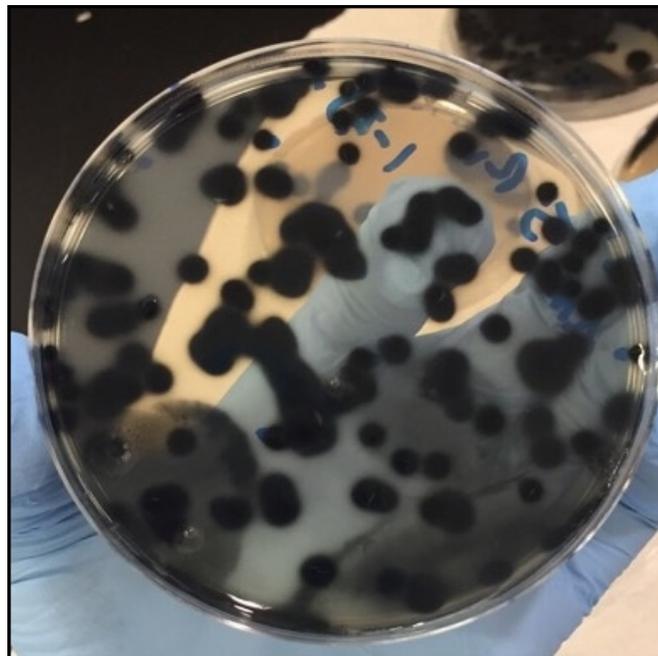


**INFORME DE PASANTÍA DE LA CARRERA DE TECNÓLOGO  
QUÍMICO. REALIZADA EN EL LABORATORIO TECNOLÓGICO  
DEL URUGUAY (L.A.T.U.)**



**Validación de la técnica para el recuento en placa de  
clostridios sulfito-reductores que crecen bajo  
condiciones anaeróbicas en muestras de alimentos.**

**Pasante: Mariana Casa**

**Tutor Empresarial: Paula Mussio**

**Tutor Académico: Cecilia Taulé**

**Agosto- Diciembre/2019**

## Índice

2) Resumen .....	4
3) Presentación de la Empresa .....	5
3.1 Misión: .....	5
3.2 Visión .....	5
3.3 Organigrama:.....	7
4) Concepto de Validación:.....	9
5) Tipos de Validación: .....	9
5.1 Validación primaria:.....	9
5.2 Validación secundaria:.....	10
5.3 Métodos no normalizados: .....	10
5.4 Métodos normalizados:.....	10
5.5 Métodos cualitativos:.....	11
5.6 Métodos cuantitativos: .....	11
6) Desarrollo de pruebas de parámetros de validación.....	13
6.1 Linealidad:.....	13
6.2 Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad): .....	14
6.2.1 a)Repetibilidad: .....	14
6.2.2 b) Reproducibilidad: .....	14
6.3 Aplicabilidad:.....	15
7) Particularidades de los métodos Microbiológicos:.....	16
8) Materiales y cepas de referencia: .....	17
9) Características de las bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras: .....	18
10) Recuento de microorganismos:.....	20
10.1 Recuento en placa: .....	20
11) Objetivos:.....	22
11.1 Objetivo general:.....	22
11.2 Objetivo específico: .....	22
12) Rol de mi participación: .....	23
13) Incorporación de nuevas actividades a las propuestas inicialmente:.....	24
14) Matrices:.....	24
15) Plan de trabajo:.....	25
16) Actividades realizadas: .....	26

---

16.1 Medios de cultivo, reactivos, materiales: .....	26
16.2 Equipos: .....	26
17) Procedimiento: .....	28
17.1 Preparación de medios de cultivo, soluciones y pruebas de esterilidad: .....	28
17.2 Estimación de la población bacteriana presente en el inóculo secundario de un cultivo de <i>C. perfringens</i> : .....	29
17.3 Análisis de linealidad en CONDIMENTOS: .....	30
17.4 Análisis de la linealidad en matrices cárnicas: .....	34
18) Comparación de dos marcas comerciales de medio de cultivo ISA (Oxoid) y (Liofilchem S.R.L) .....	37
19) Resultados: .....	38
19.1 Cuantificación de un inóculo secundario de <i>C. perfringens</i> , utilizando dos accesiones diferentes que tiene en stock el laboratorio. ....	38
19.2 Parámetros de validación .....	39
19.2.1 Linealidad: .....	39
19.2.2 Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad) .....	49
20) Diferencias entre marcas de medios de cultivo ISA (Oxoid) y (Liofilchem) .....	53
21) Discusión de los resultados: .....	58
22) Conclusiones: .....	63
23) Autoevaluación: .....	63
23.1 Agradecimientos: .....	64
24) BIBLIOGRAFIA: .....	65
25) Anexo .....	67

## 2) Resumen

La pasantía se realizó en el Departamento de Microbiología del LATU. La misma constó de validar el método para el recuento en placa de *clostridios sulfito-reductores* que crecen bajo condiciones anaeróbicas en muestras de alimentos.

Antes de poner en práctica dicha técnica en el laboratorio, se la debe validar con el fin de asegurar que los resultados que se entregan al cliente son confiables y de calidad.

Se emplearon dos tipos de matrices; cárnica y especias, dentro de las especias se analizaron cuatro tipos diferentes y para cárnicas se analizaron dos tipos diferentes. Se ensayaron las muestras por duplicado, inoculadas artificialmente con cepa de *Clostridium perfringens* marca Deltalab

Para cada matriz se evaluó los siguientes parámetros de validación, linealidad, precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y aplicabilidad.

### 3) Presentación de la Empresa

El LATU situado en Av. Italia 6201 es una organización de derecho público no estatal creada en 1965 para la prestación de servicios orientados a la cadena productiva.

Es referente nacional e internacional en innovación, transferencia tecnológica y soluciones de valor en servicios analíticos, de evaluación de la conformidad, metrológicos y tecnológicos.

Con más de 50 años, constituye un respaldo para el desarrollo de la cadena productiva y la certificación de calidad ante el mundo con su apoyo analítico a la industria y a las cadenas agroindustriales —láctea, forestal, textil, cereales, oleaginosos y sus productos derivados.

Ofrece sus servicios a organizaciones públicas y privadas, para propiciar procesos de cambio que contribuyen y fortalecen su competitividad y sustentabilidad a través de la mejora de la gestión empresarial, de sus procesos, de la promoción de la innovación y de su gestión socialmente responsable.

**3.1 Misión:** Impulsar el desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación y transferencia de soluciones de valor en servicios analíticos, de evaluación de la conformidad, metrológicos, tecnológicos, de promoción de la cultura científica y emprendedora y del desarrollo de plataformas tecnológicas.

**3.2 Visión:** Avanzar hacia la excelencia, reconocido en la sociedad uruguaya y la comunidad internacional como referente por la calidad de sus servicios y su modelo organizacional.

#### **Principios y valores:**

- Integridad, transparencia y confidencialidad
- Orientación al cliente
- Austeridad

- Sustentabilidad económica
- Gestión socialmente responsable
- Mejora continua
- Liderazgo participativo, innovador y creativo
- Trabajo en equipo
- Sentido de pertenencia
- Adaptación al cambio y a la incertidumbre
- Proactividad en la optimización de las competencias
- Creación de valor

En el departamento de Microbiología del LATU se analizan casi la totalidad de los alimentos que se importan y exportan del país.

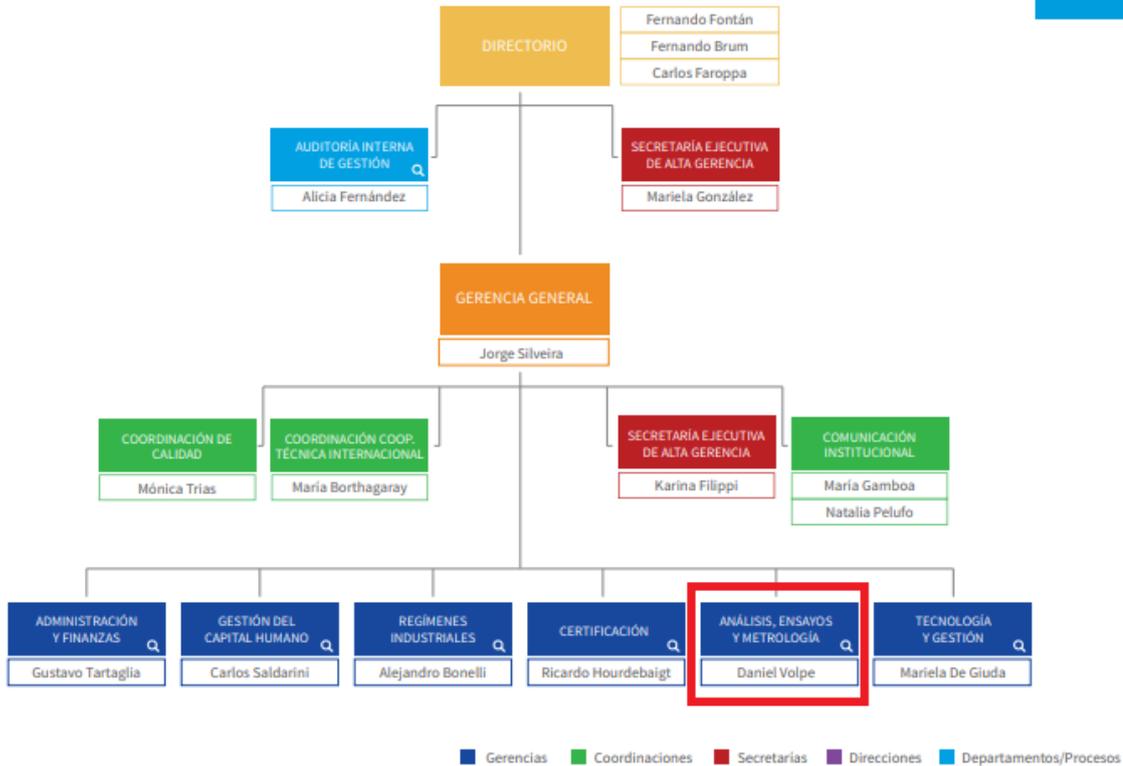
Se busca verificar la ausencia o presencia de microorganismos patógenos, así como también reconocer que la cantidad de microorganismos indicadores de calidad no superen los límites establecidos por el marco legal para cada tipo de alimento.

Garantizando que los productos que se importan cumplan con las disposiciones bromatológicas nacionales, esto se realiza para darles el mismo tratamiento que a los productos de la misma índole elaborados en el país.

De esta forma se busca además proteger al consumidor, asegurándole productos aptos desde el punto de vista de la salud.

**3.3 Organigrama:** El equipo del LATU está conformado por más de 500 personas entre personal técnico y administrativo, que trabajan con integridad, transparencia y confidencialidad. En las figuras N°1 y N°2 se encuentran las estructuras organizativas.

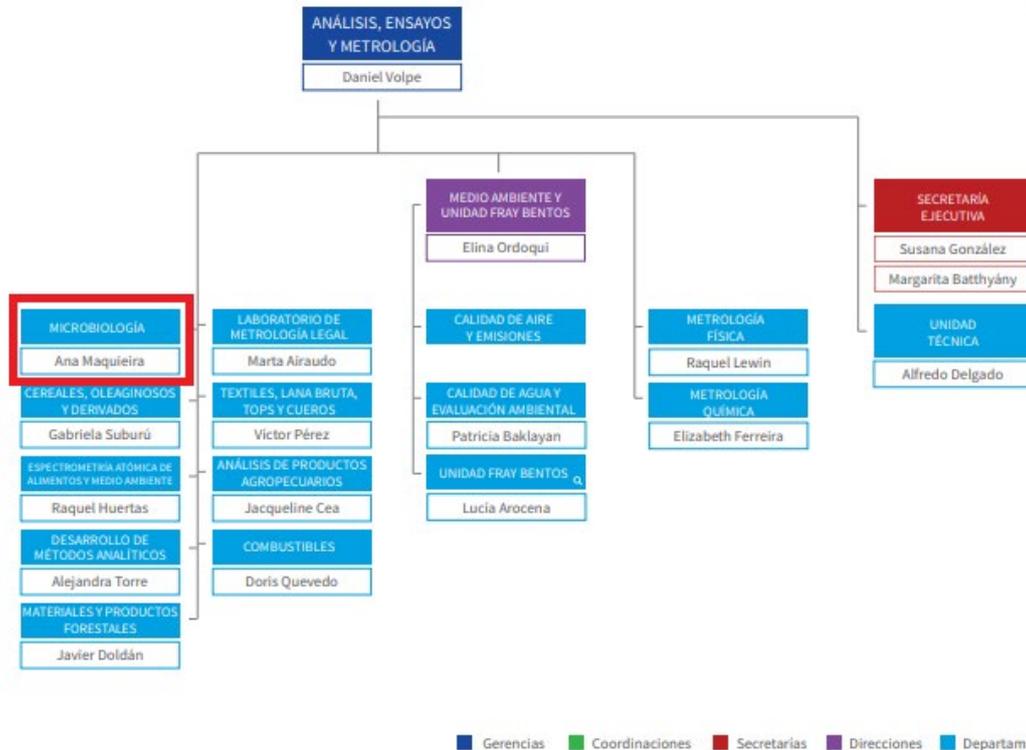
ESTRUCTURA ORGANIZATIVA  
Junio 2019



**Figura N°1:** Representación gráfica de la estructura y niveles Jerárquicos de la empresa. En el recuadro rojo se resalta el nombre de Daniel Volpe Gerente de los diversos departamentos entre ellos Microbiología.



**ESTRUCTURA ORGANIZATIVA**  
**GERENCIA DE ANÁLISIS, ENSAYOS Y METROLOGÍA**  
 Junio 2019



■ Gerencias ■ Coordinaciones ■ Secretarías ■ Direcciones ■ Departamentos/Procesos

**Figura N°2:** Representación gráfica de la estructura y niveles Jerárquicos de la empresa. El recuadro en rojo resalta el nombre de la jefa del departamento de microbiología.

#### 4) Concepto de Validación:

La razón de la validación radica en confirmar con fundamentos estadísticos que el método es adecuado para los fines previstos.

Su objetivo es garantizar confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos criterios, en términos de precisión, exactitud, etc. El proceso de validación es variable en función de criterios como si se trata de un método normalizado o no.

El tipo de método, según sea un método cualitativo o cuantitativo.

Por ello, la validación de un ensayo es el esqueleto que sustenta el producto básico de cualquier laboratorio de diagnóstico, asegurando un nivel de calidad y de confianza extraordinario.

#### 5) Tipos de Validación:

Según la norma UNE-EN.ISO 17025, el laboratorio podrá utilizar los métodos desarrollados o adoptados, siempre que hayan sido debidamente validados.

Hay diferentes tipos de validación, validación primaria o secundaria, según si es un método normalizado o no y validación dependiendo de si es un método cuantitativo o cualitativo.

**5.1 Validación primaria:** Es un proceso exploratorio que tiene como meta establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado o caracterizado en forma inadecuada. Debe dar origen a especificaciones numéricas y descriptivas para el desempeño e incluir una descripción detallada y precisa del objeto de interés. La validación primaria va precedida de la elaboración de un esquema de ensayo especialmente diseñado. Corresponde con la validación inicial que deben llevar a cabo los laboratorios y casas comerciales que diseñan un equipo diagnóstico, una prueba nueva o la unión en un solo protocolo de varios métodos normalizados o no.

En el caso de que se trate de una técnica que va a ser comercializada, los datos deben ser presentados a los organismos internacionales (FDA: Food and Drug Administration en EEUU, mercado CE: Comunidad Europea; IVD, In Vitro Diagnosis). Un comité estudia estos datos presentados y si los considera suficientes y adecuados para caracterizar la técnica, los aprueba o no y procede a su marcado en el documento adjunto de la prueba, deben quedar reflejados tanto la forma de realización de la técnica como los datos de validación.

**5.2 Validación secundaria:** (revalidación, validación parcial o verificación) se realiza cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte. Esta validación se centra en la reunión de evidencias acerca de que el laboratorio está capacitado para cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Algunos organismos le denominan verificación y es la confirmación, mediante el aporte de pruebas objetivas, de que se cumplen los requisitos establecidos en las condiciones de uso de ese laboratorio. Se trata de la validación que hay que llevar a cabo cuando se introduce un equipo diagnóstico, método o prueba en un laboratorio y que ya está validada primariamente por organizaciones internacionales.

A la hora de definir el alcance de la validación/verificación de un procedimiento analítico, es necesario tener en cuenta dos aspectos:

- A- Grado de normalización o estandarización de los procedimientos analíticos
- B- Grado de automatización del procedimiento analítico

**5.3 Métodos no normalizados:** En estos casos se deberá proceder a la validación formal del método (exactitud, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, selectividad y especificidad, intervalo de trabajo o rango, linealidad, función respuesta, límites de detección y cuantificación e incertidumbre). En cualquier caso la validación debe tener en cuenta los objetivos y uso que se pretende de los resultados de los ensayos.

**5.4 Métodos normalizados:** En este caso, se presupone que el método ha sido elaborado mediante la colaboración de una serie de expertos y que han definido su rango de aplicación, equipos empleados, operatoria utilizada, etc.

Por tanto, ya existen valores de parámetros que permiten tomar una decisión sobre la aptitud del método para el uso previsto. El método de validación se basa fundamentalmente en verificar la capacidad del laboratorio para cumplir de forma satisfactoria los requisitos establecidos en dichos métodos, tales como reproducibilidad, repetibilidad y exactitud.

**5.5 Métodos cualitativos:** son aquellos en los que se pretende detectar la existencia o ausencia de un microorganismo determinado, claramente especificado, en una muestra.

Los parámetros más adecuados para evaluar son:

1. Límite de detección: es la manera de asegurar que el método es capaz de detectar e identificar la presencia de microorganismos, en muestras con poca carga microbiana.
2. Parámetros que tengan que ver con la correcta detección del método: sensibilidad, especificidad, falsos positivos, falsos negativos, eficiencia.

**5.6 Métodos cuantitativos:** son aquellos en los que se desea indicar el número de unidades formadoras de colonia en una muestra, realizando un recuento determinado.

Los parámetros a tener en cuenta serán:

- 1- Precisión referida a la reproducibilidad.
- 2- Exactitud definida como recuperación. Este parámetro se considera fundamental para la evaluación del Control Interno de Calidad.
- 3.-Rango: se validará en el rango de trabajo (placa contable).

En relación a los parámetros de validación o verificación estos deberán determinarse de acuerdo al tipo de método. Para este fin la siguiente tabla N°1 puede ser utilizada como guía:

Tabla N°1: Tabla de los distintos parámetros de validación, en el recuadro en rojo se resaltan los parámetros a analizar para un método cuantitativo y normalizado.

PARAMETRO A EVALUAR	CARACTERISTICA(S)	METODO CUALITATIVO	METODO CUANTITATIVO		
			NORMALIZADO	MODIFICADO	NUEVO
SELECTIVIDAD	Identificación analito Interferencia de matriz	Sí	No	Sí	Sí
LINEALIDAD	Rango lineal	No	Sí	Sí	Sí
SENSIBILIDAD	Pendiente	No	Sí o No	Sí	Sí
LIMITES	Critico (LC) Detección (LOD) Cuantificación (LOQ) ←	Sí	Sí o No	Sí	Sí
PRECISION	Repetibilidad ← Reproducibilidad ←	No	Sí	Sí	Sí
VERACIDAD	Sesgo (s) Recuperación (R) ←	No	Sí o No	Sí o No	Sí
ROBUSTEZ	Test de Youden y Steiner	No	No	Sí o No	Sí
APLICABILIDAD	-----	Sí	Sí	Sí	Sí

## **6) Desarrollo de pruebas de parámetros de validación**

A continuación se desarrollan las cifras de mérito que se estudian, dicha información obtenida de la guía técnica de Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición elaborada por el instituto de salud pública.

### **6.1 Linealidad:**

La linealidad es la capacidad de un método de análisis, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio, dentro de un determinado intervalo. Con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar mediante un gráfico de concentración versus respuesta, que se conoce como Función Respuesta (normalmente llamada recta de calibrado).

Ésta se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajos limpios de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y valores superiores al LMP (intervalo mínimo aplicable) o al valor de interés.

Es necesario evaluar los estimadores de regresión lineal del gráfico: la pendiente ( $m$ ), el coeficiente de correlación ( $r$  ó  $Y$ ) y el punto de corte (intercepto) con el eje de las  $Y$  ( $L_0$ ).

$$Y = X \times m + L_0$$

En general el criterio de aceptación cualitativo que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación: El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable concentración ( $X$ ) y la variable respuesta ( $Y$ ) de la curva de calibración. Los valores máximos que puede alcanzar son  $-1$  y  $1$ . El valor máximo de  $1$  indica una correlación positiva perfecta (entre  $X$  e  $Y$ ) con una pendiente positiva. Cuando  $r=0$ , no existe correlación alguna, independencia total de los valores  $X$  e  $Y$ . En la práctica si  $r$  tiene un valor cercano a uno ( $1$ ), esto significa que existe correlación con una probabilidad

elevada. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0.999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0.99.

## **6.2 Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad):**

Es el grado de concordancia entre los resultados obtenidos al aplicar el procedimiento analítico repetidas veces bajo condiciones establecidas. La precisión depende sólo de la distribución de errores aleatorios y no tiene ninguna relación con el valor verdadero o el valor especificado.

La precisión podrá establecerse en términos de repetibilidad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como la desviación estándar de los resultados (Referencia: Manual Codex Alimentarius 18º Ed.).

**6.2.1 a) Repetibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de repetibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos en el mismo laboratorio por el mismo operador utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. Se puede determinar registrando al menos 6 mediciones bajo las mismas condiciones. Se requiere calcular la Desviación Estándar ( $S_r$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_r\%$ ).

**6.2.2 b) Reproducibilidad:** Es la precisión bajo las condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítem idénticos de análisis en condiciones diferentes ya sea de laboratorio, diferentes operadores, usando distintos equipos, entre otros. Para determinar la precisión de la reproducibilidad intralaboratorio ( $R_i$ ) (es decir, la precisión dentro de un laboratorio), se sugiere realizar 3 mediciones de un Material de Referencia (MRC o material control) el comportamiento de la curva de calibración en 3 días distintos. También, se puede determinar registrando a lo menos 10 mediciones en días distintos, o en un mismo día cambiando a lo menos una condición analítica. Calcular la desviación estándar ( $S_{R_i}$ ) y el porcentaje de coeficiente de variación ( $CV_{R_i}\%$ ).

En general, el más importante es la reproducibilidad intralaboratorio, pues permite asegurar que los resultados obtenidos serán fiables en cualquiera de las posibles situaciones rutinarias. (Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos - Seimc)

**6.3 Aplicabilidad:** Se utiliza el término de aplicabilidad, cuando un método de análisis puede utilizarse satisfactoriamente para los analitos, matrices y concentraciones previstas. La declaración de aplicabilidad (o ámbito de aplicación), además de una declaración del margen de funcionamiento satisfactorio para cada factor, puede incluir también advertencias acerca de la interferencia conocida de otros analitos, o de la inaplicabilidad a determinadas matrices y situaciones.

En este sentido, la prueba de aplicabilidad, consiste en el ámbito de aplicación del método declarado por el responsable de la validación, una vez concluida esta.

## **7) Particularidades de los métodos Microbiológicos:**

El proceso analítico microbiológico obliga a tener en cuenta una serie de características propias de los métodos microbiológicos que van a influir en su forma de validación, así como en el resultado final obtenido. A diferencia de las ciencias físicas y químicas, en Microbiología se trabaja con microorganismos que se multiplican por división binaria y crecen exponencialmente.

Además, el número de colonias observadas es solamente una aproximación del número de partículas vivas, y la viabilidad se define como crecimiento por el propio método, que dependerá del medio de cultivo empleado, tiempo y temperatura de incubación. Hay falta de referencias comunes internacionales y en consecuencia la tasa de recuperación absoluta no puede ser definida y la trazabilidad es imposible, presentándose los recuentos obtenidos como recuperaciones relativas.

Los métodos microbiológicos son poco robustos, dado que los analitos son seres vivos en ocasiones con comportamientos impredecibles. Las muestras por su naturaleza pueden sufrir cambios debidos al estrés de incubación, calidad de los componentes de los sustratos, la microbiota acompañante y el entrenamiento de los técnicos pueden producir problemas de robustez. La presencia de otros microorganismos puede modificar los resultados obtenidos referidos a un tipo de microorganismo en particular debido a competencia por los nutrientes, el enmascaramiento del crecimiento del microorganismo, un comportamiento similar para la prueba efectuada, o la liberación de compuestos que inhiben el crecimiento del microorganismo. Los recuentos microbiológicos son variables aleatorias discretas que no siguen una distribución normal o Gaussiana. La variación aleatoria básica se puede explicar por la distribución de Poisson, aunque imperfecciones técnicas y otras muchas causas dan lugar a una variación adicional o sobre dispersión que apoya a la distribución binomial negativa como el modelo de sobre dispersión en Microbiología. Por todo es necesario realizar una pequeña revisión de algunos conceptos generales que nos permitan abordar la validación partiendo de una única base común. En particular materiales y cepas de referencia.

## 8) Materiales y cepas de referencia:

Se define como material de referencia al "material o sustancia de la que uno o más de los valores cuyas propiedades son suficientemente homogéneos y claramente establecidos como para poder ser utilizados en la calibración de un aparato, la valoración de un método de medición o la asignación de valores a materiales". (Guía ISO 30:1992, Términos y definiciones utilizados en relación con los materiales de referencia).

Se define como **material de referencia certificado** al material de referencia, acompañado de un certificado, en el que uno o más de los valores de sus propiedades han sido certificados mediante un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de dichas propiedades. Cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre a un nivel establecido de confianza".

## 9) Características de las bacterias Anaerobias Sulfito-Reductoras:

Los anaerobios sulfito-reductores constituyen un grupo bacteriano asociado principalmente al género *Clostridium*. La clasificación taxonómica según el Comité Internacional de Sistemática de Procariotas (ICSP), ubica a los *Clostridium* en el Phylum Firmicutes, Clase Clostridia, Orden Clostridiales, familia Clostridiaceae.

Las bacterias del género *Clostridium* son ubicuas en el medio ambiente y sus esporas se encuentran habitualmente en el suelo, polvo, sedimentos, medio acuático, vegetación en descomposición y en el tracto digestivo de los animales, incluido el hombre. En consecuencia, pueden transmitirse a una amplia gama de alimentos, tanto crudos, como parcialmente tratados tales como: las carnes curadas (principalmente embutidos), conservas, fermentados, ahumados, productos envasados al vacío, semiconservas vegetales y las especias. Debido a las características que poseen los *clostridium* se suelen usar como indicadores de la calidad higiénica del agua y de los alimentos.

Actualmente, en la Lista de nombres procariotas del Manual de Bergey (LPSN), "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature" año 2014-1 se citan 203 especies y 5 subespecies del género *Clostridium* de las cuales, cerca de 30 especies son potencialmente patógenos para el hombre.

Las especies del género *Clostridium* comúnmente asociadas a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son: *Clostridium botulinum*, cuya toxina afecta al sistema nervioso, causando la toxiinfección llamada botulismo y *Clostridium perfringens* cuya enterotoxina afecta al sistema digestivo.

Se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos y formadores de esporas que tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados, dando lugar a colonias negras. Generalmente, las células vegetativas tienen forma de bacilos pudiendo variar desde bacilos cocoides cortos a largos bacilos filamentosos. Pueden aparecer sueltos, en parejas o en cadenas.

La mayoría son móviles por flagelos peritricos, (con la excepción de *C. perfringens*) son de tamaño variable midiendo 0.3 – 2.0  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1.5 - 20  $\mu\text{m}$  de longitud. Las esporas pueden ser central, sub terminal y terminal y son resistentes al calor. Son Gram positivos en cultivos jóvenes pero se decoloran en los envejecidos.

Crecen a temperatura de 37°C, la actividad acuosa ( $a_w$ ) mínima para su desarrollo es 0.95 (1) y a un pH entre 7 y 7.4, de modo que son fácilmente inactivadas a pH ácido o básico, como el ácido estomacal, el de limpiadores y desinfectantes como el cloro e incluso el pH de ácidos orgánicos.

Las bacterias pertenecientes al género no tienen un sistema cito cromo completo y por lo tanto son oxidasa negativa. La mayoría de las cepas son catalasa y superóxidodismutasa negativa, aunque se han reportado pequeñas cantidades de actividad para algunas especies. *Clostridium spp.* tienen diversas vías metabólicas y pueden ser sacarolíticos, proteolíticos, ambos o ninguno. Los productos finales del metabolismo fermentativo son mezclas de ácidos y alcoholes, una característica que se puede utilizar para fines de identificación en el laboratorio. Las exotoxinas extracelulares y enzimas producidas por bacterias pertenecientes al género son los principales factores de virulencia, produciendo una gran diversidad de toxinas que cualquier otro género de bacterias (Manual de Análisis Microbiológico de los Alimentos ANMAT - RENALOA).

La amplia variedad en el contenido de guanina y citosina del ADN (% de G+C) de las especies del género *Clostridium* sugiere que éste podría dividirse al menos en dos géneros: las especies con un contenido en G+C del 22 % al 34 % y aquellas que tienen de 40 % a 55 %.

## 10) Recuento de microorganismos:

Es la determinación del número de microorganismos presentes en una determinada sustancia o muestra por unidad de volumen o peso. Se distinguen dos modalidades de determinación, recuento de microorganismos viables o recuento de microorganismos totales (viables y no viables) (Manual de fundamentos, 2016). Hay diferentes tipos de recuento de microorganismos entre ellos: recuento en placa, conteo por filtración, método del número más probable, etc.

### **10.1 Recuento en placa:**

Este método permite determinar el número de colonias vivas en el medio de cultivo en placa. El número de colonias observadas es solamente una aproximación del número de partículas vivas, y la viabilidad se define como crecimiento por el propio método, que dependerá del medio de cultivo empleado, tiempo y temperatura de incubación. En base a que las colonias se originan de una o varias células para expresar resultados se utiliza el término Unidades Formadoras de Colonias (UFC). Para que todas las células que estén en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que la incertidumbre del método sea menor, existe un rango de recuento óptimo que se da cuando se desarrollan entre 25 a 250 colonias por placa para bacterias y levaduras.

#### Métodos, ventajas y desventajas de los métodos de siembra:

**Siembra incorporada:** En este método se deposita 1mL de la dilución en placa estéril, vacía y posteriormente se agrega a cada placa el medio de cultivo a emplear, previamente fundido y termostatzado a 45°C en baño. Las ventajas de este método son que utiliza mayor cantidad de muestra, tiene menor error, mejor aprovechamiento de los nutrientes del medio y como desventaja dificultades al sub cultivar colonias, la temperatura del agar puede afectar la viabilidad de algunos microorganismos, se desarrollan microorganismos anaerobios y microaerofilicos.

**Siembra en superficie:** Para este método se deposita 0.1mL de cada dilución en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo. Las desventajas son que se siembra menor cantidad de muestra, tiene mayor error, peor aprovechamiento de los nutrientes del medio y las ventajas facilidad para sub cultivar colonias, fácil visualización de colonias, no se afectan los microorganismos termosensibles, solo crecen aerobios o anaerobios facultativos. (Guía de práctico - cátedra de microbiología de facultad de química, pag. 36)

## **11) Objetivos:**

### **11.1 Objetivo general:**

El presente trabajo tiene como objetivo la validación de la técnica para realizar el recuento en placa de clostridios sulfito-reductores en muestras cárnicas y condimentos, basada en la ISO 15213 y llevada a cabo en el Departamento de Microbiología del LATU.

### **11.2 Objetivo específico:**

Trabajar con cepas de referencias para lograr estandarizar una suspensión de inoculación.

Validar la metodología de recuento de clostridios sulfitos-reductores en el laboratorio cumpliendo con lo establecido en el ISO 17025 para las matrices usualmente analizadas.

Establecer protocolos para matrices cárnicas y condimentos.

Comparar dos medios de cultivos de distintos proveedores.

## **12) Rol de mi participación:**

Para llevar a cabo la validación de esta técnica se buscó información sobre el microorganismo y el método utilizado, se estudiaron las normas ISO 15213 y 17025, también se escogieron y estudiaron los diferentes parámetros.

Se escogieron las diferentes matrices a analizar y se definieron las diluciones, se verificaron a diario los diferentes equipos a utilizar (balanzas, pipetas, estufa) y se realizó el método teniendo en cuenta las modificaciones realizadas por los analistas en el laboratorio.

Se llevó a cabo la técnica para cada una de las matrices y se analizaron los resultados obtenidos, para verificar con fines estadísticos si el método es adecuado para las mismas.

Se realizó un protocolo donde se detalló cómo se debe realizar correctamente la técnica.

Se realizó el método con el medio ISA (Oxoid) utilizado actualmente y con ISA (Liofilichem S.R.L) para comprar los resultados y poder el laboratorio evaluar el cambio de proveedor.

### **13) Incorporación de nuevas actividades a las propuestas inicialmente:**

Se incorporó la elaboración de un protocolo en donde se describe de manera adecuada como se debe realizar la técnica, se detallan cuales son los pasos que se deben realizar, como realizarlos y las precauciones a tener en cuenta para evitar posibles inconvenientes.

Se le solicitó a otro analista que leyera dicho documento para confirmar que se pudiera interpretar claramente.

También se incorporó la realización del método utilizando medios ISA marca (Liofilchem S.R.L) para comparar con el comportamiento del método utilizando el medio ISA (Oxoid) utilizado actualmente por el laboratorio. El fin de comparar ambos medios es verificar si el medio (Liofilchem) se comportaba adecuadamente para poder cambiar el proveedor, ya que este le es más rentable al laboratorio.

### **14) Matrices:**

Se validará la técnica de recuento en condimentos (canela, ají triturado, orégano, estragón) y productos cárnicos procesados (jamón crudo y jamón cocido). Estas matrices son las comúnmente analizadas para estos parámetros y con criterios microbiológicos claros establecidos en el reglamento bromatológico.

Límites establecidos por el Reglamento Bromatológico Nacional para condimentos capítulo 23 sección 2 y para productos cárnicos procesados capítulo 13 sección 3.

Condimentos:

N=5, c=2, m=100 y M=1000

Chacinados (Jamón crudo y cocido):

N=5, c=1, m=100 y M=500

**15) Plan de trabajo:**

ACTIVIDADES	SEMANAS															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Búsqueda y organización de información	■															
Puesta a punto de los equipos y preparación de medios de cultivo	■	■														
Ajuste de la cepa de referencia		■	■	■	■											
Realizar la técnica con diferentes matrices y evaluar su desempeño					■	■	■	■	■	■	■	■	■			
Preparación del protocolo, realización del método con medio ISA marca Liofilichem y análisis de los resultados												■	■	■		
Realización del informe final														■	■	■

## 16) Actividades realizadas:

### 16.1 Medios de cultivo, reactivos, materiales:

- Cepa de referencia de *C.perfingens* ATCC13124 (Deltalab)
- Caldo Tioglicolato (Oxoid)
- Agua fosfatada (AF)
- Iron sulfite agar (ISA), (Oxoid) Lote 2341532 6/2021
- Yeast Extract (YE), (Oxoid)
- Pipetas de 1 mL graduadas en intervalos de 0.1mL y de 10 mL con una incertidumbre de medición  $\pm 5 \%$ .
- Ansas estériles
- Tubos de ensayo estériles y no estériles, frascos de capacidad apropiada, bolsas de plásticos estériles de capacidad 500 mL
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm
- Jarras de anaerobiosis

### 16.2 Equipos:

- Autoclaves para esterilización
- Estufa de incubación:  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua a  $44^{\circ}\text{C} - 47^{\circ}\text{C}$
- Peachímetro (JENWAY 3510 pH Meter) de exactitud  $0.01$  a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Balanza
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)

- Anoxomat (MART Microbiology B.V, Mark II) equipo para generación de atmósfera anaeróbica.

## 17) Procedimiento:

En el transcurso de la pasantía se realizó búsqueda bibliográfica sobre el tema a desarrollar.

Se verificó a diario la temperatura de la estufa a 37°C, se verificó la calibración de la balanza donde se pesó posteriormente medios de cultivo y las matrices a analizar y se verificaron las pipetas automáticas.

### **17.1 Preparación de medios de cultivo, soluciones y pruebas de esterilidad:**

Se prepararon 30 tubos de 9mL de Tioglicolato donde se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante luego se llevaron a la autoclave (121°C durante 15 minutos).

Los tubos ya esterilizados se almacenaron en cámara a 4.8°C, uno de los tubos fue incubado en estufa 37 °C durante 48hs para confirmar ausencia de crecimiento de cualquier microorganismo.

#### **Preparación del Agua fosfatada (AF):**

**Preparación de NaOH 1N:** Se pesó 4g NaOH caustica en 100mL de agua destilada, se agitó hasta solución homogénea.

**Solución buffer:** En un matraz aforado de 100mL se disolvió 3.4g de fosfato monopotásico en 50mL de agua destilada, se agitó la mezcla hasta homogeneidad, se ajustó el ph de la solución hasta 7.2+-0.1 con NaOH 1N se enrazó el matraz con agua destilada, se trasvasó a un recipiente adecuado para poder autoclavar.

Se preparó 100 frascos de 99mL de AF, donde a 10L de agua destilada se le adicionó 12.5 ml de solución buffer y se autoclavó.

A uno de los frascos se le realizó control de ph este valor se encuentra en la tabla N°16 en el anexo y otro frasco es utilizado para control de esterilidad, se hizo pasar los 99mL por un filtro de membrana con tamaño de poro 0.2µ y se colocó el filtro en una placa de Plate Count Agar y se incubó a 35°C durante 48hs.

El medio ISA se preparó con doble concentración y se pesaron 23g del medio (Oxoid) y 2.5g de YE (Oxoid) en 500 mL de agua destilada se autoclavó y posteriormente se llevó a baño de agua a 44°C. El medio de cultivo se preparó de esta forma para cumplir con la descripción del medio de la Norma. A su vez el medio se preparó el mismo día que se utilizó se hicieron 18 lotes y se les realizó control de esterilidad y se le midió el pH a cada lote, los valores se adjuntan en la tabla N°16 que se encuentra en el anexo.

El control de esterilidad se realizó colocando 25ml de ISA<sup>2</sup> en placa de Petri estéril y se incubó en anaerobiosis a 37°C durante 48hs.

El control de pH se realizó colocando en un vaso de bohemia 20ml de ISA<sup>2</sup> y luego de que el medio solidificó se midió el pH con peachimetro que contiene un electrodo para medir el pH a agares.

## **17.2 Estimación de la población bacteriana presente en el inóculo secundario de un cultivo de *C. perfringens*:**

El siguiente procedimiento se realizó para dos cepas de *C. perfringens* (Deltalab) iguales ATCC13124 (LPR017 y LPR037), LPR017 y LPR037 es la forma de registrar e identificar las diferentes cepas de referencias que tiene en stock el laboratorio. Se realizó con ambas cepas porque una de ellas nunca se había utilizado y se quería comparar que ambas se comportaran de similares maneras y dejar registrado en el laboratorio que están aptas para ser utilizadas,

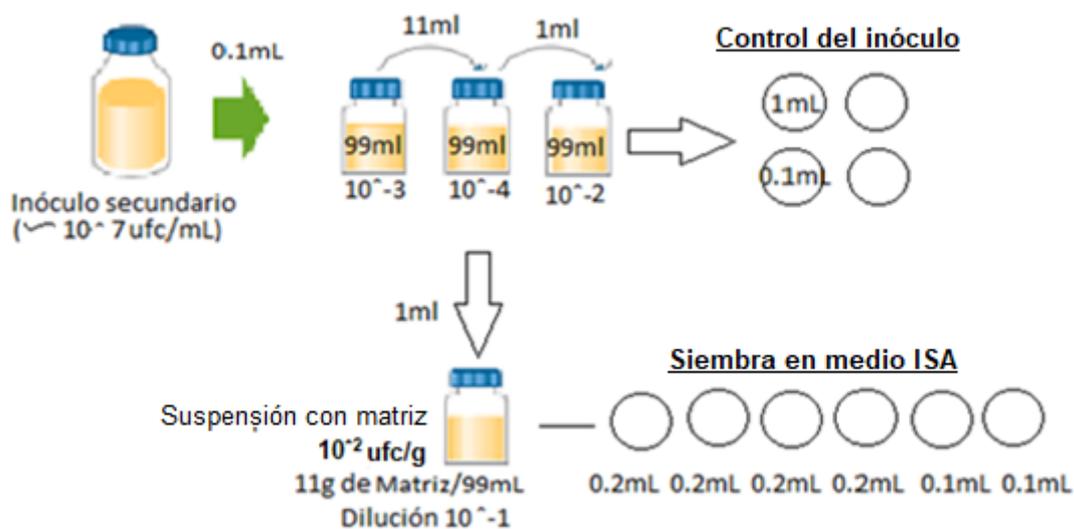
Se colocó una crioperla de cada una de las cepas de *C. perfringens* en tubo de Tioglicolato y se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48hs. (Inóculos primarios). La atmosfera anaerobia 0% O<sub>2</sub> se generó con el equipo Anoxomat, el mismo utilizó la siguiente mezcla de gases 10.0% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 85.0% N<sub>2</sub>.

A partir de los cultivos primarios (los cuales se conservaron en anaerobiosis en cámara refrigeradas a 6.7°C). Se prepararon cultivos frescos (colocando 1mL de cada inóculo primario en un nuevo tubo con 9mL de tioglicolato y se incubaron en anaerobiosis a 37°C durante 48hs) (inóculos secundarios). A partir de estos se realizaron las diferentes diluciones seriadas -5, -6, -8 y -9 en

agua fosfatada y por último se sembró de manera incorporada 1mL en placa de Petri por duplicado de cada dilución que se estimaba era contable y se colocó el medio ISA<sup>2</sup>. También se sembraron 0.1ml de las mismas diluciones para prever en caso de que la carga microbiana fuese alta.

**17.3 Análisis de linealidad en CONDIMENTOS:** Se evaluaron los condimentos orégano, estragón, canela y ají triturado. Para las matrices de orégano y estragón se inocularon tres concentraciones distintas de *C.perfringens* ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^5$ ) células/g de matriz. Para las matrices canela y ají triturado se realizaron los mismos procedimientos que en la figura N°4 y N°6.

Para la preparación de los inóculos, los procedimientos realizados se pueden observar esquematizados en las figuras N°4, N°5 y N°6.



**Figura N°4: Esquema de inoculación de *C.perfringens* en condimentos a una concentración de  $10^2$  células/g.**

Se partió de un inóculo secundario de *C.perfringens* del cual se tomó 0.1ml y se llevo a 99ml de AF obteniendo la dilución  $10^{-3}$ , de esta dilución se tomó 11ml y se colocó en 99ml de AF, dilución  $10^{-4}$ .

En paralelo se preparó la suspensión con matriz por duplicado. Se pesó 11 g de la matriz con una incertidumbre de medición  $\pm 5 \%$  y se la colocó en una bolsa de plástico con filtro estéril, se agregó una cantidad de diluyente AF igual a 99 ml (dilución  $10^{-1}$ ) y se homogeneizó durante 1 minuto en estomacher. Para evitar daños de los microorganismos por cambios bruscos de temperatura el diluyente AF se almacenó a temperatura ambiente.

Se transfirió con una pipeta 1 ml de la dilución  $10^{-4}$  a la suspensión con matriz. Para una óptima precisión no se introdujo la pipeta más de 1 cm en la suspensión con matriz y se evitó el contacto entre la pipeta que contenía el inóculo y el diluyente estéril. Se mezcló con movimientos circulares en ambos sentidos durante 5 a 10 segundos para lograr una distribución de los microorganismos en todo el volumen.

Se tuvo la precaución de que el tiempo transcurrido entre el final de la preparación de la suspensión con matriz y el instante en que el inóculo entra en contacto con el medio de cultivo no superara los 30 minutos.

Debido al ennegrecimiento generado en el medio de cultivo por *C.perfringens* en este tipo de matrices que dificulta la lectura de las placas, se decidió sembrar 1ml dividido en 6 placas, a 4 placas se le sembró 0.2mL y a 2 se le sembró 0.1mL, de esta manera se obtuvieron recuentos con menor incertidumbre y en caso de que la carga fuera alta la lectura de cada placa con 0.1mL correspondería a 1mL de la dilución menor. Se adjunta la (figura N°21 anexo) se puede observar el ennegrecimiento que se da para este tipo de matrices inclusive cuando hay poco crecimiento de colonias.

Seguidamente se vertió en cada placa de Petri aproximadamente 15 ml de medio de cultivo ISA<sup>2</sup> el cual fue termostatzado a 44°C - 47°C en un baño de agua. El tiempo transcurrido entre la inoculación de las placas de Petri y la adición del medio de cultivo no excedió los 15 minutos. Se mezcló cuidadosamente el inóculo con el medio por movimientos horizontales y se esperó que el medio solidifique. A continuación, se vertió de 5 ml a 10 ml del mismo medio en la placa, la doble capa se colocó para mejorar las condiciones de anaerobiosis.

Después que solidificó el medio se incubaron las placas de Petri invertidas en anaerobiosis a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 48 h, la atmosfera se generó con el Anoxomat.

En cada figura también se detalló las diluciones que se le realizó al inóculo secundario para obtener recuentos contables de referencia sin posibles interferencias generadas por las matrices, estos valores se encuentran en las diferentes tablas de cada matriz donde están los valores de referencia (Tablas N° 4, 6, 8 y 10).

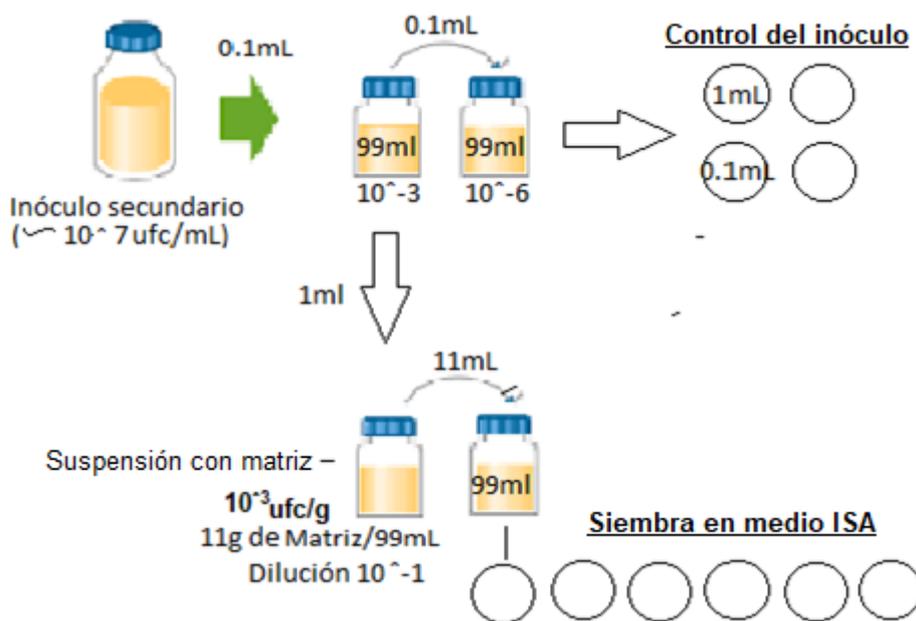


Figura N°5: Esquema de inoculación de *C. perfringens* a una concentración de  $10^3$  células/g.

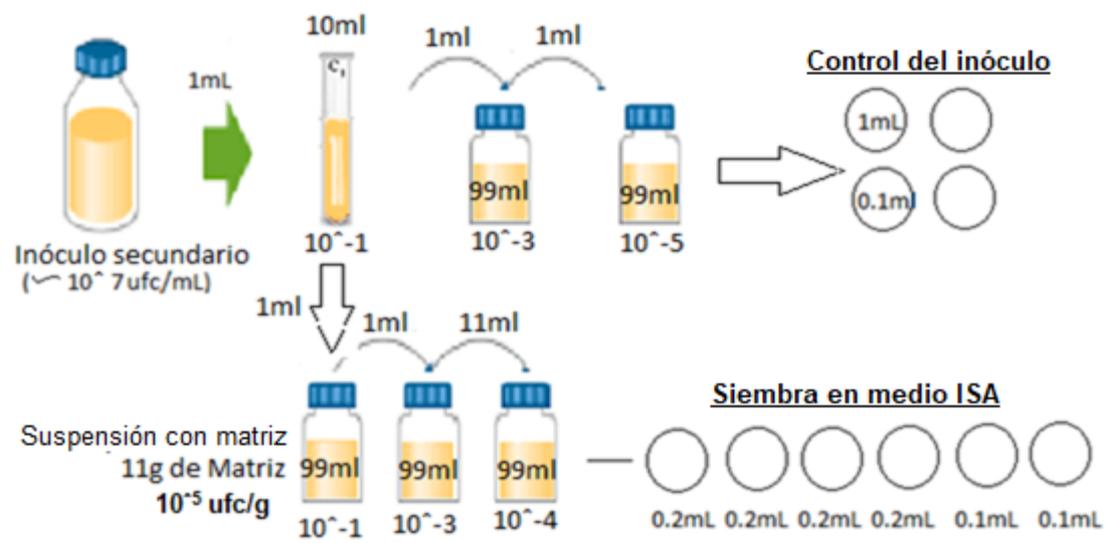
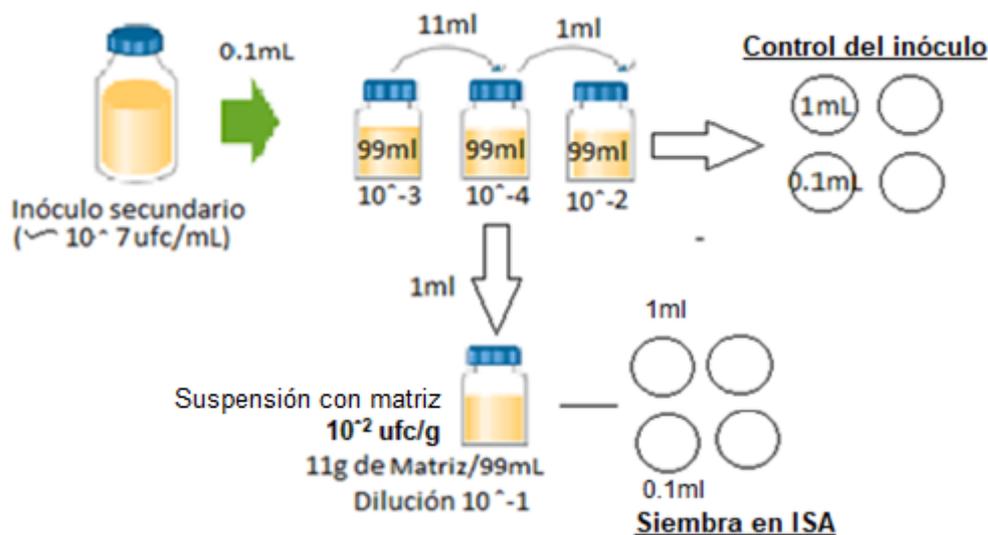


Figura N°6: Esquema de inoculación de *C. perfringens* a una concentración de  $10^5$  células/g

**17.4 Análisis de la linealidad en matrices cárnicas:** Para las matrices cárnicas se analizaron el jamón crudo y jamón cocido, también se inocularon tres concentraciones distintas de *C.perfringens* ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) células/g de matriz, las cuales se pueden observar esquematizado en la figura N°7, N°8 y N° 9.



**Figura N°7: Esquema de inoculación de *C.perfringens* en matrices cárnicas a una concentración de  $10^{-2}$  células/g**

El procedimiento es idéntico al explicado en la figura N°4, pero como en este tipo de matrices no se produce tanto ennegrecimiento de la placa se puede observar en los tres esquemas que se siembra 1ml por placa y por duplicado, también se sembró 0.1ml por duplicado por si la carga microbiana era alta. En el anexo se adjunta la figura N°22 donde se puede observar que para este tipo de matrices no se genera tanto ennegrecimiento del medio de cultivo.

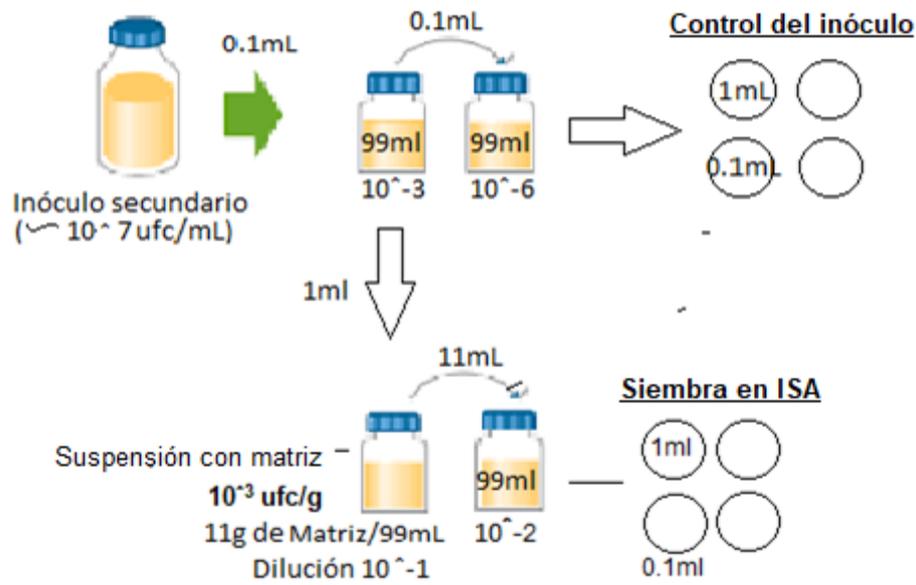


Figura N°8: Esquema de inoculación de *C.perfringens* a una concentración de  $10^3$  células/g

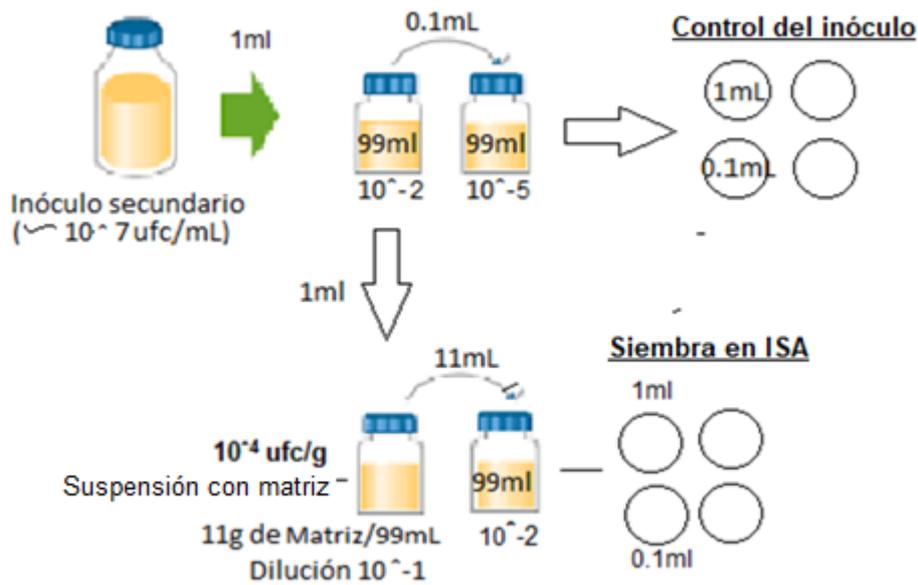


Figura N°9: Esquema de inoculación de *C.perfringens* a una concentración de  $10^4$  células/g.

Análisis de datos: Para la evaluación del parámetro linealidad se construyó una curva donde se graficó tres niveles de concentración para cada matriz menos la de jamón crudo que por falta de muestra no se pudo realizar el tercer nivel de concentración, por este motivo se incluyó en el gráfico el cero teórico. En microbiología el cero en la placa no representa la ausencia de dicho microorganismo en la muestra, por este motivo le llamamos cero teórico y se incluyó en el gráfico para que el mismo este compuesto por tres puntos.

Se promedió los valores de las dos replicas realizadas para cada nivel de concentración y se graficó el logaritmo de dichos promedios versus el promedio del logaritmo UFC/g del valor del inóculo.

Precisión: Para la evaluación de la precisión se tuvo la precaución de realizar dos replicas cada una por duplicado, estos duplicados se realizaron de manera idéntica (misma balanza, pipetas, operador, día, etc) donde se evaluó la repetibilidad y para la otra replica se tuvo la precaución de variar el analista, las pipetas y el lote de medio al realizar el método con estas variaciones evaluamos la reproducibilidad de los resultados.

Como la Norma ISO 15213 para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad no establece ningún valor de referencia, se buscó en normas similares posibles valores en cuales basarnos para la aceptabilidad o rechazo de dichos parámetros.

Los valores teóricos de referencias utilizados fueron  $r=0.25$ ;  $R= 0.45$  (ISO 4833-1:2013) y  $r=0.21$ ;  $R=0.29$  y para productos cárnicos  $R=0.55$  (ISO 7937:2004)

Nos basamos en la norma ISO 4833-1:2013 porque el método de recuento en placa utilizado es por incorporada al igual que en la norma ISO 15213 y en la norma ISO 7937:2004 porque analiza *C. perfringens*.

Los cálculos para determina  $r$  y  $R$  se realizaron de la siguiente manera:

$$r = \text{Duplicado1 (log R1 (ufc/g))} - \text{Duplicado 2 (log R1 (ufc/g))}$$

$$R = (\text{Mayor } r \text{ de Replica 1}) - (\text{Menor } r \text{ de Replica 2})$$

## 18) Comparación de dos marcas comerciales de medio de cultivo ISA (Oxoid) y (Liofilchem S.R.L)

CM0079 ISA (Oxoid)

- Tryptone 10.0g, Sodium sulphite 0.5g, Iron (III) citrate 0.5g y Agar 12g.

ISA (Liofilchem S.R.L)

- Enzymatic digest of casein 10.0g, Sodium sulphite 0.5g, Ferric citrate 0.5g y Agar 15g.

Se preparó un litro de cada uno de los medios de cultivo siguiendo las indicaciones del fabricante. Se procedió realizando un nivel de concentración de la matriz orégano y jamón cocido, se preparó únicamente un nivel de concentración porque no se disponía de más de 100g del medio Liofilchem, ya que era una muestra de prueba.

Se realizó el seguimiento del método para confirmar la presencia de clostridios sulfito-reductores con ambos medios.

A continuación, las colonias obtenidas fueron repicadas a medio ISA<sup>2</sup> en aerobiosis y se incubó por 48 hs a 37°C, si crecen colonias en aerobiosis podemos descartar que sea clostridios-sulfito reductores.

Se confirmó producción de H<sub>2</sub>S por pinchadura en tubo de ISA<sup>2</sup> (con tapón de ISA) y se incubó en anaerobiosis por 48 hs a 37°C.

Se confirmó a partir de las colonias en cultivo puro en ISA<sup>2</sup> la producción de esporas por tinción, se tiñó con cristal violeta.

## 19) Resultados:

### 19.1 Cuantificación de un inóculo secundario de *C. perfringens*, utilizando dos accesiones diferentes que tiene en stock el laboratorio.

Los diferentes recuentos que se obtuvieron se encuentran detallados en la Tabla N°2, se decidió continuar la validación utilizando la cepas de referencias LPR017 ya que no hubo grandes diferencias entre los recuentos obtenidos de ambas.

**TABLA 2:** Recuentos obtenidos de inóculos secundarios de *C. perfringens* cepa a) LPR017 y b) LPR037.

a)

Recuento de <i>C. perfringens</i> LPR017	
Replicas	UFC/ml
1	Menor $1 \times 10^9$
2	Estimado $1 \times 10^7$
3	Estimado $2,3 \times 10^7$
4	Estimado $2,5 \times 10^7$
5	$3,9 \times 10^7$
6	$4,4 \times 10^7$
7	Estimado $1,3 \times 10^7$
8	Estimado $4 \times 10^6$
9	$>2,5 \times 10^7$

b)

Recuento de <i>C. perfringens</i> LPR037	
Replicas	UFC/ml
1	Menor $1 \times 10^9$
2	Estimado $4,5 \times 10^7$
3	Estimado $2,2 \times 10^8$
4	Estimado $2 \times 10^7$
5	Estimado $2,1 \times 10^7$
6	$6,3 \times 10^7$
7	Estimado $2,4 \times 10^7$
8	Estimado $1,2 \times 10^7$
9	$>2,5 \times 10^7$

En la tabla 2 se encuentran detallados los valores obtenidos de los recuentos realizados para las dos cepas de *Clostridium perfringens* ATCC13124, en las filas se pueden observar las distintas réplicas realizadas, para las mismas el volumen sembrado fue de 1mLy se realizaron en días distintos.

## 19.2 Parámetros de validación

### 19.2.1 Linealidad:

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos al inocular la matriz de orégano con las distintas concentraciones de *C.perfringens*. Para cada réplica, se reportan las UFC recuperadas por placa y se muestra también los resultados de la suma de las placas sembradas, correspondiente a 1mL de la dilución sembrada. En la tabla 4 se muestra los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio. Finalmente en la figura 10 se grafican los recuentos obtenidos para las tres diluciones inoculadas en la matriz orégano. El  $R^2$  obtenido fue de 0.9853.

**Tabla N°3:** Valores de ufc recuperados por placa al inocular la matriz de Orégano con las distintas concentraciones de *C.perfringens*.

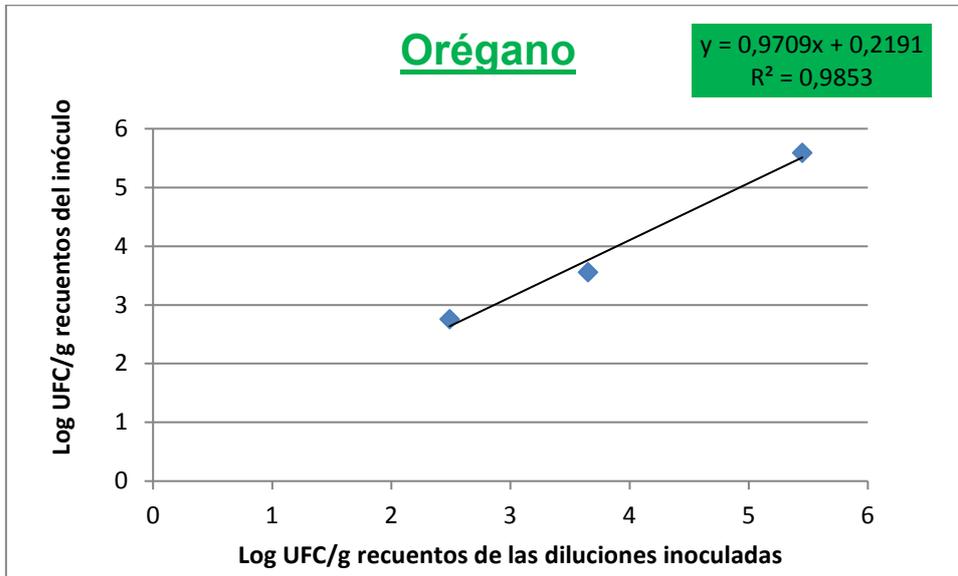
Matriz Orégano					
Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g					
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g	Log UFC/g
R1	11,03	0,2	15	$7,5 \times 10^2$	2,88
		0,2	10	$5,0 \times 10^2$	2,70
		0,2	13	$6,5 \times 10^2$	2,81
		0,2	12	$6,0 \times 10^2$	2,78
		0,1	6	$6,0 \times 10^2$	2,78
		0,1	4	$4,0 \times 10^2$	2,60
		1ml	60	$6,0 \times 10^2$	2,78
R2	10,77	0,2	12	$6,0 \times 10^2$	2,78
		0,2	9	$4,5 \times 10^2$	2,65
		0,2	11	$5,5 \times 10^2$	2,74
		0,2	13	$6,5 \times 10^2$	2,81
		0,1	7	$7,0 \times 10^2$	2,85
		0,1	4	$4,0 \times 10^2$	2,6
		1ml	56	$5,6 \times 10^2$	2,75
Promedio de log UFC/g		1ml			2,76
Nivel de concentración inoculado $10^3$ células/g					
R1	11,14	0,2	10	$5,0 \times 10^3$	3,70
		0,2	12	$6,0 \times 10^3$	3,78
		0,2	8	$4,0 \times 10^3$	3,60
		0,2	7	$3,5 \times 10^3$	3,54
		0,1	5	$5,0 \times 10^3$	3,70

		0,1	1	$1,0 \times 10^3$	3,00
		1ml	43	$4,3 \times 10^3$	3,63
R2	11,00	0,2	4	$2,0 \times 10^3$	3,30
		0,2	6	$3,0 \times 10^3$	3,48
		0,2	7	$3,5 \times 10^3$	3,54
		0,2	10	$5,0 \times 10^3$	3,70
		0,1	2	$2,0 \times 10^3$	3,30
		0,1	1	$1,0 \times 10^3$	3,00
		1ml	30	$3,0 \times 10^3$	3,48
Promedio de log ufc/g		1ml			3,56
Nivel de concentración $10^5$ células/g					
R1	11,05	0,2	14	$7,0 \times 10^5$	5,85
		0,2	11	$5,5 \times 10^5$	5,74
		0,2	8	$4,0 \times 10^5$	5,60
		0,2	9	$4,5 \times 10^5$	5,65
		0,1	6	$6,0 \times 10^5$	5,78
		0,1	6	$6,0 \times 10^5$	5,78
		1ml	54	$5,4 \times 10^5$	5,73
R2	11,15	0,2	10	$5,0 \times 10^5$	5,70
		0,2	5	$2,5 \times 10^5$	5,40
		0,2	Toda negra		
		0,2	11	$5,5 \times 10^5$	5,74
		0,1	2	$2,0 \times 10^5$	5,30
		0,1	0	$<1,0 \times 10^5$	
		1ml	28	$2,8 \times 10^5$	5,45
Promedio de log ufc/g		1ml			5,59

**Tabla N°4:** Valores del recuento del inóculo agregado a la suspensión inicial de Orégano.

Control del inóculo			
Nivel de concentración $10^2$ UFC/g			
Control de inóculo UFC/placa	Células inoculadas en gramos de matriz	Log UFC/g	Promedio
37	$3,4 \times 10^2$	2,53	2,49
30	$2,7 \times 10^2$	2,44	
Nivel de concentración $10^3$ UFC/g			

66	$6,0 \times 10^3$	3,78	3,65
33	$3,0 \times 10^3$	3,48	
Nivel de concentración $10^5$ UFC/g			
28	$2,5 \times 10^5$	5,40	5,45
36	$3,3 \times 10^5$	5,51	



**Figura N°10:** Gráfico de linealidad de la matriz orégano, se grafican los recuentos obtenidos de las tres concentraciones inoculadas vs los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio.

En la tabla 5 se muestran los valores de UFC recuperados por placa al inocular la matriz de estragón con las distintas concentraciones de *C.perfringens*. También se encuentran los resultados correspondientes a 1 mL de la dilución sembrada. En la tabla 6 se muestra los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio. En la figura 11 se grafican los recuentos obtenidos para la matriz estragón. El  $R^2$  obtenido fue de 0.993.

**Tabla N°5:** Valores de UFC recuperados por placas al inocular la matriz de estragón con las distintas concentraciones de *C.perfringens*.

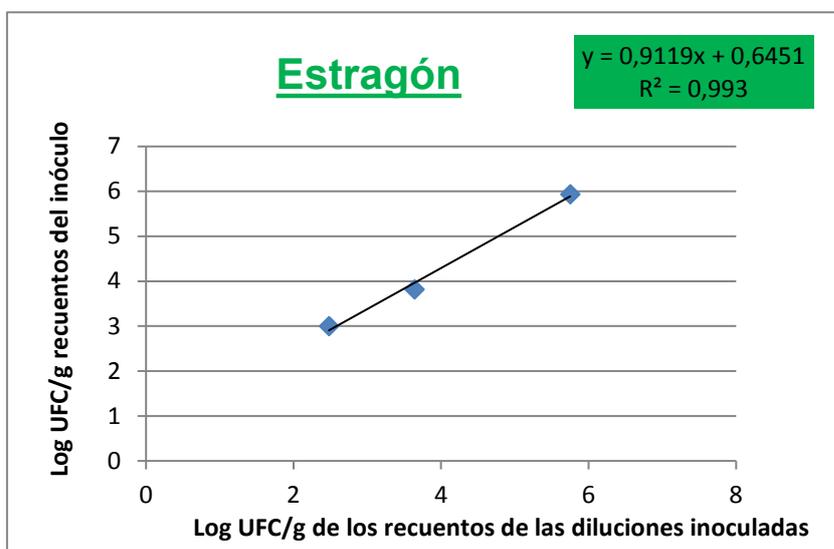
Matriz Estragón					
Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g					
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g	Log UFC/g
R1	11,14	0,2	20	$1,0 \times 10^3$	3,00
		0,2	19	$9,5 \times 10^2$	2,98
		0,2	22	$1,1 \times 10^3$	3,04
		0,2	23	$1,2 \times 10^3$	3,06
		0,1	Todo negro		
		0,1	14	$1,4 \times 10^3$	3,15
		1ml			
R2		0,2	19	$9,5 \times 10^2$	2,98
		0,2	18	$9,0 \times 10^2$	2,95
		0,2	22	$1,1 \times 10^3$	3,04
		0,2	20	$1,0 \times 10^3$	3,00
		0,1	12	$1,2 \times 10^3$	3,08
		0,1	11	$1,1 \times 10^3$	3,04
		1ml	102	$1,0 \times 10^3$	3,00
Promedio de log ufc/g					3,00
Nivel de concentración inoculado $10^3$ células/g					
R1	11,04	0,2	10	$5,0 \times 10^3$	3,70
		0,2	17	$8,5 \times 10^3$	3,93
		0,2	11	$5,5 \times 10^3$	3,74
		0,2	17	$8,5 \times 10^3$	3,93
		0,1	6	$6,0 \times 10^3$	3,78
		0,1	10	$1,0 \times 10^4$	4,0
		1ml	71	$7,1 \times 10^3$	3,85
R2	11,22	0,2	13	$6,5 \times 10^3$	3,81
		0,2	15	$7,5 \times 10^3$	3,88
		0,2	10	$5,0 \times 10^3$	3,70
		0,2	11	$5,5 \times 10^3$	3,74

		0,1	8	$8,0 \times 10^3$	3,90
		0,1	5	$5,0 \times 10^3$	3,70
		1ml	62	$6,2 \times 10^3$	3,79
Promedio de log UFC/g					3,82
Nivel de concentración inoculado $10^5$ células/g					
R1	11,13	0,2	21	$1,1 \times 10^6$	6,02
		0,2	19	$9,5 \times 10^5$	5,98
		0,2	20	$1,0 \times 10^6$	6,00
		0,2	16	$8,0 \times 10^5$	5,90
		0,1	8	$8,0 \times 10^5$	5,90
		0,1	8	$8,0 \times 10^5$	5,90
		1ml	92	$9,2 \times 10^5$	5,96
R2	11,13	0,2	16	$8,0 \times 10^5$	5,90
		0,2	16	$8,0 \times 10^5$	5,90
		0,2	18	$9,0 \times 10^5$	5,95
		0,2	19	$9,5 \times 10^5$	5,98
		0,1	7	$7,0 \times 10^5$	5,85
		0,1	6	$6,0 \times 10^5$	5,78
		1ml	82	$8,2 \times 10^5$	5,91
Promedio de log UFC/g					5,94

**Tabla N°6:** Valores del recuento del inóculo agregado a la suspensión inicial del estragón.

Control del inóculo			
Nivel de concentración $10^2$ UFC/g			
Control del inóculo UFC/placa	Células inoculadas en gramos de matriz	Log UFC/g	Promedio
37	$3,4 \times 10^2$	2,53	2,49
30	$2,7 \times 10^2$	2,44	
Nivel de concentración $10^3$ UFC/g			
55	$5,0 \times 10^3$	3,70	3,64
42	$3,8 \times 10^3$	3,58	
Nivel de concentración $10^5$ UFC/g			

50	$4,5 \times 10^5$	5,66	5,75
77	$7,0 \times 10^5$	5,85	



**Figura N°11:** Gráfico de linealidad de la matriz estragón, se grafican los recuentos obtenidos de las tres concentraciones inoculadas vs los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio.

En la tabla 7 se muestran los valores de ufc recuperados por placa al inocular la matriz de jamón crudo con las distintas concentraciones de *C.perfringens*. También se encuentran los resultados correspondientes a 1 mL de la dilución sembrada. En la tabla 8 se muestra los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio y en la figura 12 se grafican los recuentos obtenidos para la matriz jamón crudo. El  $R^2$  obtenido fue de 1.

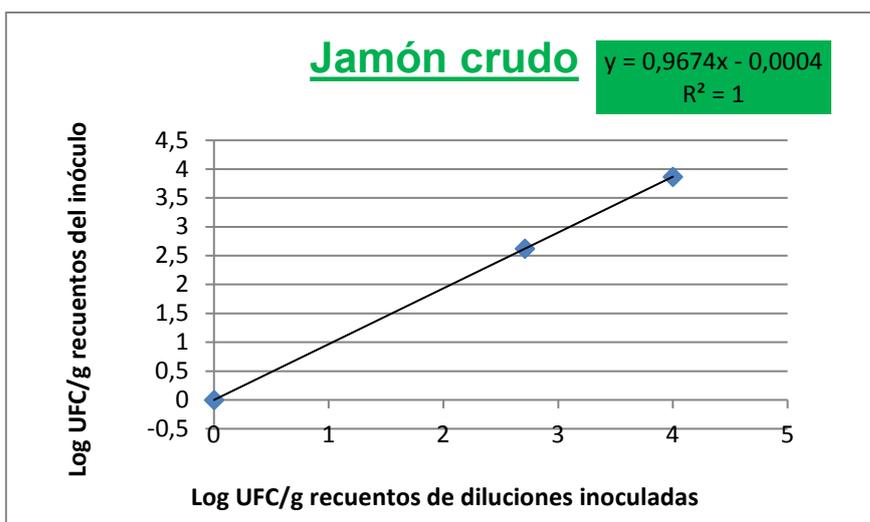
**Tabla N°7:** Valores de ufc recuperados por placas al inocular la matriz de jamón crudo con las distintas concentraciones de *C.perfringens*.

Matriz Jamón crudo					
Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g					
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g	Log UFC/g
R1	10,97	1.0	41	$4,1 \times 10^2$	2,61
		1.0	39	$3,9 \times 10^2$	2,59

		0,1	9	$9,0 \times 10^2$	2,95
		0,1	10	$1,0 \times 10^3$	3,00
R2	11,07	1.0	37	$3,7 \times 10^2$	2,57
		1.0	51	$5,1 \times 10^2$	2,71
		0,1	9	$9,0 \times 10^2$	2,95
		0,1	6	$6,0 \times 10^2$	2,78
Promedio Log UFC/g R1 y R2					2,62
Nivel de concentración inoculado $10^3$ células/g					
R1	11,02	1	76	$7,6 \times 10^3$	3,88
		1	96	$9,6 \times 10^3$	3,98
		0,1	11	$1,1 \times 10^4$	4,04
		0,1	9	$9,0 \times 10^3$	3,95
R2	11,12	1	67	$6,7 \times 10^3$	3,83
		1	60	$6,0 \times 10^3$	3,78
		0,1	7	$7,0 \times 10^3$	3,85
		0,1	5	$5,0 \times 10^3$	3,70
Promedio Log UFC/g R1 y R2					3,87

**Tabla N°8:** Valores del recuento del inóculo agregado a la suspensión inicial del jamón crudo.

Control del inóculo			
Nivel de concentración $10^2$ UFC/g			
Control del inóculo UFC/placa	Células inoculadas en gramos de matriz	Log UFC/g	Promedio
60	$5,5 \times 10^2$	2,74	2,72
54	$4,9 \times 10^2$	2,69	
Nivel de concentración $10^3$ UFC/g			
109	$9,9 \times 10^3$	4,00	4,00



**Figura Nº12:** Gráfico de linealidad del jamón crudo, se grafican los recuentos obtenidos de las dos concentraciones inoculadas vs los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio, se incluyó el cero teórico para que el gráfico esté compuesto por tres puntos.

En la tabla 9 se muestran los valores de UFC recuperados por placa al inocular la matriz de jamón cocido con las distintas concentraciones de *C.perfringens*. También se encuentran los resultados correspondientes a 1 mL de la dilución sembrada. En la tabla 10 se muestra los resultados obtenidos para el control del inóculo realizado en placas de medio. En la figura 13 se grafican los recuentos obtenidos para la matriz jamón cocido. El  $R^2$  obtenido fue de 0.9981.

**Tabla Nº 9:** Valores de UFC recuperados por placas al inocular la matriz de jamón cocido con las distintas concentraciones de *C.perfringens*.

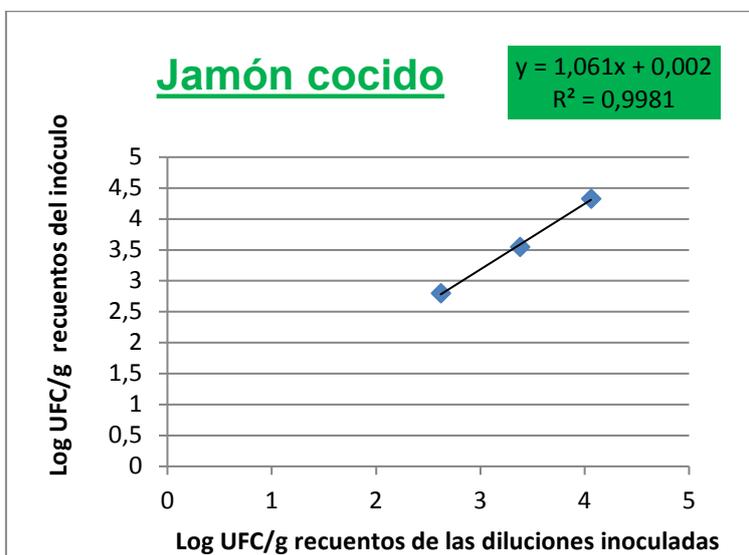
Matriz Jamón cocido					
Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g					
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g	Log UFC/g
R1	11,16	1,0	53	$5,3 \times 10^2$	2,72
		1,0	60	$6,0 \times 10^2$	2,78
		0,1	8	$8,0 \times 10^2$	2,90
		0,1	Todo negro		
R2	11,08	1,0	67	$6,7 \times 10^2$	2,83
		1,0	70	$7,0 \times 10^2$	2,85
		0,1	15	$1,5 \times 10^3$	3,18

		0,1	8	$8,0 \times 10^2$	2,90
Promedio Log UFC/g R1 y R2					2,80
Nivel de concentración inoculado $10^3$ células/g					
R1	11,20	1,0	37	$3,7 \times 10^3$	3,57
		1,0	52	$5,2 \times 10^3$	3,72
		0,1	7	$7,0 \times 10^3$	3,85
		0,1	7	$7,0 \times 10^3$	3,85
R2	11,02	1,0	29	$2,9 \times 10^3$	3,46
		1,0	Todo negro		
		0,1	7	$7,0 \times 10^3$	3,85
		0,1	6	$6,0 \times 10^3$	3,78
Promedio Log UFC/g R1 y R2					3,56
Nivel de concentración inoculado $10^4$ células/g					
R1	11,02	1,0	200	$2,0 \times 10^4$	4,30
		1,0	>250	Estimado $>2,5 \times 10^4$	
		0,1	16	$2,0 \times 10^4$	4,20
		0,1	20	$2,0 \times 10^4$	4,30
R2	11,31	1,0	230	$2,3 \times 10^4$	4,36
		1,0	>250	Estimado $>2,5 \times 10^4$	
		0,1	13	$1,3 \times 10^4$	4,11
		0,1	16	$1,6 \times 10^4$	4,20
Promedio Log UFC/g R1 y R2					4,33

**Tabla Nº10:** Valores del recuento del inóculo agregado a la suspensión inicial del jamón cocido.

Control del inóculo			
Nivel de concentración $10^2$ UFC/g			
Control del inóculo UFC/placa	Células inoculadas en gramos de matriz	Log UFC/g	Promedio
43	$3,9 \times 10^2$	2,59	2,62
49	$4,5 \times 10^2$	2,65	
Nivel de concentración $10^3$ UFC/g			

26	$2,4 \times 10^3$	3,38	3,38
20	Estimado $1,8 \times 10^3$	3,26	
Nivel de concentración $10^4$ UFC/g			
12	Estimado $1,1 \times 10^4$	4,04	4,06
13	Estimado $1,2 \times 10^4$	4,07	



**Figura N°13:** Gráfico de linealidad de la matriz de jamón cocido, se grafican los valores de los recuentos obtenidos para las tres concentraciones inoculadas vs los recuentos del inóculo.

El procedimiento anterior se realizó de forma idéntica para la matriz Canela y Ají molido, para ambas matrices se realizaron el nivel de concentración más pequeño y el más grande que se realizó para especias, pero no se obtuvo crecimiento en ninguna de las placas inoculadas

### **19.2.2 Precisión (Repetibilidad y reproducibilidad)**

En las siguientes tablas se encuentran los valores obtenidos de los mismos ensayos descritos anteriormente pero en dichas tablas se comparan los valores entre sí.

El *r* es el valor de la repetibilidad que se obtiene de la diferencia entre dos valores que se realizaron de manera idéntica sin variar absolutamente nada en el procedimiento. Se calculó las diferencias entre los valores obtenidos de una misma replica.

El *R* es el valor de la reproducibilidad que se obtiene por la diferencia entre dos valores que se realizaron con el mismo protocolo pero con diferentes variables (analista, instrumentos, lote de medio de cultivo, etc). Se calculó las diferencias entre valores de las distintas replicas.

**Tabla N°11:** Valores de repetibilidad y reproducibilidad del orégano.

Matriz Orégano						
		Replica 1 (R1)		Replica 2 (R2)		
Nivel de concentración inculado	Volumen (mL)	log Recuento R1	<i>r</i>	log Recuento R2	<i>r</i>	<i>R</i>
1	0,2	2,88	0,18	2,78	0,13	0,15
	0,2	2,70	0,11	2,65	0,09	0,03
	0,2	2,81	0,03	2,74	0,07	
	0,2	2,78	0,10	2,81	0,03	
				0,08		0,16
2	0,1	2,78	0,07	2,85	0,04	
	0,1	2,60	0,18	2,60	0,25	0,07
	1ml	2,78		2,75		0,03
	0,2	3,54	0,24	3,30	0,40	0,18

	0,2	3,78	0,08	3,70	0,22	0,32
	0,2	3,70	0,10	3,48	0,06	
	0,2	3,60	0,14	3,54	0,24	
			0,18		0,16	
	0,1	3,70	0,24	3,30	0,18	
	0,1	3,00	0,70	3,00	0,30	0,40
	1ml	3,63		3,48		0,15
3	0,2	5,85	0,25	5,70	0,30	0,21
	0,2	5,60	0,14	5,40		0,29
	0,2	5,74	0,09		0,04	
	0,2	5,65	0,20	5,74	0,34	
			0,05			
	0,1	5,78	0,11	5,30		0,48
	0,1	5,78	0,00			
	1ml	5,73		5,45		0,28
				r prom. =	0,17	
				Sr =	0,13	
				R prom. =		0,22
				Sri =		0,14

$r = \text{Duplicado1 (log R1 (ufc/g))} - \text{Duplicado 2 (log R1 (ufc/g))}$

$R = (\text{Mayor } r \text{ de Replica 1}) - (\text{Menor } r \text{ de Replica 2})$

**Tabla N°12:** Valores de repetibilidad y reproducibilidad del estragón.

Matriz Estragón						
Nivel de concentración inoculado	Volumen (mL)	Replica 1 (R1)		Replica 2 (R2)		R
		log Recuento R1	r	log Recuento R2	r	
1	0,2	3,00	0,02	2,98	0,03	0,06
	0,2	2,98	0,06	2,95	0,09	0,07
	0,2	3,04	0,02	3,04	0,04	
	0,2	3,06	0,06	3,00	0,02	
			0,08		0,05	
	0,1	3,15	0,04	3,08	0,06	
	0,1			3,04	0,04	0,09
	1ml	2,99		3,00		0,01

2	0,2	3,70	0,23	3,81	0,07	0,16
	0,2	3,93	0,19	3,88	0,18	0,18
	0,2	3,74	0,19	3,70	0,04	
	0,2	3,93	0,23	3,74	0,07	
			0,00		0,14	
	0,1	3,78	0,04	3,90	0,11	
	0,1	4,00	0,22	3,70	0,20	0,02
	1ml	3,85		3,79		0,06
3	0,2	6,02	0,04	5,90	0,00	0,12
	0,2	5,98	0,02	5,90	0,05	0,06
	0,2	6,00	0,1	5,95	0,03	
	0,2	5,90	0,12	5,98	0,08	
			0,08		0,08	
	0,1	5,90	0,02	5,85	0,05	
	0,1	5,90	0	5,78	0,07	0,07
	1ml	5,96		5,91		0,05
				r prom. =	0,08	
				Sr =	0,07	
				R prom. =		0,08
				SRI =		0,05

**Tabla N°13:** Valores de repetibilidad y reproducibilidad del jamón crudo.

Matriz Jamón crudo						
Nivel de concentración inoculado	Volumen (mL)	Replica 1 (R1)		Replica 2 (R2)		R
		log Recuento R1	r	log Recuento R2	r	
1	1	2,61	0,02	2,57	0,14	0,12
	1	2,59		2,71		
	0,1	2,95	0,05	2,95	0,17	0,12
	0,1	3		2,78		
2	1	3,88	0,1	3,83	0,05	0,05
	1	3,98		3,78		
	0,1	4,04	0,09	3,85	0,15	0,06
	0,1	3,95		3,7		
				r prom. =	0,1	
				Sr =	0,05	

R prom. =		0,09
SRi =		0,04

**Tabla N°14:** Valores de repetibilidad y reproducibilidad del jamón cocido.

Matriz Jamón cocido						
		Replica 1 (R1)		Replica 2 (R2)		
Nivel de concentración inoculado	Volumen (mL)	log Recuento R1	r	log Recuento R2	r	R
1	1,00	2,72	0,06	2,83	0,02	0,04
	1,00	2,78		2,85		
	0,10	2,90		3,18	0,28	0,14
	0,10			2,90		
2	1,00	3,57	0,15	3,46		0,19
	1,00	3,72				
	0,10	3,85	0,00	3,85	0,07	0,07
	0,10	3,85		3,78		
3	1,00	4,30		4,36		0,06
	1,00					
	0,10	4,20	0,10	4,11	0,09	0,01
	0,10	4,30		4,20		
				r prom. =	0,10	
				Sr =	0,09	
				R prom. =		0,09
				SRi =		0,07

## 20) Diferencias entre marcas de medios de cultivo ISA (Oxoid) y (Liofilchem)

A continuación se puede observar el procedimiento que se realizó para comparar dos marcas comerciales de medio de medio de cultivo ISA. En la imagen 16 se observa ambos medios luego de autoclavados, en dicha foto se busca mostrar la diferencia en el color de los mismos. Posteriormente se pueden observar las tablas 15 y 16 que fueron las UFC recuperadas por placa para las diferentes concentraciones inoculadas de *C. perfringens* en dos tipos de matrices diferentes donde en la 15 se utilizó medio ISA marca Liofilchem y en la 16 marca Oxoid. En la imagen 17 se aprecian las placas luego de incubadas en anaerobiosis durante 48hs a 37°C.

Luego se continuó el procedimiento de seguimiento hasta observación de esporas en el microscopio.



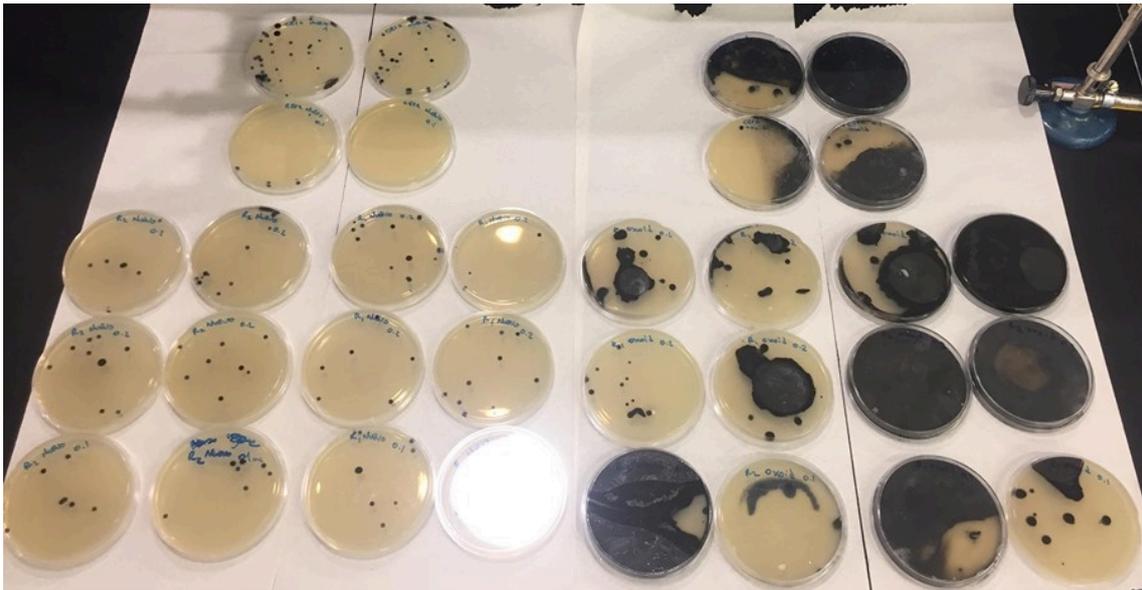
**Figura N°16:** Medios de cultivos marca ISA Liofilchem y Oxoid recién salido del autoclave.

**Tabla N°15:** Recuentos realizados para el medio de cultivo marca Liofilchem.

ISA marca (Liofilchem)				
Jamón cocido, Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g				
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g
R1	11,20	1.0	40	$4,0 \times 10^2$
		1.0	37	$3,7 \times 10^2$
		0,1	8	$8,0 \times 10^2$
		0,1	6	$6,0 \times 10^2$
R2	11,08	1.0	46	$4,6 \times 10^2$
		1.0	51	$5,1 \times 10^2$
		0,1	6	$6,0 \times 10^2$
		0,1	7	$8,0 \times 10^2$
Promedio Log UFC/g R1 y R2				
Orégano nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g				
R1	10,77	0,2	8	$4,0 \times 10^2$
		0,2	6	$3,0 \times 10^2$
		0,2	13	$6,5 \times 10^2$
		0,2	10	$5,0 \times 10^2$
		0,1	3	$3,0 \times 10^2$
		0,1	4	$4,0 \times 10^2$
R2	10,18	0,2	9	$4,5 \times 10^2$
		0,2	8	$4,0 \times 10^2$
		0,2	10	$5,0 \times 10^2$
		0,2	7	$3,5 \times 10^2$
		0,1	7	$7,0 \times 10^2$
		0,1	7	$7,0 \times 10^2$

**Tabla N°15:** Recuento obtenido para medio de cultivo marca Oxoid.

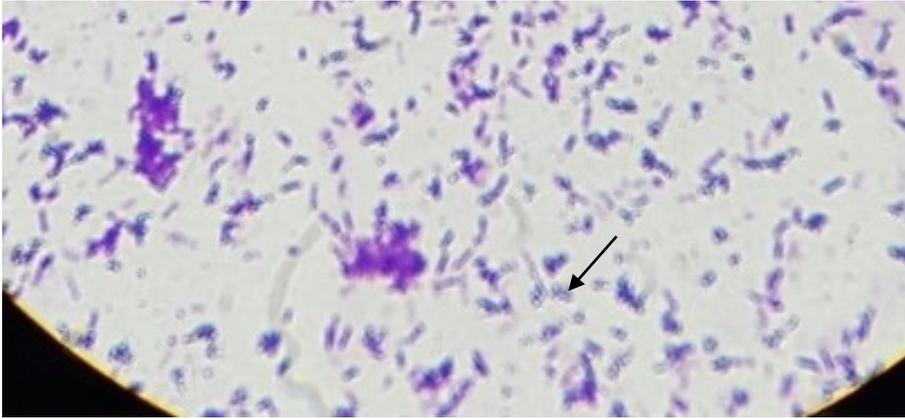
ISA marca (oxid)				
Jamón cocido, Nivel de concentración inoculado $10^3$ células/ml				
Replicas	Masa (g)	Volumen sembrado por placa (mL)	UFC en placa	UFC/g
R1	11,16	1.0	53	$5,3 \times 10^2$
		1.0	60	$6,0 \times 10^2$
		0,1	8	$8,0 \times 10^2$
		0,1	Todo negro	
R2	11,08	1.0	67	$6,7 \times 10^2$
		1.0	70	$7,0 \times 10^2$
		0,1	15	$1,5 \times 10^3$
		0,1	8	$8,0 \times 10^2$
Promedio Log UFC/g R1 y R2				
Orégano Nivel de concentración inoculado $10^2$ células/g				
R1	10,77	0,2	12	$6,0 \times 10^2$
		0,2	9	$4,5 \times 10^2$
		0,2	11	$5,5 \times 10^2$
		0,2	13	$6,5 \times 10^2$
		0,1	7	$7,0 \times 10^2$
		0,1	4	$4,0 \times 10^2$
R2	10,18	0,2	9	$4,5 \times 10^2$
		0,2	9	$4,5 \times 10^2$
		0,2	todo negro	
		0,2	11	$5,5 \times 10^2$
		0,1	8	$8,0 \times 10^2$
		0,1	6	$6,0 \times 10^2$



**Figura N°17:** En las 16 placas que se encuentran sobre el lado izquierdo de la imagen se utilizó el medio Liofilchem y las 16 placas de la derecha fueron realizadas con el medio Oxoid.



**Figura N°18:** Se confirmó producción de H<sub>2</sub>S por pinchadura en tubo de ISA utilizando ambos medios de cultivo.



**Figura N°19:** Observación al microscopio de producción de esporas.

En la comparación de productividad de los dos medios de cultivo se pudo observar que ambos recuperan cantidades similares de microorganismo pero se puede observar una gran diferencia entre ambos, el medio Liofilchem no ennegrece toda la placa sino que lo único que se observa negro son las colonias típicas lo que facilita el conteo de las mismas, también se pudo observar grandes cantidades de colonia en una placa, cosa que para el medio Oxoid es bastante complicado o prácticamente imposible. (Figura N°20)

## 21) Discusión de los resultados:

Se pudo estimar debido a varias pruebas realizadas que la concentración de *C.perfringens* en un inóculo secundario es del orden de  $10^7$  UFC/ml, lo que nos evito el uso de una escala de McFarlad u otros métodos para estimar la cantidad de *C.perfringens* en la cepa.

Se pudo verificar el cumplimiento de los siguientes parámetros de validación para las matrices de orégano, estragón, jamón crudo y jamón cocido.

El criterio de aceptación que se usa para determinar la linealidad es el coeficiente de correlación, es aceptable para  $R^2 > 0.99$ .

Por ende el criterio de aceptación de la linealidad se cumple para las cuatro matrices ya que los valores de  $R^2$  son mayores 0.99 y el r es cercano o igual a uno.

Se puede concluir que este método valida los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad para las cuatro matrices analizadas debido a que los valores obtenidos fueron menores a los valores de referencias obtenidos de las normas ISO 4833 y 7933.

También se analizaron las matrices canela y ají triturado pero ambas no mostraron recuperación de microorganismos, por este motivo se decidió buscar información que justifique lo ocurridos y posibles formas de determinar y cuantificar los agentes antimicrobianos.

Se ha demostrado que los extractos vegetales de especias comunes en nuestro medio como el tomillo, manzanilla, eucalipto, canela, pimienta, ají, entre otros, poseen eficacia contra bacterias, hongos y algunos virus (Domingo y López-Brea, 2003).

El efecto antimicrobiano de muchas hierbas y especias utilizadas a aumentar la vida útil de los alimentos se atribuye a su alta concentración en compuestos fenólicos, terpenos y otros compuestos volátiles.

Pueden tener al menos tres tipos de acción sobre el microorganismo:

- Inhibición de la biosíntesis de los ácidos nucleicos o de la pared celular.
- Daño a la integridad de las membranas.
- Interferencia con la gran variedad de procesos metabólicos esenciales.

En la tabla 16 se muestran los principales grupos químicos de moléculas de origen vegetal con actividad antimicrobiana.

**Tabla N°16:** Principales grupos químicos con actividad antimicrobiana ampliamente demostrada por diversos estudios

Grupo químico	Planta	Actividad
	Tomillo ( <i>Thymus officinalis</i> ),	General
Fenoles simples	Manzanilla ( <i>Mauricaria chamomilla</i> ), Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> )	<i>S. aureus</i> , <i>S. thyphimurium</i> , <i>Salmonella sp.</i>
Quinonas	Hipérico ( <i>Hypericum perforatum</i> )	VIII
	Roble ( <i>Quercus rubra</i> ),	
Taninos	Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> ), Melisa ( <i>Melissa officinalis</i> )	Bacterias y virus
Cumarinas	Manzanilla ( <i>Mauricaria chamomilla</i> )	Virus
	Té ( <i>Camellia sinensis</i> ),	
Flavonas	Roble ( <i>Quercus rubra</i> )	<i>Shigella sp.</i> , <i>Vibrio sp.</i>
	Coca ( <i>Erythroxylum coca</i> ),	Gram positivos
Alcaloides	Pimienta ( <i>Piper nigrum</i> ), Aji ( <i>Capsicum sp.</i> )	Hongos, <i>Lactobacillus</i> Bacterias y hongos

Fuente: Domingo y López-Brea (2003).

Los alcaloides son sustancias principalmente de origen vegetal y constituyen gran parte de los principios activos en plantas medicinales, los mismos que se han usado para la producción de medicamentos. Los alcaloides ejercen su acción antimicrobiana mediante intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003; Arango, 2008).

El efecto antimicrobiano de los extractos de Aji (genero: *Capsicum*) son atribuidos a la acción conjunta de los capsaicinoides y los compuestos

fenólicos . Diversas investigaciones indican que los capsaicinoides poseen actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* (Dorantes et al., 2000; Careaga et al., 2003; Nascimento et al., 2014;), *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* (Colivet et al., 2006). Asimismo, se ha demostrado que los extractos de *Capsicum* poseen propiedades antifúngicas sobre *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Rhizopus sp.* (Moreno-Limón et al., 2012; Soumya y Nair, 2012; Cerón-Carrillo et al., 2014). Estudios realizados por Shayan y Saeidi (2013) prueban que los extractos de *Capsicum* también poseen la capacidad de impedir la formación de biofilms por bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Algunos estudios sobre el efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de especias y hierbas observaron que los aceites esenciales de clavo, tomillo, orégano, pimienta y canela previnieron la germinación de *Clostridium botulinum* (Ismail y Pierson 1990). Mientras que Aureli et al. (1992) probaron la actividad antimicrobiana de estos mismos aceites esenciales en sistemas modelos, para inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, determinando que los constituyentes más activos fueron timol, aldehídos cinámicos, eugenol y carvacrol.

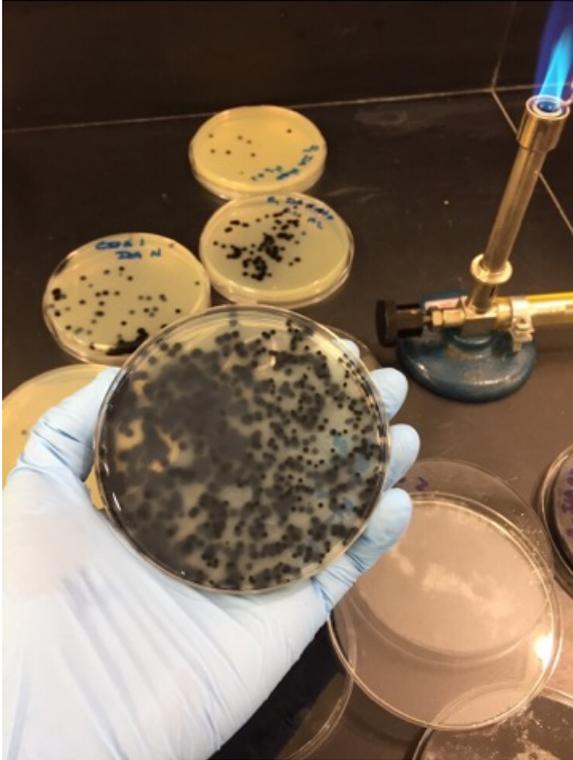
Juven et al. (1994) observaron que la actividad antimicrobiana de los compuestos fenolicos de ciertos aceites esenciales, sensibiliza la membrana generando un daño irreversible provocando el colapso celular.

Con toda esta información podemos concluir que esta inhibición se debe a la presencia de antimicrobianos que contienen nuestras matrices, por lo que se debería buscar una alternativa al método utilizado, donde se pueda identificar y cuantificar dicho microorganismo para este tipo de alimentos.

#### Diferencias entre ISA Oxoid y Liofilchem

La única diferencia que se puede observar entre ambos medios es la fuente de aminoácidos que contienen, uno utiliza la Tryptone y el otro utiliza un equivalente Enzymatic digest of casein. No podemos garantizar que se deba a

esta diferencia pero el resto es todo muy similar varían mínimamente las cantidades que se colocan de los demás componentes.



**Figura N°20:** Medio Liofilchem con recuento mayor a 250 UFC.

## 22) Conclusiones:

Se estima que un cultivo secundario de *C.perfringens* contiene  $10^7$  cantidad de células por mililitro.

Se verificó que ambas accesiones de *C.perfringens* ATCC13124 están aptas para ser utilizadas.

Se verificó que en las condiciones del laboratorio del LATU el método ISO 15213 cumple con los parámetros establecidos de linealidad, repetibilidad, y reproducibilidad para los matrices orégano, estragón, jamón crudo y jamón cocido

No se pudo validar el método para la canela ni ají triturado ya que posiblemente los antimicrobianos naturales que contienen nos inhibieron los *C. perfringens*.

Se recomienda el uso del medio de cultivo ISA marca Liofilchem.

## 23) Autoevaluación:

En las primeras semanas se presentaron varias instancias de pruebas, lo cual me permitió realizar diferentes pruebas como ajustar el inóculo de siembra, preparación de diluciones, entre otras, lo que me sirvió como base para luego comenzar a trabajar con las matrices.

Al comienzo fue un poco engorroso el desempeño de la pasantía debido a que hacía dos años que no cursaba ningún tipo de materia y estaba con los conocimientos teóricos un poco olvidados.

La experiencia de dicha validación me permitió re afirmar los conocimientos adquiridos durante la carrera, fue una experiencia maravillosa que me permitió aprender mucho sobre el ambiente laboral, el trabajo en equipo, la responsabilidad, prolijidad y cumplimiento con las tareas asignadas. A nivel práctico no tuve grandes complicaciones ya que por haber estado

anteriormente trabajando en dicho laboratorio me permitió desempeñarme cómodamente.

De igual modo considero que aún tengo mucho por aprender en el rubro y para seguir mejorando como profesional.

### **23.1 Agradecimientos:**

Me resta agradecer a la jefa del departamento de microbiología Ana Maquieira por la oportunidad de dejarme realizar dicha pasantía, a todos los que allí trabajan por el buen trato y por la disposición que tuvieron siempre conmigo, también quiero agradecer a las tutoras Paula Mussio y Cecilia Taulé por estar siempre a disposición y por tenerme mucha pacienci

## 24) BIBLIOGRAFIA:

- Reglamento Bromatológico Nacional – IMPO
- ISO 4833-1:2013  
Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of microorganisms — Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique
- ISO 7937:2004  
Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique
- Guía Técnica Validación de Métodos y determinación de la incertidumbre de la medición - Instituto de Salud Pública
- Manual de Análisis Microbiológico de los Alimentos  
ANMAT - RENALOA - Ministerio de Salud Presidencia de la Nación – Argentina
- Guía de práctico - Cátedra de Microbiología de Facultad de Química.
- Título de la tesis. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA - Tesis para Título Profesional de Médico Veterinario - Eduardo Alexander Salazar Sánchez - Lima - Perú (2016)
- CERCENADO.E y CANTÓN.R. (2013)  
“Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos”.  
Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Vol. 48.  
[https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos\\_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf](https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos_microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia48.pdf)
- Copyright Q, International Association for Food Protection. (2006)  
Journal of Food Protection, Vol. 69, No. 5, páginas 1046–1055

<file:///C:/Users/Locuras%20Infantiles/Downloads/Aceites%20esenciales.pdf>

- Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla San Andrés Cholula, Pue., México.

<file:///C:/Users/Locuras%20Infantiles/Documents/Downloads/TSIA-Vol3No1-Vega Portocarrero et al 85-95p.pdf>

- <https://www.latu.org.uy/certificacion-control/certificacion-de-productos/alimentos>

**25) Anexo**

**Tabla N°16:** Valores obtenidos de los controles de pH para los diferentes medios de cultivos utilizados y el diluyente, también se observa en la tabla el resultado de los controles de esterilidad.

Medios y lote	PH	Control de esterilidad
AF	7,2	Sin crecimiento
Tioglicolato	7,1	Sin crecimiento
ISA2 267	7,0	Sin crecimiento
ISA2 282	7,0	Sin crecimiento
ISA2 300	7,2	Sin crecimiento
ISA2 304	7.0	Sin crecimiento
ISA2 334	7.0	Sin crecimiento
ISA2 335	6,9	Sin crecimiento
ISA2 336	7.0	Sin crecimiento
ISA2 339	7.0	Sin crecimiento
ISA2 343	7,1	Sin crecimiento
ISA2 352	7.0	Sin crecimiento
ISA2 374	7,0	Sin crecimiento
ISA2 376	7.0	Sin crecimiento
ISA2 394	7.0	Sin crecimiento
ISA2 395	6,9	Sin crecimiento
ISA2 404	6,9	Sin crecimiento
ISA2 414	7.0	Sin crecimiento
ISA2 (Liofilchem)	7,1	Sin crecimiento
ISA2 (Liofilchem)	6,9	Sin crecimiento

Como se observa en la tabla los controles de esterilidad siempre dieron sin crecimiento de ningún tipo de colonia, lo que si obtuvimos un cambio de color a negro en el medio ISA (Oxoid) en reiteradas oportunidades, este color luego de un lapso corto de tiempo tendía a irse aunque no siempre, lo cual nos llamó mucho la atención ya que dicho cambio de color es provocado por la bacteria al reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados, se habló con el proveedor el cual nos dijo que se debía a posibles presencias de oxígeno lo cual no nos pareció correcto ya que en las jarras del Anoxomat colocamos un indicador que nos queda de color rosa si hubiera presencia de oxígeno. Se siguió la búsqueda de información sin mucho

éxito lo que pudimos concluir sin certeza que dicho cambio de color se puede deber a alguna reacción volátil que se da dentro de la jarra.

Quiero destacar que dicho color negro solo aparece cuando se incuban placas inoculadas con cepa de referencia junto con el control de esterilidad.

<b>LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY</b>	<b>DOCUMENTO DE CALIDAD Protocolo de Ensayo y Calibración</b>	<b>Documento: PEC.MIC.052 Versión 01 del 2/12/2019 Aprobado: Ana María Maquieira Página 69 al</b>
--	---	---

**LA IMPRESIÓN DE ESTE DOCUMENTO ES UNA COPIA NO CONTROLADA**

<b>Título: Recuento de Clostridios Sulfito Reductores en alimentos</b>	<b>Naturaleza de la revisión:</b>
--	-----------------------------------

## INDICE

1. OBJETIVO/ CAMPO DE APLICACIÓN
2. PRINCIPIO
3. DEFINICIONES
4. MATERIALES NECESARIOS
5. PROCEDIMIENTO
6. EXPRESION DE RESULTADOS
7. ANEXO

### 1 OBJETIVO/ CAMPO DE APLICACIÓN

El objetivo del presente documento es establecer un procedimiento para el recuento de Clostridios Sulfito Reductores (CSR) en muestras de alimento utilizando el método de recuento en placa.

### 2 PRINCIPIO

Este procedimiento se basa en el recuento incorporado de ISA, incubado en anaerobiosis a 37°C y lectura de colonias negras.

### 3 DEFINICIONES

Los **Clostridios Sulfito Reductores** se caracterizan por ser organismos Gram positivos, anaeróbicos y formadores de esporas que tienen la propiedad de reducir el ion sulfito a sulfuro en presencia del citrato férrico u otra sal de metales pesados, dando lugar a colonias negras.

### 4 MATERIALES NECESARIOS

4.1 Para realizar el ensayo de recuento, el área de trabajo debe estar limpia, con mesadas no porosas, y desinfectarse antes del inicio del análisis. Se deben utilizar materiales de vidrio, plástico y otros equipos libres de agentes que puedan afectar el crecimiento bacteriano.

## 4.2 Materiales

### 4.2.1 Reactivos

- Agua de dilución Fosfatada

### 4.2.2 Preparación

- **Preparación de NaOH 1N:** Pesar 40g NaOH caustica en 1000mL de agua destilada, agitar hasta solución homogénea.
- **Solución buffer:** En un matraz aforado de 1000mL se disolver 34g de fosfato monopotásico en 500mL de agua destilada, agitar la mezcla hasta homogeneidad, ajustar el ph de la solución hasta  $7.2 \pm 0.1$  con NaOH 1N enrrazar el matraz con agua destilada, almacenar en un recipiente adecuado para poder autoclavar.
- Para prepara un lote de 50 frascos de 99mL de AF, En 5L de agua destilada adicionar 6.25 ml de solución buffer y autoclavar.

### 4.2.3 Materiales y Equipos

- Pipetas de 1 mL graduadas en intervalos de 0.1mL y de 10 mL
- Ansas estériles
- Tubos de ensayo estériles y no estériles, frascos de capacidad apropiada, bolsas de plásticos estériles de capacidad 500 mL
- Placas de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm
- Jarras de anaerobiosis
- Autoclaves para esterilización
- Estufa de incubación:  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Baño de agua a  $44^{\circ}\text{C}$  y  $47^{\circ}\text{C}$
- Peachímetro de exactitud  $0.01$  a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

- Balanza
- Equipo para mezclado (tipo stomacher)
- Agitador mecánico (tipo vortex)
- Anoxomat (Mart) equipo para generación de atmósfera anaeróbica.

#### 4.2.4 Medio de cultivo

- Iron Sulfite Agar (ISA)

#### 4.2.5 Composición

- Enzymatic digest of casein 15g
- Pancreatic digest of soya 5g
- Yeast extract 5g
- Disodium disulfite (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) 1g
- Iron (III) ammonium citrate 1g
- Agar 9g to 18g<sup>a</sup>
- Water 1000mL

### 5 PROCEDIMIENTO (Responsable: Coordinador de área medios de cultivo)

#### 5.1 Iron Sulfite Agar (La que se usa de rutina):

Usar medio de cultivo ISA (Oxoid) CM0079, preparar en doble concentración según instrucciones del fabricante (pesar el doble de lo indicado) y con agregado de 5 gramos de Extracto de levadura por litro de medio de cultivo.

Estas modificaciones (doble concentración y agregado de extracto de levadura) son necesarias para que el medio coincida con la formulación de ISA de la Norma ISO 15213

#### 5.2 Preparación de material (Responsable: Ayudante de limpieza y

preparación de material)

### **5.3 Descripción de las actividades**

**5.3.1** Seleccionar la dilución o diluciones de manera que el número total de colonias sea por debajo de 300 colonias, y el número de colonias típicas por debajo de 150 colonias (considerar la especificación establecida para el producto). **IMPORTANTE:** ver Nota 2.

**5.3.2** Marcar cada placa con la dilución a sembrar y con el número identificador del análisis que se obtiene del registro de la muestra, correspondiente a la carpeta a la que está asignada la muestra.

**5.3.3** Sembrar las diluciones seleccionadas (para recuento incorporado) en ISA, y luego de solidificado agregar sobrecapa de ISA. **IMPORTANTE:** ver Nota 2

Nota 1:

El tiempo que transcurre entre la hidratación de la muestra y la siembra no debe superar los 15 min.

### **Incubación y lectura**

**5.3.4** Incubar la placa invertida EN ANAEROBIOSIS a 37 +/-1°C por 48 hs.

**5.3.5** Retirar la placa de la estufa luego de cumplido el tiempo de incubación y seleccionar todas las placas contables. Contar todas las colonias negras, con o sin zona negra alrededor. El recuento corresponde a Bacterias Anaerobias sulfitos reductores.

**Nota 2:**

En alimentos que por experiencia se sospecha que pueden inhibir el crecimiento y a su vez teniendo en cuenta que las colonias CSR pueden generar un ennegrecimiento de la placa que dificulta la lectura. Por estos motivos puede ser conveniente realizar la lectura en una dilución que tenga muy pocas colonias por placa y por lo tanto sea un recuento con un alto valor de incertidumbre.

En el caso de los **Condimentos** (o de otros productos que también pueden generar inhibición o que pueden tener alta carga), se sugiere sembrar 4 placas con 0.2 mL de la dilución -2 y 2 placas con 0.1 mL de la -2. De este modo, la suma de las colonias obtenidas en las 6 placas son 1mL de la dilución -2 (es menos probable que se dificulte la lectura y se puede obtener un número de colonias que de un recuento con menos incertidumbre), y en caso de una alta carga las 2 placas con 0.1 mL corresponde a 1mL de la dilución -3 por duplicado.

**5.4 Confirmación** (Si las placas quedan muy negras conviene dejar reposar en aerobiosis a temperatura ambiente aproximadamente una hora, generalmente el negro de las placas tiende a disminuir y facilita en ocasiones la lectura)

**5.4.1** Subcultivar en ISA para confirmación como mínimo 1 colonia sospechosa de cada tipo (repicar un número equivalente al 5% de las colonias presentes). Incubar en anaerobiosis por 48 hs a 37°C.

**5.4.2** En caso de que las colonias no se encuentren aisladas, re aislar en ISA las veces que sea necesario hasta obtener cultivo puro

**5.4.3** A partir de colonia pura:

- Repicar a ISA en aerobiosis (si crece en aerobiosis no se trata

- de un Clostridio). Incubar por 48 hs a 37°C
- Si hay duda de que las colonias sean negras, confirmar producción de H<sub>2</sub>S por pinchadura en tubo de ISA (con tapón de ISA). Incubar en anaerobiosis por 48 hs a 37°C.
  - Confirmar a partir de las colonias en cultivo puro en ISA la producción de esporas por tinción: teñir con Cristal Violeta. Si es dudoso, realizar tinción de esporas con verde malaquita

## 6 EXPRESION DE RESULTADOS:

Recuento de CSR: n UFC/g

n = Número de colonias confirmadas

Dilución de la muestra en la placa en mL

El recuento se calcula: El promedio del número de colonias presentes en cada placa de igual dilución, por el inverso de la dilución sembrada (por ejemplo dilución -2 es 1/100, o sea que se divide el número de colonias entre 1/100, por la inversa del volumen sembrado.

Expresar los resultados con dos cifras significativas, redondeando hacia arriba (si es > que 5) o hacia abajo (si es < que 5) la tercera cifra a la derecha del segundo dígito. Ej: 137 se informa 140 ó  $1.4 \times 10^2$

En caso de no detectarse ninguna colonia en la/s placa/s expresar el resultado como:

UFC/g < 1 X la inversa de la dilución menor

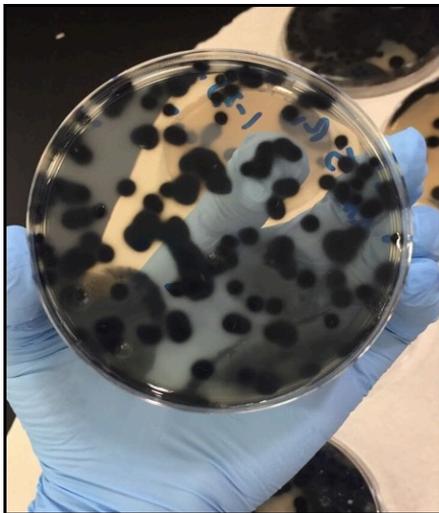
Por ej si se sembró -1 y -2 y no hay colonias en ninguna placa, expresar el resultado como UFC/g < 10

El informe del recuento en placa se expresa:

Recuento de CSR = X u.f.c/ g



**Figura N°21:** Recuento obtenido para una matriz de estragón donde se puede observar una cantidad menor a 25 colonias y un gran ennegrecimiento del medio que dificultó su lectura.



**Figura N°22:** Recuento obtenido para una matriz de jamón crudo donde se observa una cantidad de 76 colonias, se puede apreciar el poco ennegrecimiento provocado en el medio de cultivo.