmonellas afectan también a un gran número de animales, tanto de sangre caliente como de sangre fría. Algunos serotipos tienen especificidad de hospedador como por ej. S. pullorum para pollos S. Cholerae suis para cerdos producen enfermedades con manifestaciones clínicas.

Una serie de factores tales como las prácticas de cría de animal, los sistemas de producción animal, la producción centralizada de alimentos, de piensos, y el comercio internacional de alimentos contribuyen a crear ciclos de perpetuidad entre el hombre y animales. Los principales eslabones de las cadenas de circulación son animales-piensos-animales, animales-alimentos-hombre y hombre-alimentos-hombre. El contagio directo entre personas y personas es comparativamente raro.

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE SALMONELLA

A pesar de que aún no se ha podido desarrollar ningún método - que pueda garantizar la recuperación de todos los serotipos de Salmonella a partir de los diferentes productos alimenticios - sometidos a las variadas condiciones de preparación y conservación para el aislamiento e identificación de salmonellas se lo ha hecho a partir de seis etapas sucesivas.

- 1.- Enriquecimiento no selectivo
- 2.- Enriquecimiento selectivo
- 3.- Siembra en placa de medios sólidos selectivos y diferenciales.
- 4.- Estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas, en los medios adecuados.
- 5.- Análisis antigénico, en dos fases:
  - a) Empleo del antisuero polivalente O y del antisuero polivalente H y
  - b) Utilización de los antisueros específicos del grupo "O" y "H".

## AISLAMIENTO DE SALMONELLAS

Esta etapa incluye tres partes fundamentales:

- 1.- Enriquecimiento no Selectivo
- 2.- Enriquecimiento Selectivo
- 3.- Siembra en placa en medios de agar selectivo

### 1.- ENRIQUECIMIENTO NO SELECTIVO

#### 1.1 MATERIALES Y EQUIPOS

- a.- Balanza analítica a 0,1 g
- b.- Fundas plásticas estériles
- c.- Espátulas
- d.- 2 vasos de aluminio
- e.- Mechero de Bunsen
- f.- Stomacher para homogenizar la muestra
- g.- Incubadora a 37°C.

#### 1.2 MEDIO DE PRE-ENRIQUECIMIENTO

- a.- Agua de peptona buferada

### 1.3. TECNICA DE PRE-ENRIQUECIMIENTO

- a.- Pesar 25 g ( en ambiente aséptico) de la muestra - previamente homogenizada y con la ayuda de una espátula o pinza flameada se introduce en la funda - estéril.
- b.- Mezcle los 25 gr de muestra con 225 ml de agua de peptona buferada(BPW). Si la muestra no es soluble en el medio de pre-enriquecimiento, póngalo en el Stomacher por dos minutos.
- c.- Colocar en la incubadora a 37°C por 24 horas .

## 2.- ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO

### 2.1. MATERIALES Y APARATOS

- a.- Espátulas
- b.- Agitadores de vidrio y magnéticos
- c.- Tubos de ensayo
- d.- Frascos universales
- e.- Calentadores magnéticos
- f.- Pipetas
- g.- Reloj
- h.- Probetas
- i.- Flujo laminar

### 2.2. MEDIO DE ENRIQUECIMIENTO

- a.- Selenito-cistina
- b.- Caldo de tetracionato

### 2.3. REACTIVOS

- a.- Solución de yodo
- b.- Solución de verde Brillante

### 2.4. TECNICA

- a.- Del mismo (BPW), después de la incubación se toma - 1 ml con una pipeta graduada estéril y se inocula en tubo que contenga 10 ml de caldo selenito-cistina. Incube en Baño de María a 43°C durante 24 horas.
- b.- De igual manera se inocula el caldo de tetracionato y se incuba en la incubadora de 42°C durante - 24 horas.

### 3.- SIEMBRA EN PLACAS EN MEDIOS DE AGAR SELECTIVO

#### 3.1. MATERIALES Y APARATOS

- a.- Cajas de Petri
- b.- Cámara de flujo laminar para secar cajas
- c.- Asa de platino
- d.- Mechero de Bunsen
- e.- Marcadores para rotular las cajas
- f.- Incubadora a 37 °C

#### 3.2. MEDIO DE CULTIVO

- a.-, Xilosa Lisina Descarboxilato (XLD)

#### 3.3. TECNICA

- a.- Pasar una asada de cada uno de los medios de enriquecimiento selectivo sembrados anteriormente, a la superficie de una placa de cada uno de los medios de agar selectivo escogido para este caso, extender de tal manera que se obtenga colonias aisladas - (Siembra por agotamiento).
- b.- Incubar las cajas del medio de XLD; las características de las colonias aisladas son colonias rojas-con centro negro.

### IDENTIFICACION DE SALMONELLAS

Para la identificación de salmonellas hay dos etapas:

- 1.- Estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas de salmonella y
- 2.- La serología o iso-inmunización.

#### 1.- ESTUDIO DE LAS CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LAS COLONIAS SOSPECHOSAS DE SALMONELLA

##### 1.1 MATERIALES Y APARATOS

- a.- Aguja de inoculación recta
- b.- Mechero de Bunsen
- c.- Marcadores para rotular
- d.- Incubadora a 37°C

##### 1.2 MEDIOS BIOQUIMICOS

- a.- Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)
- b.- Agar Hierro Lisina (LIA)

- c.- Agar citrato
- d.- Agar Urea
- e.- Agua de triptona
- f.- Medio SIM
- g.- Caldo de Malonato

### 1.3 TECNICA

a.- Tomar con una aguja de inoculación estéril una colonia típica que se considere sospechosa y se siembra en los diferentes medios bioquímicos a tubos - de agar inclinados, caldos y tubos con agar sin inclinar para hacer cultivos profundos.

b.- Incubar los tubos a 37°C durante 24 horas.

---

### MANERA DE SEMBRAR EN LOS DIFERENTES MEDIOS BIOQUIMICOS

---

FORMA DE SIEMBRA	MEDIO DE CULTIVO
Tubo inclinado con estría y picadura	TSI (agar)
Tubo inclinado por estría y picadura	LIA (agar)
Tubo sin inclinar por picadura profunda	SIM (agar)
Introducir el asa y observar que la colonia quede en el medio de cultivo	AGUA DE TRIPTONA(TW) CALDO MALONATO
Por estría	CITRATO (agar) UREA (agar)

---

### REACCIONES DE LOS CULTIVOS BIOQUIMICOS

(Si es salmonella se reproduce los siguientes cambios en los diferentes medios)

MEDIO	CAMBIO DE COLOR	FONDO	PENDIENTE	SH <sub>2</sub>
TSI		A	NC ó ALC	Ptvo
LIA		ALC	ALC	Ptvo
SIM				Ptvo
UREA	NC			
CITRATO		NC ó Azul	Azul	
MALONATO	NC			

Agua de Triptona= Negativa a la prueba de Indol

## DE DONDE:

- A = Acido (amarillo)  
 ALC = Alcalino (rojo)  
 Ptvo = Positivo, negro  
 NC = Sin cambio de color del medio

## 2.- PRUEBA SEROLOGICA

## 2.1 MATERIALES Y APARATOS

- a.- Portaobjeto  
 b.- Asa de platino  
 c.- Pipeta pasteur  
 d.- Cl<sup>N</sup>a en solución acuosa al 0,85%  
 e.- Mechero de Bunsen  
 f.- Gasa



BIBLIOTECA

## 2.2. MEDIO UTILIZADO

- a.- Agar infusión cerebro-corazón (BHI)

## 2.3. TECNICA

- a.- Teniendo las reacciones características en los distintos medios bioquímicos para salmonella presuntiva, del TSI se inocula con una asa recta en frascos conteniendo agar de BHI en forma inclinada, es decir la siembra se la hace en forma de estría.
- b.- Se deja al medio ambiente durante dos días.
- c.- Transcurrido este tiempo procedemos hacer la prueba serológica propiamente dicha.
- d.- Colocar una gota de solución salina al 0,85% en los extremos de un portaobjeto desgrasado.
- e.- Del agar BHI se toma una cantidad mínima del crecimiento bacteriano y hacemos una suspensión a cada una de las gotas, que están en el portaobjeto desgrasado.  
 Agregar una gota de antisuero "H" a una de las suspensiones, homogenizar con una asa redonda de platino. Se hace movimientos de vaivén por 30 segundos, una prueba positiva para salmonella es la aglutinación de la suspensión al cabo de ese tiempo.
- f.- De la misma forma se hace con el antisuero "O"
- g.- Se compara las dos suspensiones.

El fundamento de la prueba serológica de salmonellas implica - la mezcla íntima de una suspensión del organismo (el antígeno) con el in<sup>m</sup>u<sup>n</sup>o suero del anticuerpo. Si el suero contiene aglutininas por la presencia del antígeno en el organismo, se da rápida y completa deformación (aglutinación del organismo). Esto se conoce como una reacción homóloga.

La reacción homóloga se caracteriza por la rapidez y avidez de la misma.

#### PRUEBA DIFERENCIAL PARA CONFIRMAR LA PRESENCIA DE SALMONELLA TYPHI

Una prueba adicional que se realiza para la confirmación de salmonella y shigella de otra especie como el Citrobacter que posee parecida reacción bioquímica con la de los microorganismos del grupo salmonella es la prueba diferencial. La diferenciación se lleva a cabo en el medio de ONPG. El microorganismo - Salmonella crece dando una coloración amarilla y el Citrobacter permanece incoloro.

La reacción de ONPG se realiza de la siguiente manera:

##### REACTIVO

- |     |   |                   |
|-----|---|-------------------|
| 1.- | Solución de 1M de fosfato mono-sódico pH7 |                   |
|     | $P O_4 H_2 Na (H_2O)$                     | 6 gr              |
|     | Agua destilada                            | 45 ml             |
|     | NaOH 30% m                                | 3 ml (ajustar pH) |
|     | Agua destilada csp                        | 50 ml             |

Mantener en refrigeración

- 2.- A los 15 ml de la solución 2 añadir 5 ml de la solución 1  
\* Para su uso se calienta a 37°C.

#### PRUEBA DIFERENCIAL: SALMONELLA-CITROBACTER

- 1.- MATERIALES Y APARATOS
- a.- Pipetas graduadas a 0,1 ml
  - b.- Frascos de McCartney
  - c.- Incubadora a 37°C
  - d.- Baño de María
  - e.- Solución salina al 0,85% estéril
  - f.- Tolueno
  - g.- Reactivo de ONPG

## 2.- TECNICA

- a.- Teniendo la reacción característica en TSI hacer una suspensión espesa con una asada en 0,2 ml de solución salina 0,85% estéril.
- b.- Añadir II gotas de tolueno y agite (liberar la enzima).
- c.- Dejar reposar a 37°C por 15 minutos
- d.- Agregar 0,2 ml de reactivo ONPG
- e.- Incubar en Baño de María a 37°C
- f.- Leer después de una hora, dos horas, 24 horas
- g.- Reacción positivo = Coloración amarillo estable.

## TABLA DE TOLERANCIA PARA SALMONELLA

Número de muestras tomadas	= 5
Cantidad de muestras toleradas	= 0
Límite mínimo y máximo por g de muestra	= 0

Esta tabla nos indica que basta la presencia de salmonellas para que se reporte rechazado el lote o no apto para el consumo animal, por cuanto esta prueba no es cuantitativa sino más bien se la hace desde el punto de vista cualitativo.

El lote rechazado se somete a un remuestreo por lo que la empresa productora de dicho producto tiene la obligación de mantener en custodia el lote analizado.

En caso de salir nuevamente el examen microbiológico positivo para salmonella tífica, en el remuestreo; el lote es inmediatamente incinerado.



## PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

## AGUA DE PEPTONA BUFFERADA

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Peptona	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato disódico	3,5
Fosfato monopótasico	1,5

## Instrucciones

Se añaden 20 gr de polvo a un litro de agua destilada. Se mezcla bien y se distribuye en los recipientes definitivos, se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos.

## CALDO DE SELENITO-CISTINA

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Triptona	5,0
Lactosa	4,0
Fosfato de sodio mono- hidrogenado	10,0
Selenito ácido de sodio	4,0
l-cystina	0,01

## Instrucciones

Para rehidratar el medio se suspenden 23 gr en un litro de agua destilada y se calienta hasta ebullición. Se distribuye en tubos estériles para dar al medio una profundidad mínima de 60 mm. Se debe evitar el calentamiento de un modo excesivo. No necesita esterilización.

## CALDO DE TETRACIONATO DE MULLER-KAUFMAN

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Triptona	7,0
Peptona de soja	2,3
Cloruro de sodio	25,0
Carbonato de calcio	25,7
Thiosulfato de sodio	40,0
Bilis de buey	4,75

### Instrucciones

Se suspenden 83 gr en un litro de agua destilada y se calienta hasta que hierva. Se enfría por debajo de 45°C y se añaden inmediatamente antes de su esterilización 20 ml de una solución de yodo y 2 ml de solución Verde brillante al 0,5%. Se mezcla bien y se vierte en tubos estériles (10 ml por tubo)

### SOLUCION DE YODO

Yodo	20 g
Yoduro de Potasio	25 g
Agua destilada	100 ml



BIBLIOTECA

### Preparación

Se disuelven el yoduro de potasio en 5 ml de agua destilada. Se añade el yodo y la solución se calienta suavemente hasta disolverlo completamente. Se completa con agua destilada hasta un volúmen de 100 ml.

### SOLUCION DE VERDE BRILLANTE

Verde Brillante	0,5 g
Agua destilada	100,0 ml

### Preparación

Se añade verde brillante al agua destilada y se agita hasta disolver el colorante. Se calienta la solución a 100 °C durante 30 minutos y se agita de vez en cuando hasta disolución completa. Se almacena en frascos de vidrio pardo y preservado de la luz.

### AGAR XILOSA LISINA DESOXICOLATO (XLD)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Extracto de levadura en polvo	3,0
Clorhidrato de L-Lisina	5,0
Xilosa	3,75
Lactosa	7,5
Desoxicolato de sodio	7,5
Thiosulfato de sodio	5,0
ClNa	1,0
Citrato férrico amónico	6,8
Rojo de fenol	0,08
Agar	12,5

### Instrucciones

Se suspenden 53 gr en un litro de agua destilada, se calienta con agitación frecuente hasta que el medio hierva.

No se debe sobrecalentar ni autoclavar. Se transfiere inmediatamente a un baño a 50°C. Tan pronto como se haya enfriado - el medio se vierte en placas, el pH del medio será 7,4 aproximado.

### AGAR HIERRO TRES AZUCARES (TSI)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Lab-Lenco en polvo	3,0
Extracto de levadura	3,0
Peptona	20,0
Lactosa	5,0
Sacarosa	10,0
Dextrosa	1,0
Citrato férrico	0,3
Thiosulfato de sodio	0,3
Rojo de fenol	0,023
Agar	12,0

### Instrucciones

Se suspenden 65 gr en un litro de agua destilada y se hierve - hasta disolver el medio por completo. Se mezcla bien y se distribuye 8 ml en tubos. Se esteriliza a 121 °C por 15 minutos. Se deja solidificar el medio en posición inclinada para formar un fondo con pendiente.

### AGAR DE HIERRO LISINA (LIA)

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Peptona bacteriológica	5,0
Extracto de levadura	3,0
Dextrosa	1,0
L-lisina	10,0
Citrato férrico amónico	0,5
Thiosulfato de sodio	0,04
Púrpura de bromocresol	0,02
Agar	14,5

### Instrucciones

Se suspenden 34 gr en un litro de agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se distribuye en tubos de 8 a 10 ml de medio y se esteriliza en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Los tubos se enfrían en posición inclinada para formar pendiente con fondo profundo.

### SIM MEDIO

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Triptona	20,0
Peptona P	6,1
Sulfato ferroso de amonio	0,2
Thiosulfato de sodio	0,2
Agar Nº 1	3,5

### Instrucciones

Se suspenden 30 gr en un litro de agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se distribuye en recipientes definitivos y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

### AGAR CITRATO DE SIMONS

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Sulfato de Mg	0,2
Fosfato de amonio dihidrico	0,2
Fosfato amónico de sodio	0,8
Citrato de sodio tribásico	2,0
Cloruro de sodio	5,0
Azul de Bromotimol	15,0

### Instrucciones

Se suspenden 23 gr de polvo en un litro de agua destilada y se hierve hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

### CALDO DE MALONATO

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Sulfato de amonio	2,0
Fosfato dipotásico	0,6
Fosfato monopotásico	0,4
ClNa	2,0

Malonato de sodio	3,0
Azul de Lactobromotimol	0,025

#### Instrucciones

Rehidrate el medio disolviendo en 1000 ml de agua destilada. -  
Esterilizar a 121°C por 15 minutos.

#### UREA AGAR BASE

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Peptona	1,0
Dextrosa	1,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato bisódico	1,2
Fosfato de potasio	0,8
Rojo de fenol	0,012
Agar	15,0



#### Instrucciones

Se suspenden 2,4 gr en 95 ml de agua destilada y se hierve -  
hasta disolver el medio por completo. Se esteriliza en el au-  
toclave a 115°C por 20 minutos. Se enfría hasta 50°C y se in-  
troducen asépticamente 5 ml de una solución de úrea estéril al  
40%. Se mezcla bien, se distribuye en cantidades de 10 ml en -  
recipientes estériles y se deja que se solidifique en posición  
inclinada.

#### UREA AL 40%

Esta solución esterilizada por filtración es particularmente ú-  
til puesto que la solución de úrea no puede ser esterilizada -  
por la aplicación del calor. Se disponen en ampollas de 0,5ml  
y de 5 ml de la casa comercial.

#### AGAR INFUSION CEREBRO -CORAZON

<u>Fórmula</u>	<u>gr por litro</u>
Infusión de cerebro de terne- ra en forma sólida	12,5
Peptona proteosa	5,0
Cloruro de sodio	10,0
Dextrosa	5,0
Fosfato disódico	2,0
Agar N° 1	2,5
Infusión de corazón de vaca en forma sólida	10,0

### Instrucciones

Se suspenden 47 gr en un litro de agua destilada y se hierva hasta disolver el medio por completo. Se distribuye en tubos o frascos y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.

## CAPITULO II

### ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

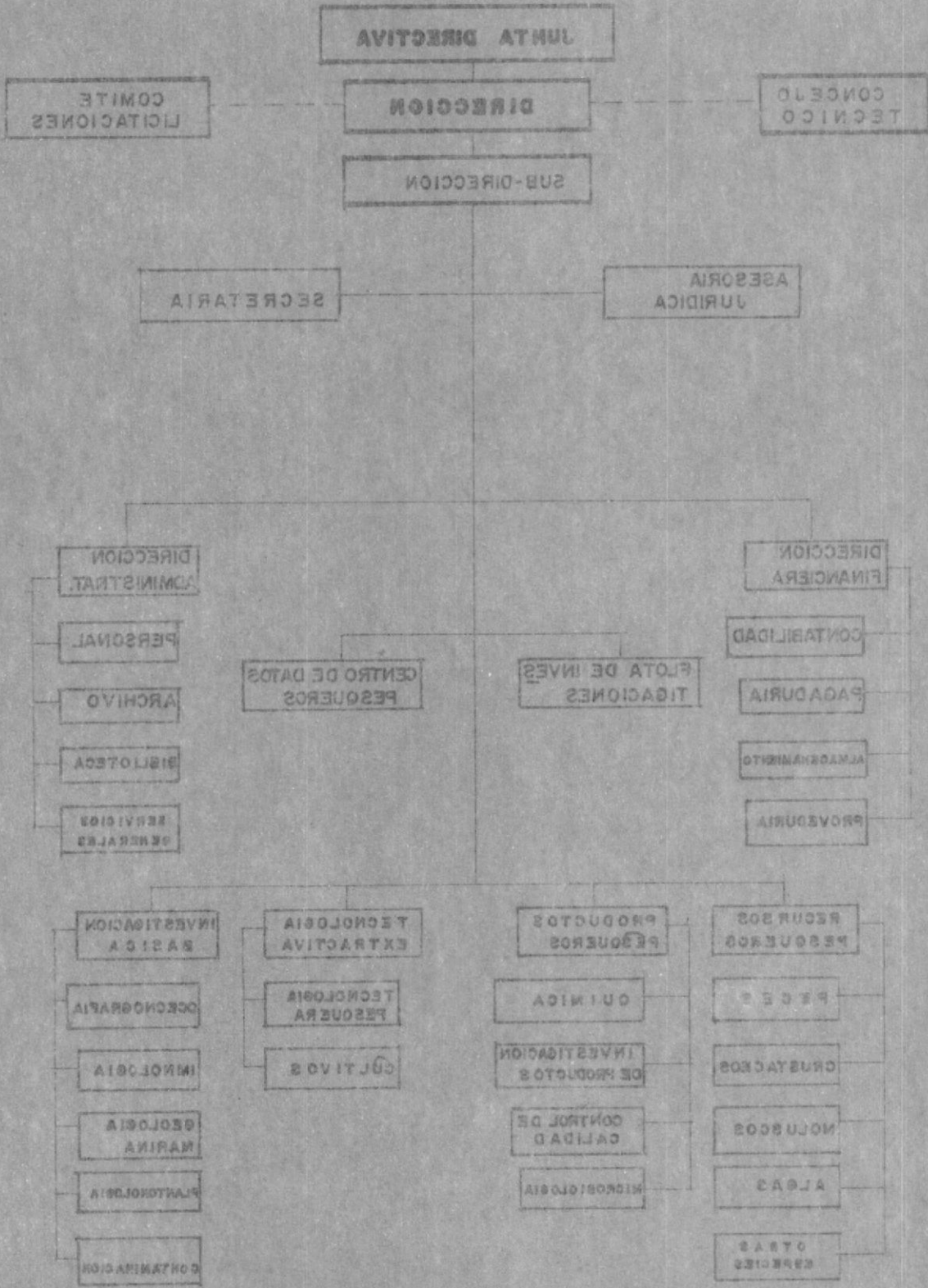
-GENERALIDADES

-TAMAÑO

-MERCADO

-BREVE ANALISIS ECONOMICO

ORGANIGRAMA DEL  
**INSTITUTO NACIONAL DE PESCA**



## ASPECTOS GENERALES DE LA EMPRESA

### GENERALIDADES



El Instituto Nacional de Pesca es una entidad adscrita al Ministerio de Recursos Naturales y Energéticos, siendo de su competencia la investigación de la pesca marina, fluvial y lacustre y de sus actividades convexas; estudio y evaluación de los recursos pesqueros del país en procura de su óptimo aprovechamiento, preparación técnica de los recursos humanos que intervienen directamente en la explotación de los mismos; desarrollo de nuevas tecnologías tendientes a diversificar la producción pesquera y proporcionar asistencia técnica a Organismos Estatales y privados.

El INP del Ecuador fundado en 1960 ha centrado su labor durante 23 años especialmente en describir la actividad pesquera realizada en el país y en trabajos de investigación, efectuados casi exclusivamente por extranjeros durante los primeros años del Instituto.

EL INP en salvaguarda del prestigio de la calidad de los productos bioacuáticos que el Ecuador exporta mantiene un sistema de control adecuado, a través de los laboratorios de Microbiología, Química y Control de Calidad con su personal especializado.

El certificado de calidad de los productos pesqueros emitidos por el INP, se basa en las regulaciones del INEN.

El INP es la Institución responsable de la emisión del certificado de Calidad e Ictiosanitarios, sin la cual las exportaciones de productos pesqueros que son sometidos a los análisis de Control antes de ser exportados son los siguientes:

- pescado fresco congelado
- camarón fresco y congelado
- pescado enlatado
- harina de pescado
- buche de pescado
- langosta, calamar, ostión y
- Productos pesqueros no convencionales realizados por la Planta Piloto.

El INP, para el cumplimiento de sus objetivos y funciones, está integrada por los siguientes niveles administrativos:

- a.- Ejecutivo
- b.- Asesor
- c.- Auxiliar de servicios y
- d.- Operativo

El nivel operativo es aquel que cumple directamente con los objetivos y finalidades del INP, ejecuta los programas de trabajo-técnico y las políticas impartidas por el nivel Ejecutivo, está conformado por las siguientes unidades:

- 1.- Departamento de Investigación Básica
- 2.- Departamento de Tecnología Extractiva
- 3.- Departamento de Recursos Pesqueros
- 4.- Departamento de Productos Pesqueros.

El departamento de Productos pesqueros está dividido en secciones entre las que est'' Química, Control de Calidad, Microbiología e Investigación de Productos Pesqueros.

La sección de microbiología tiene las funciones de:

- a.- Extender certificados de calidad, luego de los análisis-correspondientes
- b.- Mantener actualizadas las técnicas de análisis microbiológicas, de acuerdo con los requerimientos nacionales o-internacionales de comercialización .
- c.- Sugerir criterios técnicos y asesorar a los sectores industrial y artesanal en lo concerniente al control de -calidad microbiológica en las distintas fases de la actividad pesquera.
- d.- Coordinar con el Departamento Administrativo y financiero para el cobro correspondiente de análisis realizados y extensión de certificados de calidad que produce.

#### MERCADO

El estudio de mercado presente en este informe está hecho en base al laboratorio de Microbiología perteneciente al Departamento de Productos Pesqueros.

El mercado de esta sección está dirigido a aquellas empresas - dedicadas a la elaboración de productos pesqueros como a aquellas empresas dedicadas a:

- La exportación del recurso pesquero que actualmente ha entrado a un gran apogeo económico para el país generando divisas para el mismo, este recurso es el camarón.
- La producción de harina de pescado

Además cabe indicar que como Sección investigadora tiene la obligación de prestar servicios para el control microbiológico de productos que están en proceso de investigación y desarrollo.

#### TAMAÑO

La capacidad real que posee este laboratorio para realizar los correspondientes análisis está basado en la capacidad de sus - equipos y el tiempo de cada uno de ellos que exigen para seguir paso a paso la rutina diaria.

Por lo tanto el laboratorio de Microbiología presta semanalmente sus servicios a 8 empresas empacadoras de camarón y se analizan de 25-30 muestras de harina de pescado como resultado - promedio del total que llegan semanalmente.

A toda empresa empacadora se realiza los análisis microbiológicos pertinentes cada 3 meses y las empresas harineras llevan - semanalmente las muestras de acuerdo a la producción que hayan tenido .

Cada muestra de harina llega con una carta en donde debe constar el número de lote, código, fecha de producción y total de - kilos que se han procesado.

Según lo expuesto anteriormente este laboratorio realiza análisis a 8 empresas de las cuales de cada una se toman 5 muestras lo que nos dá un total de 40 muestras, resultando un número de 240 análisis, adicionando los 25-30 análisis de salmonella en - harina de pescado son un total de \*270 análisis semanales,\* - \*1080 análisis mensualmente y \*12.900 análisis anualmente.

El laboratorio de Microbiología tiene una área de construcción

de 77 m<sup>2</sup>, los cuales están distribuidos en:

- Recepción de muestra
- Limpieza de materiales
- Preparación de medios y reactivos
- Pesado de muestra
- Zona estéril para el cultivo de los microorganismos.

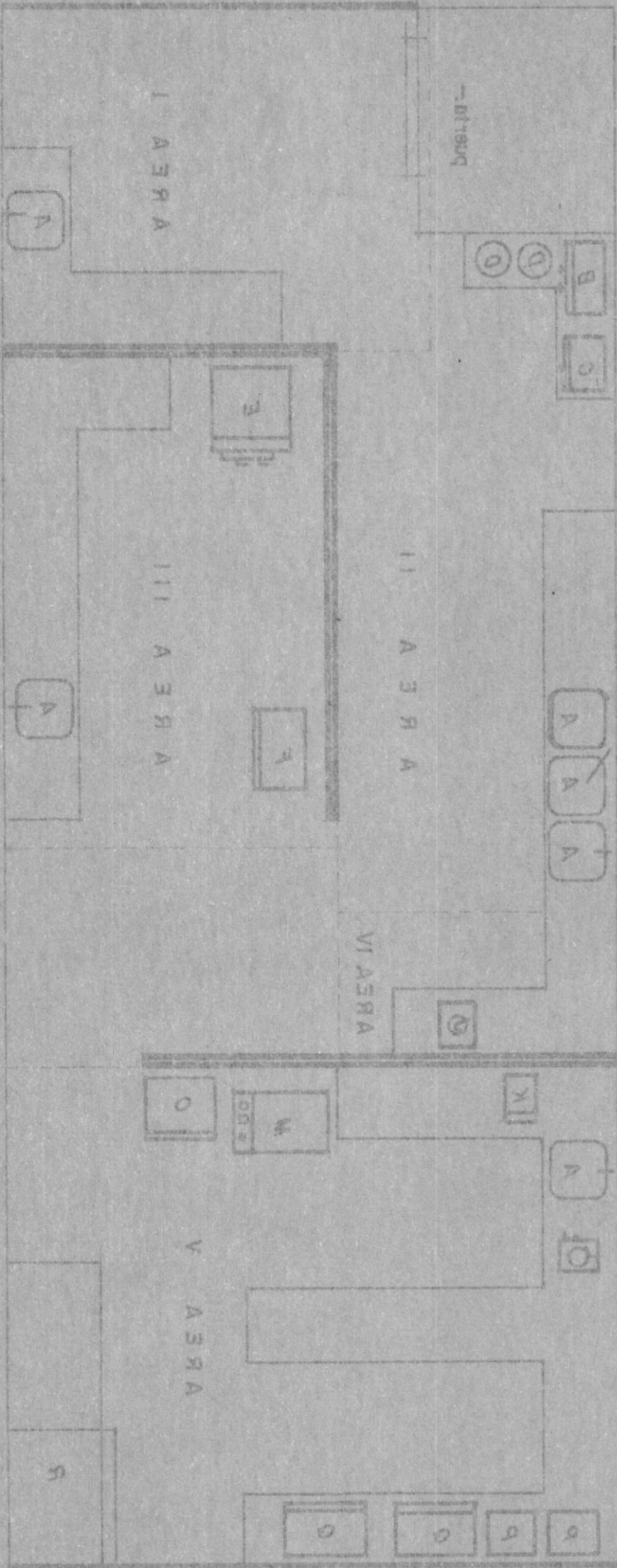
Estas pequeñas subdivisiones están detalladas posteriormente - en el diagrama del Departamento de Microbiología.

- \* Son cálculos, atendiendo al número de empresas que solicitan los servicios de esta sección.



БИБЛИОТЕКА

ЛАБОРАТОРИО ДЕ МИКРОБИОЛОГИЯ - ГЛА ОНА -



# DETALLE DE LA NOMENCLATURA

AREA I	RECEPCION DE MUESTRAS
AREA II	LIMPIEZA DE MATERIALES
AREA III	PREPARACION DE MEDIOS Y REACTIVOS
AREA IV	PESADO DE MUESTRA
AREA V	CULTIVO

A	lavaderos
B	esterilizador
C	estufa
D	techos de agua destilada
F	refrigerador y congelador
J	balanza
K	homogenizador
L	contador de colonias
M	baño de maría
O	incubadora 23° C
P	incubadora 43° C
Q	incubadora 37° C
R	flujo laminar



## ASPECTO FINANCIERO

El Instituto Nacional de Pesca es una entidad al servicio público, cuyos recursos están constituidos por:

- Las asignaciones constantes del presupuesto general del Estado.
- El producto de los trabajos para las empresas particulares que efectúa el Instituto.
- El producto de la venta de sus publicaciones.
- Los empréstitos internos o externos que contare el producto de la venta de los recursos del mar y de sus aguas interiores capturado durante operaciones de pesca experimental y/o exploratoria, así como el que se obtuviere por cultivos de especies bioacuáticas.
- Valores, asignaciones, porcentajes y más valores que por ley se le otorgue.

Según los puntos anteriores nos podemos dar cuenta que es una Institución auspiciada por el gobierno y que recibe aportación de las funciones que realiza, es decir, por análisis realizados a productos pesqueros de diferentes empresas, elaboración e investigación de productos nuevos y a publicaciones de boletines y revistas informativas.

En cuanto a investigación y elaboración de productos se los realiza en la planta piloto de dicho Instituto.

A continuación se expone un pequeño análisis económico de la Sección de Microbiología.



BIBLIOTECA

## BREVE ANALISIS ECONOMICO DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

## TERRENO Y CONSTRUCCIONES

DENOMINACION	CANTIDAD (m <sup>2</sup> )	VALOR TOTAL S/.
Terreno	77	77.000
Paredes	117	1'170.000
Piso	77	77.000
Tumbado	77	77.000
Mesones		<u>55.000</u>
Suman		1'456.000

## MAQUINARIA, EQUIPOS Y ACCESORIOS

DENOMINACION	CANTIDAD	VALOR TOTAL S/.
Autoclave	1	900.000
Incubador a 37°C	2	448.000
Incubador a 25°C	1	441.000
Incubador a 43°C	1	150.000
Incubador a 37°C	1	150.000
Stomacher	1	120.000
Contador de Quebec	1	100.000
Esterilizador(horno)	1	180.000
Baño de María	1	80.000
Estufa a 65°C	1	75.000
Cámara de flujo laminar	1	250.000
Agitadores y calentadores	3	75.000
Bomba de vacío	1	26.475
Acondicionador de aire	2	360.000
Mechero de Bunsen	1	2.250
Mechero de alcohol	1	850
Refrigerador	1	180.000
pH-metro	1	<u>200.000</u>
Suman		3'738.575

## MATERIALES DIRECTOS

DENOMINACION	CANTIDAD	COSTO MENSUAL
		S/.
Fundas plásticas	2500	9.000
Tubos de ensayo(150x16)	1800	32.400
Tubos de ensayo(150x18)	400	7.920
Tubos Durhan	800	40.000
Pipetas Pasteur	Cajas con 100u/	2.800
Pipetas: 1 ml	10	2.500
2 ml	10	5.500
5 ml	120	49.200
10 ml	120	49.200
Beakers de acero inoxi- dable de: 5000 ml	5	15.500
Beakers : 5000 ml	2	5.800
1200 ml	2	4.585
600 ml	6	2.130
Probetas: 1000 ml	1	1.150
500 ml	1	1.900
250 ml	2	2.500
25 ml	1	950
Botellas: 500 ml	100	6.500
300 ml	100	3.700
Espátulas	6	2.880
Agitadores de vidrio y magnéticos	13	6.500
Recipientes plásticos para agua destilada	3	<u>25.500</u>
Suman		278.115

## MATERIALES INDIRECTOS

DENOMINACION	CANTIDAD	COSTO MENSUAL
		S/.
Reloj alarma	1	5.600
Guantes de asbesto	2 pares	15.000
Algodón	1 paquete (12 unidades)	780
Canastillas	12	11.000
Marcadores	5	1.000
Continúa		

DENOMINACION	CANTIDAD	VALOR MENSUAL S/.
Lavador de pipetas	1	6.600
Pisceta plástica	2	1.800
Detergente	Funda de 2 kilos	560
Termómetros	4	<u>4.800</u>
Suman		47.140

#### MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

DENOMINACION	CANTIDAD (Frascos)	VALOR TOTAL S/.
Agar de Baird-Parker	500 g	8.000
Agar XLD	500 g	7.908
Agar Nutritivo	500 g	7.260
Agar para recuento de placas	500 g	6.096
Agar Verde Brillante	500 g	7.765
Agar TSI	500 g	5.220
Agar Hierro Lisina	500 g	5.040
Agar Urea	500 g	5.700
Agua de peptona buferada	500 g	4.200
Agua de peptona	500 g	3.000
Agua de triptona	500 g	2.500
Caldo de tetracionato	500 g	4.800
Caldo Selenito-Cistina	500 g	5.098
Caldo Lauryl Sulfato	500 g	4.080
Caldo Bilis Verde Brillante al 2%	500 g	5.520
Reactivo de Kovacs	100 ml	2.500
Plasma de conejo	Frascuito de 3 ml	4.500
Cloruro de sodio	5 kg	<u>5.160</u>
Suman		94.347

\* Los costos que se exponen en este análisis son aproximados

## MANO DE OBRA DIRECTA

Nº	DENOMINACION
1	Jefe de la Sección
2	Analista
1	Analista para preparar medios.

## MANO DE OBRA INDIRECTA

Nº	DENOMINACION
1	Lavador de materiales
1	Tomador de muestra
1	Conserje

## COSTO DE ANALISIS

## ANALISIS MICROBIOLÓGICOS PARA CAMARON

DENOMINACION	COSTO UNITARIO S/
Salmonella	500,00
Coliformes	650,00
Stafylococcus Aureus	900,00
Contaje a 25°C	600,00
Pseudomonas	350,00
Hongos	<u>600,00</u>
Suman	3600,00

(Producto terminado en cámara, cada tres meses aproximadamente)

## ANALISIS MICROBIOLÓGICO PARA HARINA DE PESCADO

DENOMINACION	COSTO UNITARIO S/
Salmonella	500,0

### CAPITULO III

- CONCLUSIONES Y  
RECOMENDACIONES
- ANEXOS



## CONCLUSIONES

La realización de estas prácticas profesionales durante los seis meses en la Sección de Microbiología del Instituto Nacional de Pesca me permiten concluir lo siguiente:

- Han sido muy beneficiosas puesto que me permitieron asumir responsabilidades como una analista más.
- Fueron muy significativas ya que me han ayudado a dilucidar con más acierto y reafirmar mis conocimientos teóricos en el área de Microbiología de los Alimentos.
- Conocer la metodología de trabajo rutinaria que día a día se práctica en la Sección de Microbiología del INP, para realizar exámenes microbiológicos.
- Los métodos microbiológicos empleados en este laboratorio son sencillos, rápidos y de fácil aplicación en otros alimentos.
- El laboratorio cuenta con un medio ambiente estéril bueno que ~~le~~ permite realizar cultivos de M.O altamente patógenos.
- El laboratorio microbiológico cumple con las funciones asignadas como el de analizar, extender los certificados de aprobación o rechazo luego de los análisis y realiza investigaciones a personas que requieran su servicio.
- El laboratorio no cuenta con el material bactericida y desinfectante que el analista necesita para desinfectar ~~se~~ las manos después de realizar los exámenes microbiológicos.

## RECOMENDACIONES

Después de la permanencia en esta sección, he podido observar ciertas irregularidades que considero convenientemente resaltar:

- Se debe desinfectar repetidamente las manos antes y después de cada análisis para evitar contaminaciones en el laboratorio.
- Es importante anotar que a los equipos de este laboratorio se le debe dar el mantenimiento adecuado por lo menos cada 6 meses ya que en el transcurso de mi estadía no lo observé.
- Se debe limpiar los mesones, flujo laminar, el congelador donde se colocan las muestras antes de iniciar el trabajo de rutina.
- Hacer la limpieza y la purga correspondiente al autoclave después de su uso, ya que no se lo hace.
- Recomendaría a los estudiantes de Tecnología de alimentos que se interesen por la materia de Microbiología, ya que es una asignatura muy apasionante e interesante que nos permite ver el grado de contaminación de los alimentos que a diario nosotros mismos consumimos.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- MANUAL DE BACTERIOLOGIA TECNICA  
Baker F.J.  
Editorial Acribia-Zaragoza  
Segunda edición
- 2.- MANUAL OXOID  
Oxoid Limited  
Cuarta edición en español
- 3.- MEDIOS DE CULTIVO MERCK  
Criterios de Calidad
- 4.- METODOS PARA EL ANALISIS MICROBIOLOGICO DE LOS ALIMENTOS  
Departamento de Tecnología de Alimentos  
Chihuahua, México  
Julio, 1981
- 5.- MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS VOL I EN ESPAÑOL  
Técnicas de Análisis microbiológicos.  
ICMSF.  
Editorial Acribia-Zaragoza  
Segunda edición
- 6.- MICROORGANISMOS DE LOS ALIMENTOS VOL II EN INGLES  
Técnicas de Análisis microbiológicos  
ICMSF  
Editorial Acribia-Zaragoza  
Segunda edición

ANEXOS



Area de recepción y Pesado de muestra  
de Harina de Pescado



Area de Pesado de muestras  
de Camarón



Area de Preparación de  
Medios y Reactivos

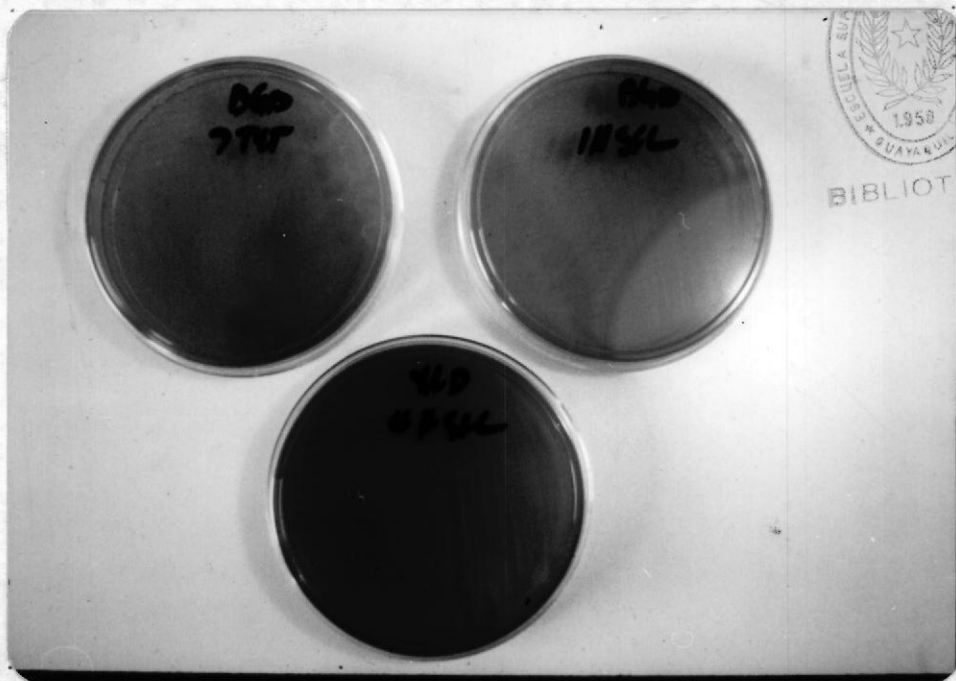


Area de Cultivo



BIBLIOTECA  
 INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
 SERVICIO DEL LITORAL

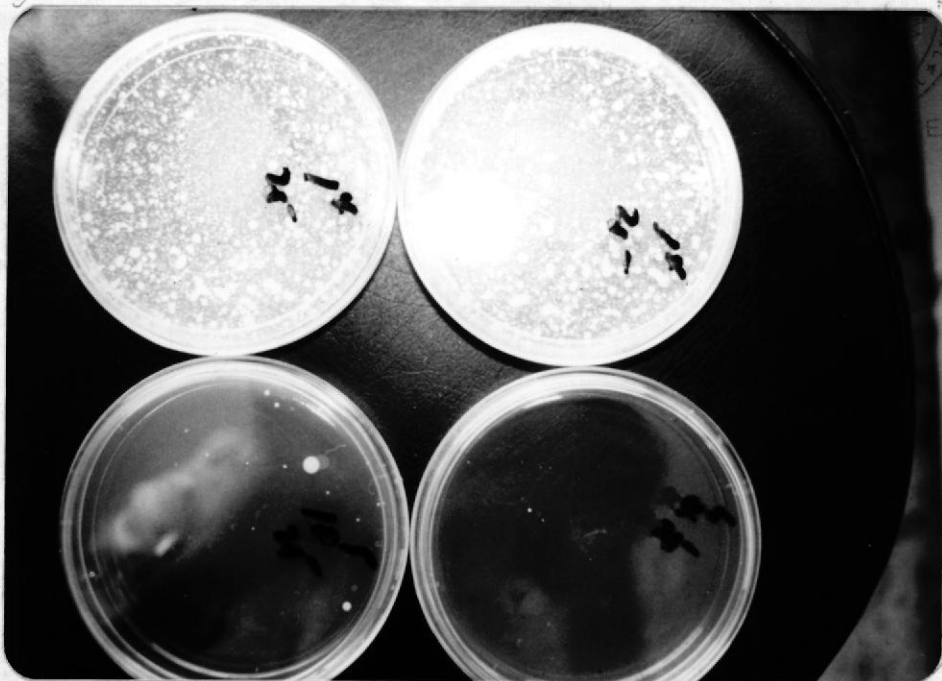
Enriquecimiento no Selectivo para detectar Salmonella



Siembra de Salmonella en placas que contienen agar selectivo



Contaje de Microorganismos Aerobios Mesófilos



Placas que muestran el crecimiento de Microorganismos Aerobios a 25°C



Prueba de Indol: Reacción Positiva. Confirmando la presencia de Coliformes Fecales

BIBLIOTECA



Incubadora a 37°C y 43°C



# Instituto Nacional de Pesca

Lolamendi 102 y la Ría  
Castilla (P. O. Eox): 5910  
Cables: INSNAPE  
Teléfono Conmutador:  
401057 - 401776 - 401779  
GUAYAQUIL - ECUADOR

## DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS PESQUEROS

### SECCION - MICROBIOLOGIA

Guayaquil, \_\_\_\_\_



BIBLIOTECA

De acuerdo al envío del Inspector de Pesca: \_\_\_\_\_

Fue analizado el producto: **HARINA DE PESCADO**

Empresa: \_\_\_\_\_

Laboratorio: \_\_\_\_\_

Fecha de producción: \_\_\_\_\_

Código: \_\_\_\_\_

Producción/kilos: \_\_\_\_\_

CON EL SIGUIENTE RESULTADO:

Método I.C.M.S.F.

Investigación de Salmonellas: \_\_\_\_\_

Investigación de Shigellas: \_\_\_\_\_

Otros análisis: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ APTO PARA EL CONSUMO ANIMAL

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

