

En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, el día **26 de agosto de 2025** se exponen en cartelera digital los **temas** para la prueba de oposición del Concurso para proveer cargos de **AYUDANTE DE PRIMERA CON DEDICACIÓN EXCLUSIVA EN EL ÁREA QUÍMICA Y MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS**, Departamento de Química Orgánica (**Res. CD N° 1055/25**)

Las postulantes deberán exponer en pizarrón alguno de los siguientes temas (durante 15 minutos, más 5 minutos adicionales de preguntas) alguno de los siguientes temas y según el cronograma de exposición detallado a continuación:

- Análisis microbiológico de quesos de la guía de laboratorio de la materia Microbiología de Alimentos (LCTA).
- Análisis fisicoquímico de leche fluida de la guía de laboratorio de la materia Tecnología de Alimentos II (LCTA).

CRONOGRAMA DE EXPOSICIÓN APROXIMADO - LUNES 1º DE SEPTIEMBRE DE 2025

HORARIO (presentarse 30 min. antes de su turno)	POSTULANTE	
10:10	ARJONA, Andrea Agustina	37634354
11:00	BOCKOR, Sabrina Sol	39457377
11:20	BORDONI, Antonella	35989970
14:00	CASTELLANOS RODRÍGUEZ, Diana Marcela	95123976
16:30	LIONELLO, Melina Elizabeth	37294037

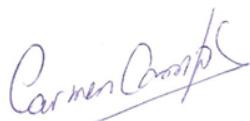
CRONOGRAMA DE EXPOSICIÓN APROXIMADO - MARTES 2 DE SEPTIEMBRE DE 2025

12:00	SANCHEZ, Yamila Gisela	33027408
14:00	TORO MELGAREJO, Linda América	93730337

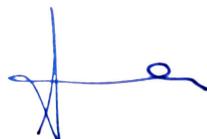
IMPORTANTE

Las exposiciones son **PRESENCIALES** en el **AULA** de seminario del Departamento de Química Orgánica, excepto quienes hayan enviado constancia de su estadía a más de 500 km (*) ó situación evaluada por el Jurado previamente.

- En caso de necesitar justificadamente un cambio de franja horaria, deberá comunicarlo a los Jurados (**antes del 28/8/25**) vía e-mail: concursos.si@qo.fcen.uba.ar con el comprobante que lx imposibilite asistir al día y horario indicado.
- En caso de NO PRESENTARSE a la prueba de oposición deberá enviar **antes del 28/8/25** vía e-mail a concursos.si@qo.fcen.uba.ar



Dra. Carmen A. Campos
JURADO TITULAR



Dra. Nora M. A. Ponce
JURADO TITULAR



Dr. Tobías Schmidt de León
JURADO TITULAR

TRABAJO PRÁCTICO N°3

Análisis microbiológico de quesos

a) Toma de muestra (FAO, Manual para el control de calidad de los alimentos. 4. Análisis Microbiológico. 1981)

Las muestras se toman de los recipientes originales sin abrir, o de porciones representativas de los recipientes abiertos, utilizando para ello instrumentos apropiados, como cucharas, cuchillos o espátulas esterilizadas. Las muestras se deben proteger de la contaminación, enfriar a 0-4,4°C y enviar rápidamente al laboratorio para ser examinadas. De los quesos duros y semiduros se deben tomar por lo menos cinco muestras de diferentes partes del queso, cada una de cinco gramos como mínimo.

b) Preparación de la muestra y diluciones (FAO, Manual para el control de calidad de los alimentos. 4. Análisis Microbiológico. 1981)

Pesar asepticamente 10 g de queso en un recipiente estéril con 90 mL de solución de citrato de sodio al 2 % previamente calentada (40-45°C). Dispersar completamente en el Stomacher o mezclar en vortex durante dos minutos. Esta es la dilución 1/10.

Para realizar las siguientes diluciones, transferir 1 mL de la primera dilución bien mezclada a un tubo con 9 mL citrato de sodio al 2 %. Agitar para homogeneizar. Repetir esta operación para obtener las diluciones sucesivas.

c) Metodología de análisis.

- c 1) Recuento de coliformes a 30°C
- c 2) Recuento de coliformes a 45°C
- c 3) Recuento de *E. coli*
- c 4) Recuento de mohos y levaduras
- c 5) Recuento de *Staphylococcus aureus*
- c 6) Determinación de *Salmonella* en 25 g

c 1) Recuento de coliformes totales (FIL 73 A:1985)

Puede realizarse por recuento en placa en medio sólido o en medio líquido por la técnica de número más probable (NMP).

c 1.1) Recuento en placa.

Sembrar por duplicado 1 mL de, al menos, dos diluciones sucesivas en placas de Petri vacías. Agregar aproximadamente 12 mL de Agar Bilis Rojo Violeta – lactosa (ABRV-L) fundido a 44-46°C. Mezclar. Dejar solidificar completamente y agregar entonces 4 mL más de medio fundido. Dejar enfriar e incubar las placas invertidas a 30°C por 22-26 h.

Seleccionar las diluciones que presenten entre 15 y 150 colonias. Contar las colonias rojas oscuras con diámetro de por lo menos 0,5 mm, características de bacterias coliformes.

Confirmación: Tomar entre 5 y 10 colonias del ABRV y transferirlas a tubos de fermentación con caldo Verde Brillante Lactosa 2 % de Sales Biliares (cada colonia a un tubo distinto). Incubar a 30°C por 22-26 h. Se consideran positivas aquellas colonias que den producción de gas.

El resultado se calcula en base al número de colonias confirmadas. Se expresa como “UFC de coliformes totales/g”.

La confirmación de las colonias es especialmente recomendable para el caso de alimentos que contengan otros azúcares distintos de lactosa.

c 1.2) Técnica del número más probable (NMP).

Prueba presuntiva: Sembrar por triplicado 1 mL de, al menos, tres diluciones sucesivas en tubos de fermentación con caldo Verde Brillante Lactosa 2 % de Sales Biliares. Incubar a 30°C por 48 h. Se consideran positivos aquellos tubos que presenten formación de gas en la campanita de Durham.

Confirmación: Estriar cada tubo presuntamente positivo en agar EMB (agar eosina azul de metileno). Incubar a 30°C por 22-26 h. Se consideran colonias de coliformes las de aspecto oscuro/rojo/rosado y/o mucoso, con o sin brillo metálico.

Registrar el número de tubos positivos de cada dilución. Con la ayuda de una tabla de Número Más Probable (NMP), calcular el NMP de coliformes totales/g de muestra, teniendo en cuenta los tubos positivos confirmados y las diluciones empleadas.

c 2) Recuento de coliformes a 45°C (APHA, 1992)

A partir de los tubos positivos de c.1.2 (coliformes a 30°C, por NMP), sembrar un tubo de fermentación de caldo EC. Incubar 24 h a 45°C. La producción de gas en la campanita de Durham confirma coliformes a 45°C.

Registrar el número de tubos positivos de cada dilución. Seleccionar la combinación de diluciones positivas que resulte más apropiada. Con la ayuda de una tabla de Número Más Probable (NMP), calcular el NMP de coliformes a 45°C/g de muestra, teniendo en cuenta los tubos positivos y las diluciones empleadas.

c 3) Recuento de *Escherichia coli* (Bacteriological Analytical Manual, 1998. Actualizado a 2001)

Estriar una ansada de cada uno de los tubos positivos en EC en placas de EMB. Incubar 18-24 h a 35°C.

Examinar las placas para observar colonias típicas de *Escherichia coli*, con centro oscuro y planas, con o sin brillo metálico. Transferir colonias típicas a tubos de agar nutritivo inclinado e incubar 24 h a 35°C.

Sobre cada cultivo puro realizar:

- 1- Tinción de Gram.
- 2- Prueba de oxidasa.
- 3- Prueba de indol.

Sembrar un tubo de caldo triptona. Incubar 24 h a 35°C.

Investigación de indol -Técnica de Kovacs:

Agregar al cultivo de 0,2-0,3 mL de reactivo y agitar. Esperar unos minutos.

Coloración roja en la parte superior del tubo indica formación de Indol (+).

4- Prueba de Voges Proskauer y de Rojo de Metilo.

Sembrar un tubo de caldo Clark y Lubs (RMVP). Incubar 48 h a 35°C.

Investigación de acetil metil carbinol - Técnica de Voges-Proskauer

Separar una alícuota del cultivo en un tubo y agregar, respetando el orden:

- 0,6 mL de α - naftol al 5% y

- 0,2 mL de KOH al 40%

Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y oxidar la acetoína (acetil metil carbinol) y permitir el desarrollo de color. Dejar descansar por lo menos 10-15 minutos. De ser necesario agregar unos cristales de creatina.

El máximo desarrollo de color se observa luego de dos horas.

Color rosado en la superficie: producción de acetoína (+), VP (+).

Color amarillo o cobrizo: producción de acetoína (-), VP (-).

Investigación de acidez - Prueba del Rojo de Metilo:

Agregar 5 gotas de reactivo rojo de metilo al cultivo y observar inmediatamente.

Color rojo indica acidez (+).

Características del indicador Rojo de Metilo:

pH<4,4

rojo

4,4 < pH < 6

rango de viraje del indicador

pH > 6 amarillo

5- Prueba de citrato.

Sembrar por estría un tubo de agar Citrato Simmons. Incubar 24 h a 37°C.

Investigación de utilización de citrato: Los microorganismos que son capaces de utilizar el citrato producen cambio de color en el medio (de verde a azul). Se considera citrato (+) el desarrollo de color azul.

Resultados típicos de *Escherichia coli*:

Bacilo corto Gram negativo sin esporas

Oxidasa (-)

Voges Proskauer (-)

Indol (+) algunas cepas (-)

Citrato (-)

Rojo de Metilo (+)

Escherichia coli puede presentar IMViC: +--- (biotipo 1) o -+- (biotipo 2), muy poco frecuente.

c4) Recuento de mohos y levaduras (Bacteriological Analytical Manual, 1998. Actualizado a 2001)

Sembrar por duplicado 0,1 mL de las diluciones 1/10 y 1/100 en superficie en placas con agar YGC o DRBC. Distribuir el inóculo con una espátula de Drigalsky cuidadosamente (tener la precaución de enfriar bien la espátula para no matar los microorganismos).

Si se trata de alimentos con actividad de agua inferior a 0.95, se recomienda emplear agar DG18. Incubar las placas en oscuridad a 25°C durante 5 días. No invertir las placas ni apilar más de 3 placas.

Si a los 5 días no hubiera crecimiento, reincubar otras 48 h.

Seleccionar las placas de la dilución que contengan entre 10 y 150 colonias para realizar el recuento.

El límite superior para un buen recuento dependerá del tipo de crecimiento que prevalezca, mohos o levaduras, tamaño de colonias, y deberá ser decidido a discreción del analista en cada caso particular.

Notas:

- 1.- Eventualmente puede realizarse la siembra con el método de vertido en placa (por ejemplo, con agar YGC-extracto de levadura, glucosa y cloranfenicol). La técnica de siembra en superficie se considera más conveniente que la de vertido en placa. En este último caso, las colonias de hongos en la superficie crecen más rápido y, frecuentemente, enmascaran a las que crecen debajo de la superficie, resultando enumeraciones menos exactas. Además, los hongos son microorganismos aerobios, con lo cual su crecimiento se ve favorecido con la siembra en superficie.
- 2.- El agar DRBC debe ser empleado únicamente en siembra en superficie.
- 3.- No mover las placas durante la incubación hasta el recuento.
- 4.- Preferiblemente, no contar las placas antes de concluir el período de incubación, porque la manipulación de placas puede provocar crecimiento secundario por las esporas que se hubieran desprendido en el movimiento de la placa.
- 5.- Si se necesitara identificar las especies fúngicas, aislarlas en agar PDA (papa dextrosa) o MA (Agar Malta).

c 5) Recuento de *Staphylococcus aureus* (FIL 145:1990)

Sembrar por duplicado 0,1 mL de las diluciones 1/10 y 1/100 en superficie de placas de agar Baird Parker perfectamente secas. Distribuir el inóculo con una espátula de Drigalsky cuidadosamente (tener la precaución de enfriar bien la espátula para no matar los microorganismos). Dejar secar las placas tapadas sin invertir a temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos. Una vez secas, incubarlas invertidas a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h.

Tomar para enumerar placas con no más de 150 colonias.

Seleccionar un número representativo de colonias típicas y atípicas; y transferirlas a tubos de caldo infusión cerebro-corazón (BHI). Incubar a 37°C o 35°C por 20 a 24 h.

Identificación y confirmación

Sobre los cultivos puros de 20-24 horas, realizar:

1 - Tinción de Gram

2 - Catalasa

3 - Coagulasa (comparar con cepa patrón)

Agregar 0,1 mL del cultivo a aproximadamente 0,3 mL de plasma de conejo reconstituido en un tubo de hemólisis estéril. Incubar a $35\text{-}37^{\circ}\text{C}$. Examinar después de 4 a 6 horas. El coágulo formado debe ser firme y organizado (3+) o que no se cae al invertir el tubo (4+).

Realizar un control empleando 0,1 mL de caldo BHI estéril en lugar del cultivo. Para que el ensayo sea válido, no debe observarse ningún signo de coagulación.

4 - Termonucleasa: se realiza sobre la misma placa de Baird Parker.

S. aureus coagulasa positiva son cocos Gram positivos, catalasa positivo, coagulasa positivo (3 o 4+) y termonucleasa positivo.

Informar “UFC de *S. aureus* coagulasa positivo/g de muestra”, teniendo en cuenta el número de colonias confirmadas.

c 6) Determinación de *Salmonella* (FIL 93 A: 1985)

Preenriquecimiento en medio líquido

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un erlenmeyer con 225 mL de agua peptona tamponada a 45°C . Mezclar hasta lograr una buena dispersión. Asegurarse que la temperatura no supere los 45°C . Incubar a 37°C durante 16-20 h.

Enriquecimiento selectivo en medio líquido

Transferir 10 mL de preenriquecimiento a 100 mL de caldo tetratiónato (Müller Kauffmann). Incubar a $43\pm0,5^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h.

Transferir 10 mL del preenriquecimiento a 100 mL de caldo selenito-cistina. Incubar a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h.

Aislamiento en medio sólido

A partir de cada uno de los enriquecimientos estriar una placa de agar Verde Brillante-Rojo Fenol (agar BPLS) y una de agar Bismuto Sulfito (cuatro placas en total). Incubar las placas invertidas a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 20-24 h.

De ser necesario, seguir incubando los caldos de enriquecimiento 18-24 h más y volver a estriar en los medios de aislamiento.

Si al cabo del período de incubación el crecimiento en las placas fuera escaso, reincubar por 18-24 h adicionales a la misma temperatura.

Examinar las placas para investigar la presencia de colonias típicas de *Salmonella*.

Identificación y confirmación

De cada placa seleccionar cinco colonias sospechosas. Estriar en una placa de agar nutritivo para que desarrollen colonias aisladas. Incubar a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 h. Al cabo de la incubación, seleccionar colonias aisladas para proseguir con las pruebas de confirmación bioquímica y serológica.

Sobre el cultivo puro realizar:

- Tinción de Gram
- Oxidasa

Sembrar los cultivos que resulten bacilos cortos Gram negativos y oxidasa negativos en los siguientes medios.

- TSI: Sembrar por punción y en superficie. Incubar a 37°C , 24 h.
- LIA: Sembrar por punción y en superficie. Incubar a 37°C , 24 h.
- Caldo urea: incubar a 37°C , 24 h.
- Prueba de la β -galactosidasa: a partir de un cultivo en agar inclinado, tomar una ansada bien cargada y emulsionarla en 0,2 mL de solución salina fisiológica hasta conseguir una suspensión densa. Colocar un disco de ONPG. Incubar a 37°C durante 20 minutos. Observar hasta las 4 horas de incubación para dar un informe negativo. El color amarillo indica que la reacción es positiva.
- Caldo Clark y Lubs (RMVP): incubar 48 h a 37°C .
- Caldo triptona: incubar 24 h a 37°C .

De ser posible confirmar el resultado con un sistema de pruebas múltiples.

Confirmación serológica (Aglutinación somática)

Preparación del antígeno: utilizar un cultivo de estrías de 24 h de incubación a 37°C . Suspender el crecimiento de la estría con solución fisiológica.

Reacción: sobre portaobjetos depositar una gota de c/u de los sueros polivalentes somáticos. Colocar al lado de cada suero, una gota de suspensión antigénica. Mover suavemente el portaobjetos, permitiendo que las dos gotas se mezclen. No homogenizar con ansa ni con varilla, sólo con el movimiento.

Lectura: debe ser inmediata y no después de 5 minutos. Las reacciones tardías o dudosas no deben considerarse.

Emplear una cepa patrón de *Salmonella* sp. para controlar los medios de cultivo y los medios empleados en las pruebas de confirmación e identificación.

Informar ausencia o presencia de *Salmonella* sp. en 25 g.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS

NOMBRE Y DIRECCIÓN DEL LABORATORIO

.....
Fecha de informe:.....

DATOS DE CLIENTE

Nombre:..... Dirección.....
TE/Fax:..... Correo electrónico:.....

DATOS DE LA MUESTRA

Tipo de muestra:..... Marca:.....

Fecha de elaboración y/o de vencimiento:.....

Lugar de elaboración:..... N° de lote:.....

Características de la muestra*:.....

Fecha de toma de muestra:..... Fecha de inicio de análisis:.....

*Consignar datos relevantes, por ejemplo si es refrigerada, congelada, temperatura de recepción, si tiene signos de alteración, etc.

RESULTADOS DE LOS ANALISIS

Recuento de coliformes a 30°C (FIL 73 A:1985):

Recuento de coliformes a 45°C (APHA 1992, cap.24):

Recuento de *E. coli* (BAM, 1998, act 2001):

Recuento de mohos y levaduras (BAM, 1998, act 2001):

Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva (FIL 145:1990):

Determinación de *Salmonella* spp. en 25 g (FIL 93 A:1985):

CONCLUSIONES DE LA MUESTRA

.....
.....
.....
.....

RESULTADOS DEL LOTE

Determinaciones	Muestra				
	I	II	III	IV	V
Coliformes a 30°C/g					
Coliformes a 45°C/g					
<i>S. aureus</i> /g					
<i>Salmonella</i> /25g					
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> /25g					

Conclusión del lote

.....
.....

Firma y cargo del responsable

PATRÓN MICROBIOLÓGICO DE QUESOS

Artículo 605 - (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006)

Los quesos deberán cumplir los siguientes requisitos microbiológicos:

D. QUESOS CUARTIROLO, CREMOSO, CRIOLLO Y MINAS FRESCAL (46% < HUMEDAD < 55%):

Microorganismos	Criterio de Aceptación	Categoría ICMSF	Métodos de ensayo
Coliformes/g (30°C)	n=5; c=2; m=10000; M=100000	5	FIL 73A: 1985
Coliformes/g (45°C)	n=5; c=2; m=1000; M=5000	5	APHA 1992, c. 24 (1)
<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva/g	n=5; c=2; m=100; M=1000	5	FIL 145: 1990
<i>Salmonella</i> spp./25 g	n=5; c=0; m=0	10	FIL 93A: 1965
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g	n=5; c=0; m=0	10	FIL 143A: 1990

Listeria monocytogenes

Determinación de *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2004)

Enriquecimiento primario

Pesar asépticamente 25 g de muestra en un Erlenmeyer u otro recipiente aséptico. Agregar 225 mL de caldo de enriquecimiento Half Fraser. Mezclar hasta lograr una buena dispersión. Incubar a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h ± 2 h.

Enriquecimiento secundario

Subcultivar 0,1 mL del enriquecimiento primario en un tubo con 10 mL de caldo Fraser. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 h ± 3 h.

Aislamiento en medio sólido

El aislamiento se realiza a partir de ambos medios de enriquecimiento después de los correspondientes tiempos de incubación. Estriar en dos placas en paralelo: Agar Listeria según Ottaviani y Agosti (ALOA) y agar Palcam o agar Oxford. Incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 h ± 3 h. Si es necesario, incubar por 24 h ± 3 h adicionales. En ALOA, *Listeria* produce colonias azul turquesa rodeadas de un halo opaco. Las colonias típicas de *Listeria* spp. en agar Oxford están rodeadas de una zona marrón oscura o negra por hidrólisis de la esculina. En Palcam, las colonias típicas de *Listeria* spp. son de color gris verdoso con halo negro-parduzco (por hidrólisis de la esculina), sobre fondo rojo (porque no fermenta manitol).

Identificación

Transferir a agar triptona de soja con extracto de levadura (TSA-YE) un número representativo de las colonias típicas que resulten ser cepas bien aisladas y puras. A partir de este cultivo realizar:

- 1) Tinción de Gram. *Listeria* spp. son bacilos asporógenos, cortos y delgados Gram positivos.
- 2) Prueba de la catalasa. Picar una colonia y suspenderla en una solución de H_2O_2 al 3 % en un portaobjetos. *Listeria* spp. son catalasa positiva y se observa desprendimiento de burbujas de gas (oxígeno).
- 3) Hemólisis.

Secar bien la placa de hemólisis antes de sembrar. Dibujar una grilla en la parte de abajo de la placa de forma que queden entre 20 y 25 espacios por placa. Sembrar por punción los cultivos seleccionados anteriormente, uno en cada espacio, identificándolos. Conservar los cultivos puros en agar triptona de soja con extracto de levadura.

Simultáneamente sembrar controles positivos y negativos (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*). Después de 48 h de incubación a 37°C , examinar las placas. *L. monocytogenes* presenta zonas delgadas y débiles de aclaración (β -hemólisis); *L. ivanovii* generalmente forma una zona ancha y claramente delineada de β -hemólisis y *L. innocua* no debe formar zona de aclaración alrededor de la punción. Utilizar una luz brillante para examinar la hemólisis de los cultivos en estudio y de los controles.

4) Fermentación de ramnosa y de xilosa.

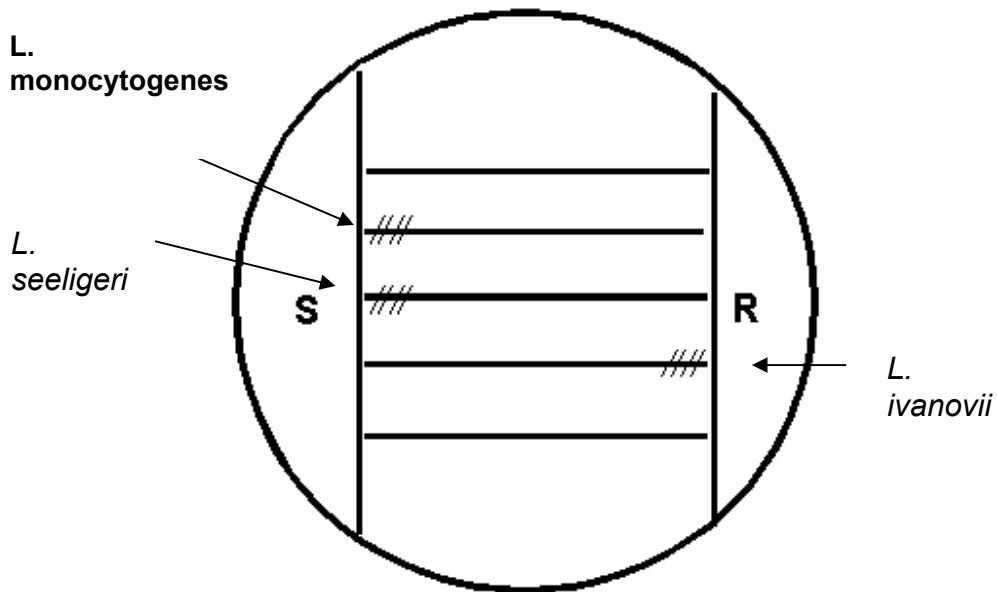
Sembrar tubos de caldo de fermentación de ramnosa y de xilosa. Incubar 24-48 h a 37°C para observar el viraje del indicador por producción de ácido. De ser necesario continuar incubando hasta 7 días.

5) Test de Camp

Se realiza sobre una placa de agar sangre. Se siembra en forma de fina estría un cultivo fresco de *Staphylococcus aureus* (S) y otra línea paralela de un cultivo fresco de *Rhodococcus equi* (R). Se

requiere un inóculo delgado y parejo, que se puede sembrar con un ansa recta o de rulo formando un ángulo recto con el agar. De la misma forma, se estrían transversalmente y sin llegar a atravesar las estrías ya hechas, los cultivos en estudio y los controles de *Listeria monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* (las tres hemolíticas) y *L. innocua* (no hemolítica) (ver esquema).

Una reacción Camp positiva se observa por aumento de la hemólisis en la zona cercana a *S. aureus* o *R. equi*. De cualquier forma, la apariencia del resultado positivo depende del cultivo. Una reacción positiva con *R. equi* se ve como una zona ancha (5 a 10 mm) de hemólisis con forma de punta de flecha. Se deben tomar como negativas las reacciones que den zonas angostas (alrededor de 1 mm) de débil hemólisis en la intersección con *R. equi*. Una reacción positiva con *S. aureus* se ve como una zona pequeña y redondeada de incremento de hemólisis que se extiende solamente unos 2 mm desde la cepa de ensayo y entre la zona de débil hemólisis debida al crecimiento de la estría de *S. aureus*.



Resultados característicos de las especies hemolíticas

Especies	Camp Test		Xilosa	Ramnosa
	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>		
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	+	-

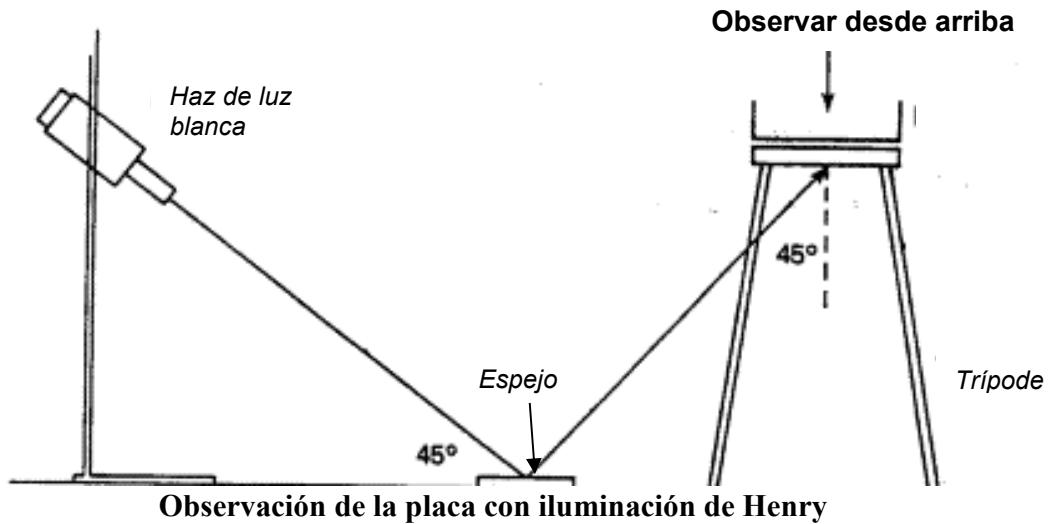
Pruebas adicionales para *Listeria*

Se pueden realizar las siguientes pruebas complementarias: (reacción característica de *Listeria* spp.)

- Crecimiento típico en agar triptona de soja - extracto de levadura

Seleccionar cinco colonias típicas de cada placa de aislamiento y estriarlas en placas de agar triptona de soja-extracto de levadura (las placas deben ser muy finas) para obtener colonias aisladas. Incubar por 24 h a 37°C o hasta que se desarrolle un buen crecimiento.

Examinar las placas con iluminación de Henry.



Al ser examinadas con luz de Henry, las colonias de *Listeria* spp. muestran un color azul y una superficie granular.

- Movilidad a 25°C

Otra característica típica es la movilidad de los cultivos incubados a 25-30°C. Se puede observar en un preparado en fresco suspendiendo una colonia típica en solución salina al 0,85 % (bacilos delgados y cortos con débil rotación y movimiento en forma de volteo). También se comprueba la movilidad, sembrando por punción un agar movilidad (o agar SIM) e incubando hasta 5 días a 25°C. Se observa una movilidad típica en forma de paraguas.

- Hidrólisis de esculina (+)
- Utilización de glucosa: medio O/F (+)
- Fermentación de manitol (-)
- Reducción de nitrato (-)
- Rojo de Metilo-Voges Proskauer (+/+/+)
- Oxidasa (+)

Escherichia coli O157:H7

Determinación de *Escherichia coli* 0157:H7 (adaptado de USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook. Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges (Revision # 9; 15-01-15). William C. Cray, Jr., Douglas O. Abbott, Frankie J. Beacorn, and Steven T. Benson

Este método se emplea para el análisis de *Escherichia coli* O157:H7 y O157:NM en productos cárnicos crudos o listos para consumir. Está basado en un enriquecimiento en un caldo selectivo, seguido por un ensayo rápido de screening, continuando con la separación inmunomagnética (IMS) en columnas paramagnéticas y el aislamiento en medios altamente selectivos.

Escherichia coli O157:H7/NM es un patógeno con dosis infectivas muy bajas (la ingestión de 100 células puede causar la enfermedad). Trabajar con estas cepas demanda obligatoriamente el uso de guantes y anteojos de protección. Asimismo, todas las superficies deben ser perfectamente desinfectadas antes y después del uso.

a) Enriquecimiento

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de Stomacher. Agregar 225 mL de caldo TSB modificado con novobiocina (mTSB o mTSB+n). Homogenizar. Incubar sin agitación a $42\pm1^{\circ}\text{C}$ por 15-24 h. Incluir controles: uno positivo (cepa control de *Escherichia coli* O157:H7), uno negativo (cepa de *Escherichia coli* no O157) y un medio sin sembrar.

Se registrarán todas las reacciones observadas en la muestra y en los controles.

b) Test de screening.

Se emplean dispositivos comerciales de ensayos rápidos para demostrar la presencia de cepas con antígeno O157 en el caldo de enriquecimiento (a).

La norma recomienda dos metodologías de screening:

- **Sistema de PCR en tiempo real Bax® para *E. coli* O157:H7.**
- **Sistema inmunocromatográfico RapidCheck®.**

Las muestras negativas se informan “ausencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM en 25 gramos” y se descartan.

Las muestras positivas se consideran potenciales positivos. Se procede al aislamiento e identificación a partir del caldo de enriquecimiento (a).

c) Aislamiento

Previo al aislamiento, se realiza una separación inmunomagnética (IMS). De esta forma se incrementa notablemente la sensibilidad del método, comparado a la forma tradicional de siembra directa en medios de aislamiento. Para tal fin se emplean pequeñas esferitas magnéticas recubiertas con anticuerpo anti-*E. coli* O157. La metodología recomienda Dynal® # 710.04 anti-*E. coli* O157 (Dynal Inc., Lake Success, NY 11042). La muestra y los controles se ponen en contacto con estas esferas inmunomagnéticas y luego se hacen pasar por una columna de separación que retiene las esferas. Posteriormente se eluyen las esferas de cada columna y se siembran en el medio selectivo.

Se procede al aislamiento en medio sólido. Los medios se basan en dos características diferenciales de la mayoría de las cepas de *E. coli* O157: no fermentan sorbitol y no tienen actividad β -D-glucuronidasa.

La metodología recomienda la utilización de Agar Rainbow modificado (mRBA) contiene novobiocina, cefixime trihidrato y telurito de potasio como agentes selectivos y dos sustratos cromogénicos como agentes diferenciales. Los sustratos cromogénicos son específicos para dos enzimas asociadas a *E. coli*: β -galactosidasa (azul/negro) y β -glucuronidasa (rojo).

Las placas se incuban a 20-24 h a $35\pm2^{\circ}\text{C}$. Las colonias típicas de *E. coli* O157:H7 son negras o grises (β -galactosidasa +, β -glucuronidasa -). Las colonias típicas de *E. coli* no toxigénica son rosas o magenta.

Otros medios de aislamiento de *E. coli* O157:H7:

- a) Agar Mac Conkey-sorbitol (SMAC). El medio contiene sorbitol como azúcar fermentescible e inhibidores de flora no entérica. Las colonias son sorbitol negativas y aparecen pálidas, comparadas con las rosadas brillantes que son sorbitol positivas. Cuando la muestra contiene una carga alta de coliformes se puede enmascarar la presencia de *E. coli* O157:H7. Incluso, *Escherichia hermanii* y otras enterobacterias pueden presentar fenotipos similares en SMAC y, por otra parte, *Citrobacter freundii* puede aglutinar con suero O157, y, causar un falso positivo.
- b) Agar HC (agar para cepas hemorrágicas). El medio contiene sorbitol y reactivo fluorogénico MUG (4 metil, umbeliferil, β -D-glucurónido).
- c) Agar Mac Conkey sorbitol-BCIG. El medio contiene sorbitol y un compuesto β -D-glucurónido cromogénico.
- d) Agar CT Mac Conkey sorbitol. El medio es similar al a), pero contiene agentes selectivos (cefixime y telurito). Con el empleo de este medio se gana sensiblemente en selectividad, inhibiéndose notablemente la flora acompañante. La colonia típica es pálida como en a).

Se identifican las colonias características de *E. coli* O157:H7/NM y se les realiza el ensayo de aglutinación en látex para O157 según las indicaciones del proveedor del reactivo. Las muestras de las que no se obtengan colonias típicas o las que dieron negativo en el test de aglutinación en látex se informan como “**ausencia de *Escherichia coli* O157:H7/NM en 25 gramos**”.

Las muestras positivas se reaislan en Agar sangre de oveja (BSA), se incuban 16-24 h a $35\pm2^{\circ}\text{C}$ y se procede a la identificación, incluyendo:

- Identificación por pruebas bioquímicas. La metodología recomienda la utilización de una galería de pruebas bioquímicas miniaturizadas VITEK®.
- Confirmación por aglutinación en látex de los antígenos O157 (somático) y H7 (flagelar). La metodología recomienda la utilización del kit RIM® *E. coli* O157:H7.
- Confirmación de la presencia de las toxinas Shiga o de los genes responsables de su biosíntesis. Para la detección de la toxina, la metodología recomienda la utilización del kit Meridian Premier® EHEC. En reemplazo de esto, se puede realizar la confirmación de los genes de toxina (*stx* y *eae*) utilizando un ensayo de PCR en tiempo real (la metodología recomienda la utilización del sistema BAX®).

Reacciones bioquímicas características de *Escherichia coli* O157:H7:

- TSI (amarillo/amarillo, H_2S negativo)
- Fermentación de sorbitol (negativo)
- Fermentación de celobiosa (negativo)
- Caldo triptona (indol positivo)

- Medio RM-VP (RM: positivo; VP: negativo)
- Citrato de Simmons (negativo)
- Lisina descarboxilasa (positivo) *
- Ornitina descarboxilasa (positivo)*
- Medio descarboxilasa base (negativo)
- Medio movilidad (+/-)

Todos los medios se incuban a 35°C. Los medios con azúcares deben leerse a las 24 horas.

*Los caldos descarboxilasa deben llevar un sello de vaselina. Los positivos son púrpura (medio básico por descarboxilación) y el negativo es amarillo (por acidificación por fermentación de la glucosa del medio).

Se considera confirmada la presencia de *E. coli* O157:H7 cuando hubo confirmación bioquímica, serológica y de presencia de toxinas Shiga o de uno o más genes de toxina Shiga.

GUÍAS DE ESTUDIO

GUÍA DE ESTUDIO I

1. ¿Cómo clasifica a los microorganismos de acuerdo con su temperatura óptima de crecimiento?
2. ¿Cuál es el pH óptimo de crecimiento para bacterias? ¿y para mohos y levaduras?
3. ¿Por qué no puede emplearse agua destilada para hacer una suspensión microbiana? ¿qué líquido emplearía?
4. ¿Qué es un medio químicamente definido y en qué casos se lo emplea?
5. ¿A qué se llama un medio de cultivo complejo? Cite tres ejemplos de medios complejos que vaya a emplear para la detección de patógenos.
6. ¿Qué características tienen los medios empleados para el cultivo de anaerobios? ¿Qué es una jarra de anaerobiosis y para qué se utiliza?
7. Defina medio de cultivo selectivo. Cite un ejemplo de medio selectivo que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
8. Defina medio de cultivo diferencial. Cite un ejemplo de medio diferencial que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
9. Defina medio de cultivo de enriquecimiento. Cite ejemplos de medios de enriquecimiento que vaya a emplear en la práctica de patógenos.
10. Clasificación e identificación de microorganismos. ¿Qué información brinda cada una de las siguientes pruebas?
 - a) Observación microscópica
 - b) Tinción de Gram
 - c) Pruebas bioquímicas
 - d) Serología
11. Diagrame un esquema para el aislamiento e identificación de microorganismos a partir de una muestra de alimento, mencionando las etapas necesarias en la marcha.
12. Complete el siguiente cuadro comparativo de métodos de recuento microbiano:

	Ventajas	Desventajas
Recuento en placa / siembra por vertido en placa		
Recuento en placa / siembra en superficie		
Recuento por filtración por membrana		
Recuento por técnica del número más probable		
Recuento microscópico directo		

GUÍA DE ESTUDIO II

1. Complete la siguiente tabla:

Microorganismo	Agar de aislamiento	Agente selectivo	Agente diferencial	Colonia característica
<i>S. aureus</i>	Baird Parker			
	110			
<i>Salmonella</i>	Bismuto sulfito			
	BPLS			
	XLD			
<i>Clostridium perfringens</i>	SPS			
	TSN			

2. Complete la siguiente tabla:

Microorganismo	Pruebas de identificación	Reacción característica
<i>S. aureus</i>		
<i>Salmonella</i>		
<i>Clostridium perfringens</i>		

3. Complete el cuadro:

Microorganismo	Características del microorganismo	Enfermedad (ETA) asociada	Reservorios y transmisión	Alimentos asociados a brotes
<i>S. aureus</i>				
<i>Salmonella</i>				
<i>Clostridium perfringens</i>				
<i>Clostridium botulinum</i>				
<i>Bacillus cereus</i>				

<i>Listeria monocytogenes</i>				
<i>Escherichia coli</i> O157:H7				

4. Considerando la investigación de los microorganismos del punto 3 en un alimento, señale para cuáles considera apropiado hacer una prueba de ausencia/presencia y para cuáles un recuento. Justifique.
5. Esquematice una marcha de ausencia/presencia y una de recuento. Señale las diferencias entre ellas.
6. ¿En qué circunstancias se justifica la investigación de enterotoxina de *S. aureus* en la muestra de alimento? Justifique brevemente.
7. Esquematice una marcha para la determinación de *Clostridium perfringens* en un alimento. Cite los medios de cultivo y las reacciones características esperadas para cada uno de ellos. Justifique sus respuestas.
8. En la marcha de determinación de *Salmonella* de una muestra de leche en polvo, un analista aisló cuatro colonias características a partir de los medios sólidos. En el cuadro siguiente se adjuntan los resultados de las pruebas de identificación que ensayó sobre cada una de las cuatro cepas aisladas:

Pruebas de identificación	Colonia			
	I	II	III	IV
Tinción de Gram	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -	Bacilo Gram -
Oxidasa	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
TSI	Alcalino/ácido, SH ₂	Ácido/ácido	Alcalino/ácido	Alcalino/ácido, SH ₂
LIA	Alcalino/alcalino	Alcalino/ácido	Alcalino/alcalino	Precipitado pardo rojizo/ácido, SH ₂
Utilización de urea	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo

- a) ¿Cuál o cuáles colonias pueden corresponder a *Salmonella*? Justifique. ¿Qué otras determinaciones Ud. tendría que realizar para asegurar este informe?
- b) ¿Considera que el analista realizó determinaciones innecesarias? En caso afirmativo, diga cuáles y por qué.
- c) ¿Qué medios sólidos de aislamiento pudo haber empleado el analista? ¿Cómo hubieran sido las colonias características en cada uno de ellos?
- d) En los medios citados en c), ¿cuál sería el aspecto de las colonias de *E. coli* y de *Proteus*?

GUÍA DE ESTUDIO III

1. ¿Qué recomendaciones daría al administrador de un edificio si el análisis de agua hubiera dado un elevado recuento de coliformes?

2. Calcular el valor del recuento total de bacterias aerobias mesófilas para las muestras A, B y C, si al realizar el recuento de aerobios mesófilos se obtienen los siguientes resultados.

Dilución	Nº de colonias por placa		
	A	B	C
1/100	890/921	0/0	208/160
1/1000	175/197	0/0	40/48
1/10000	43/50	0/0	3/12

3. En una muestra de helados se hace NMP (series de tres tubos) de coliformes totales a 30°C, coliformes a 45°C y *E. coli*. Se observan los siguientes tubos positivos:

Determinación	1/100	1/1000	1/10000
Coliformes totales	3	3	2
Coliformes a 45°C	3	2	0
<i>E. coli</i>	1	0	0

- a) Informar los resultados de las 3 determinaciones.
- b) Indique los medios empleados en cada determinación y la reacción positiva típica.
- c) Nombre por lo menos dos géneros bacterianos que componen la flora acompañante en el medio de aislamiento de *E. coli* y que pueden distinguirse por las reacciones de identificación de este microorganismo.

4. Una fábrica compra un polvo base para postres. Evalúa la aceptabilidad según el siguiente programa de muestreo (“m” y “M” se expresan por gramo de muestra):

Ánálisis	Categoría	n	c	m	M
Aerobios totales	2	5	2	10^3	10^5
<i>E. coli</i>	5	5	2	<3	10
<i>Clostridium perfringens</i>	8	5	1	10^2	10^4
<i>Salmonella</i>	11	10	0	0	

- a) Indique qué método emplea en cada determinación (recuento en placa, ausencia/presencia, NMP), cuáles son las unidades para la expresión del resultado y comente sobre las situaciones en que se aplica cada uno.
- b) En la tabla siguiente figuran los datos de recuentos de aerobios mesófilos para las cinco muestras. Completar la tabla. ¿Resulta aceptable el lote para recuento total de aerobios mesófilos? Justifique.

Muestra	Recuento en las placas	UFC/g de muestra	Clase de muestra
A	1/10: MNPC; 1/100: 458/342		
B	1/10: 193/207; 1/100: 23/20		
C	1/10: 235/165; 1/100: 22/16		
D	1/10: 22/24; 1/100: 0/2		
E	1/10: 0/0; 1/100: 0/0		

c) Para determinar *E. coli*, se siembran diferentes combinaciones de diluciones para cada muestra y se obtienen los siguientes resultados. Completar la tabla. ¿Considera que el lote es aceptable para esta determinación? ¿Por qué?

Muestra	Recuento de <i>E. coli</i>
A	10 mL 1/10: 3/3; 1 mL 1/10: 1/3; 1 mL 1/100: 0/3
B	1 mL 1/100: 2/3; 1 mL 1/1000: 0/3; 0,1 mL 1/1000: 0/3
C	1 mL 1/10: 2/3; 1 mL 1/100: 0/3; 1 mL 1/1000: 0/3
D	1 mL 1/10: 0/3; 1 mL 1/100: 0/3; 1 mL 1/1000: 0/3
E	1 mL 1/100: 1/3; 1 mL 1/1000: 0/3; 1 mL 1/10000: 0/3

d) La empresa usa este polvo para fabricar postres. Mezcla el polvo con agua, lo cocina, lo enfriá, lo envasa y los vende refrigerados. Sabe que el valor promedio de aerobios totales en este producto al final de su vida útil es de 100/g. ¿Qué puede comentar sobre un producto que al final de la vida útil presenta un recuento de 10^5 /g?

e) Identificar en el plan de muestreo para el polvo para postres cuáles son los microorganismos indicadores, y comentar sobre su significado. Identificar los microorganismos patógenos.

5. Se recibe un lote de leche en polvo y es necesario saber si resulta aceptable según la siguiente norma.

Determinación	Categoría	n	c	m (UFC/g)	M (UFC/g)
Aerobios mesófilos	2	5	2	50000	500000
Coliformes totales	5	5	2	3	100
<i>S. aureus</i>	9	10	1	10	100
<i>Salmonella</i>	15	60	0	0	-

Responder Verdadero o Falso y justificar brevemente la respuesta en todos los casos:

- a) Tanto para *S. aureus* como para *Salmonella* se hacen pruebas de ausencia/presencia.
- b) La determinación de coliformes totales se podría realizar sembrando 1 mL de la dilución 1/10 y 1 mL de la dilución 1/100 por duplicado (método de recuento en placa), siguiendo la metodología correspondiente.

c) En la determinación de *Salmonella*, las condiciones de incubación del enriquecimiento selectivo son críticas para la recuperación óptima. Debe controlarse exactamente el tiempo y la temperatura, que nunca debe exceder los 37°C.

6. Completar teniendo en cuenta los fundamentos de la determinación de *Listeria monocytogenes* y de *Escherichia coli* O157:H7 en alimentos. Indicar, cuando corresponda, agentes selectivos, diferenciales, colonias características, reacciones positivas.

Listeria monocytogenes

Medios de aislamiento:

- Agar Palcam
- Agar Oxford
- Agar ALOA

Pruebas de identificación

-
-
-
-
-

Escherichia coli O157:H7

Medios de aislamiento

- Mc Conkey sorbitol
- Fluorocult *E. coli* O157:H7
- Agar Rainbow

Pruebas de identificación

-
-
-
-

ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE LECHE FLUIDA

El Código Alimentario Argentino vigente, define con el nombre de "leche", sin calificativo alguno, al producto obtenido por el ordeño total e ininterrumpido, en condiciones de higiene, de la vaca lechera en buen estado de salud y alimentación, proveniente de tambos inscriptos y habilitados y sin aditivos de ninguna especie (CAA, Art. 554).

La leche proveniente de otros animales deberá denominarse con el nombre de la especie productora.

Finalidad del análisis

Las determinaciones que se realizan comúnmente en el análisis físico-químico de la leche, permiten comprobar si sus valores responden a los característicos de composición genuina, poner al descubrimiento alteraciones y adulteraciones o fraudes e indicar (entre ciertos límites) el estado de conservación.

Un examen rutinario incluye frecuentemente las determinaciones de densidad, grasa, sólidos totales, acidez, descenso crioscópico, estimación del grado de contaminación (ensayos de azul de metileno o resazurina).

Preparación de la muestra (AOAC 925.21, 1990)

Antes de tomar porciones para el análisis, llevar la muestra a aproximadamente 20°C y mezclar por traspase a otro recipiente limpio, repitiendo la operación hasta asegurar una muestra homogénea. Si no han desaparecido los grumos de crema, entibiar la muestra en baño de agua hasta casi 38 °C, mezclar y luego enfriar a 15-20 °C. En caso de tener que medir un volumen para alguna determinación, llevar la muestra a esa temperatura antes de tomar la alícuota correspondiente.

1) Densidad

Puede determinarse con balanza hidrostática, picnómetro o lactodensímetro, a la temperatura de 15 °C.

Determinación de densidad con lactodensímetro (AOAC 925.22, 1990)

Se vierte la leche preparada para el análisis, en un recipiente cilíndrico, evitando formación de espuma e incorporación de aire. Introducir el lactodensímetro de modo que ocupe la parte central del líquido, se espera a que alcance el nivel correspondiente y luego se lee la densidad cuidando que el visual enrase con la superficie libre de la leche. Leer la temperatura.

Un tipo difundido de lactodensímetro, es el Quevenne, cuyo vástago con escala graduada comprende valores entre 15 y 40 que corresponden a las milésimas de densidad por encima de la unidad, es decir, que el número 32 del lactodensímetro indica la densidad 1,032.

El instrumento está calibrado a 15 °C y a esa temperatura, por lo tanto, el número leído representa la densidad de la leche. A temperaturas diferentes, debe recurrirse a tablas especiales de corrección.

Cuando la discrepancia con respecto a los 15 °C no es mucha (no más de ± 5 °C), se puede obtener la corrección sumando o restando 0,0002 a la densidad hallada, o bien 0,2 a los grados leídos en el lactodensímetro, por cada grado de temperatura respectivamente superior o inferior a 15°.

2) Materia grasa

Método de Gerber (CAA, Tomo II, 13-8, 1989)

Este método volumétrico, muy difundido en el control de rutina de leche, en especial, y de productos lácteos en general, consiste en la separación de la materia grasa por disolución en ácido sulfúrico de todos los componentes, seguida por centrifugación en tubos especialmente calibrados.

El método emplea también alcohol amílico, que ayuda a romper la emulsión de las grasas y previene la carbonización de las mismas.

Reactivos:

- H_2SO_4 para Gerber (dens. 1,813-1,817 a 20 - aprox. 90 %)
- Alcohol amílico puro (dens. 0,809-0,813 a 20°), libre de grasa.

Medir con pipeta 11 ml de H_2SO_4 para Gerber e introducirlos en el butirómetro evitando mojar las paredes internas del cuello. Luego, agregar con rapidez 11 ml de leche con pipeta aforada, cuidando que forme un estrato encima del ácido y no se mezcle con él, e inmediatamente agregar 1 ml de alcohol amílico. Se tapa el butirómetro con el tapón especial correspondiente y se agita en forma efectiva, pero con cuidado (*), teniendo en cuenta que se produce una fuerte elevación de la temperatura. Se pone el butirómetro en un baño de agua a 65-70 °C por 5-10 min. (con el tapón hacia abajo). Retirado del baño, se seca exteriormente y se centrifuga 3-5 min. La centrifugación consiste en un plato chato en el cual, mediante tubos metálicos, se adaptan los butirómetros dispuestos de forma tal que los tapones de cierre queden dirigidos hacia afuera y la porción graduada hacia el eje de la centrifugadora. Se vuelve al baño de agua por 4-5 min., se lee inmediatamente el espesor de la capa de grasa acumulada en la parte superior calibrada del butirómetro. Por ajuste adecuado del tapón de cierre, se puede hacer coincidir la base de la columna de grasa con el cero de la escala. Leyendo a la altura del menisco de la columna de grasa, se obtiene directamente el % de grasa de leche. Si no es posible ajustar la superficie inferior de la columna de grasa a cero, se ajusta a la marca de % completo más próxima, y se tiene en cuenta al efectuar la lectura del menisco superior.

(*) Para proteger la mano del calor que se desprende, conviene tomar el butirómetro con un trapo, sujetando con el dedo pulgar el tapón de goma, con firme presión. Los tres líquidos del interior se mezclan volteando varias veces el butirómetro. En algunos casos, se forman coágulos proteicos que persisten; los mismos se eliminan agitando (siempre con precaución) fuertemente, después de un tiempo prudencial.

Nota 1: Siendo difícil la separación de los glóbulos pequeños de grasa en leches "homogeneizadas", se recomienda volver a centrifugar después de calentar en baño de 65-70 °C, procediendo así hasta que la lectura alcance un máximo.

Nota 2: Se recomienda la realización de éste ensayo por duplicado simultáneo, sirviendo cada butirómetro como mutuo contrapeso para el equilibrio de la centrifugadora.

3) Extracto seco (Sólidos totales) (AOAC, 925.23, 2000)

Lo constituye el residuo remanente de la evaporación de las materias volátiles de la leche a la temperatura de ebullición del agua.

A un cristalizador de diámetro no menor de 5 cm se agrega arena calcinada de manera que quede una capa delgada en el fondo del mismo. El conjunto se seca en estufa a 100 °C durante 1 hora, se enfriá y tara, luego se agregan al cristalizador 5,0 mL de leche, exactamente medidos, y se pesa nuevamente. Evaporar en baño de agua hiriente durante 10-15 min., exponiendo a la acción del vapor la máxima superficie posible del fondo del recipiente. Colocar luego en estufa de 98-100 °C,

secando hasta constancia de peso. En todos los casos enfriar en desecador y pesar rápidamente.

Referir el residuo a % en volumen de muestra (usando la densidad de la muestra), informándolo como "sólidos totales".

4) Extracto seco no graso (CAA, Tomo II, 13.9, 1989)

Se determina por diferencia de los valores porcentuales de extracto seco y de grasa, obtenidos anteriormente (a la hora de calcular esta diferencia tener en cuenta que las unidades del extracto seco y de grasa sean coherentes).

El valor del extracto seco no graso (ESNG) constituye un valor bastante constante para todas las leches, debido a que dentro del conjunto de sustancias que forman el extracto seco total, el tenor graso es el más variable.

Si el valor de % ESNG hallado resultara inferior al especificado en el CAA, deberá calcularse el % de aguado como:

$$\% \text{ Aguado} = 100 \times \left(\frac{\% \text{ESNG}_{CAA} - \% \text{ESNG}}{\% \text{ESNG}_{CAA}} \right)$$

5) Acidez (AOAC, 947.05, 1990)

La leche fresca, en estado normal, no contiene prácticamente ácido láctico. Al determinarse la acidez total, el gasto de álcali es debido al CO₂ disuelto, fosfatos ácidos, proteínas (principalmente caseína), y citratos ácidos contenidos en la leche. El ácido láctico producido durante el "agriado", se debe fundamentalmente a la acción de microorganismos del tipo de los estreptococos lácticos, sobre la lactosa.

Reactivos :

- Solución de NaOH 0,1 N valorada.
- Solución de fenolftaleína 0,5 % en etanol 95 %.

Medir con pipeta aforada, 10,0 ml de muestra y colocarlos en una cápsula de porcelana, o en un erlenmeyer de 50 ml. Añadir 1 ml de fenolftaleína. Titular con bureta de 10 ml con NaOH 0,1 N hasta aparición de color rosa débil persistente (utilizar como contraste el interior blanco de la cápsula o un papel blanco).

Los resultados se expresan en ácido láctico % de muestra (p/v).

Para expresar la acidez en grados Dornic (forma corriente en la industria láctea), se multiplica por 100 el resultado anterior.

6) Ensayo de azul de metileno (Egan H., Kirk R., Sawyer R., 1987)

Sirve entre ciertos límites, para indicar el grado de conservación y pureza de la leche, usando una prueba química para completar el examen bacteriológico, siendo éste ensayo considerado como una medida de la contaminación bacteriana.

En un tubo de ensayo (ancho), se vierten 40 ml de leche, 1 ml de azul de metileno. El tubo de ensayo se mantiene a 38-40 °C, para proteger la muestra durante el ensayo deberá colocarse un tapón de algodón.

Obsérvese el tiempo necesario para obtener la decoloración, haciendo caso omiso de lo que ocurre en la capa superior de leche contenida en el tubo. En base a ese tiempo se puede llegar a las siguientes conclusiones:

1- leche muy mala: si no conserva el color más de 20 min.

- 2- leche mala: si conserva el color de 20 min. a 2 h.
- 3- leche mediocre: si conserva el color de 2 h. a 5 1/2 h.
- 4- leche buena: si conserva el color por más de 5 1/2 h.

7) Determinación de pH (CAA, Tomo II, 13.10, 1989)

Se medirá el pH con pH-metro. Se realiza la calibración del equipo por medio de buffers adecuados (pH 4,00 y pH 7,00), y luego se procede directamente a la medición del valor de pH correspondiente a la muestra en estudio. (Consultar al personal docente para el uso del equipo).

8) Ánalisis de la Fosfatasa Alcalina

La determinación de fosfatasa alcalina está destinada a decidir si un producto lácteo ha sido pasteurizado en condiciones de tiempo y temperatura adecuadas. El CAA y las Normas Mercosur exigen que la prueba de fosfatasa alcalina en productos lácteos dé negativa.

a) *Preparación de muestra:*

- leche en polvo: reconstituir aprox. 1g en 10 mL de agua (mantener la temperatura por debajo de 35°C).
- leche fluida: tal cual
- manteca: pesar aprox. 1 g de muestra, extraerla por debajo de la superficie con un cuchillo limpio.
- crema de leche: tal cual

Nota: si las muestras quedaran turbias, filtrar por papel. La centrifugación no da buenos resultados.

b) *Medición actividad enzimática*

- Fundamento del método:**

La determinación de actividad fosfatasa se basa en la hidrólisis enzimática, en medio alcalino, del fenilfosfato disódico (NaFF) a fenol y posterior determinación visual del color del fenol liberado con 4-aminoantipirina (4-aminofenazona) y ferricianuro como agente oxidante.

- Reactivos**

- solución sustrato: NaFF (1.4 mM) en buffer de pH 10 de aminometilpropanol (3 M) y 4-aminoantipirina (29 mM). Conservar en heladera durante no más de 5 meses.
- reactivo de color: ferricianuro de K (10 mM). Estable durante 5 meses a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.
- estandar: solución de fenol (200 UI/L)

- Procedimiento:**

Preincubar 0.5 mL de solución de sustrato unos minutos a 37°C. Luego, agregar 50 μ L de muestra, mezclar e incubar exactamente 10 min¹. Realizar paralelamente el estandar y un blanco de reactivos. Agregar 2.5 mL de reactivo de color y retirar los tubos del baño.

Esquemáticamente:

	Blanco	Estándar	Muestra
Sustrato (mL)	0,5	0,5	0,5

Incubar a 37°C en baño de H₂O x 4 min

	Blanco	Estándar	Muestra
Muestra (μL)	-----	-----	50
Estándar (μL)	-----	50	-----
H ₂ O destilada (μL)	50	-----	-----

Mezclar bien (vortex). Incubar a 37°C x 10 min exactos

	Blanco	Estándar	Muestra
Reactivos color (mL)	2,5	2,5	2,5

Mezclar inmediatamente (vortex)

Observar el color

MODELO DE INFORME

Fecha de entrega:

Nombre y apellido:

NOMBRE DE LA PRÁCTICA

Muestra analizada.....
Características:.....

DETERMINACIONES REALIZADAS:

- a) Nombre de la determinación (referencia de la metodología). Resultado obtenido
- CONCLUSIONES**
- b) Con los datos y la información de la muestra, deberá calcular los parámetros fisicoquímicos y realizar la comparación y análisis de ellos con el Código Alimentario Argentino y/o rotulado nutricional, según corresponda. Así mismo deberá concluir sobre el Estado de conservación, Composición genuina, Alteraciones, adulteraciones y/o fraude.
- c) En caso de contar con el rotulado, copiar los valores dados en el rotulado nutricional y comparar con los resultados obtenidos.

ANEXO DE DATOS DE LABORATORIO

Deberá anexar los cálculos realizados en las determinaciones que así lo requieren

- a) Nombre de la determinación
- b) Datos de laboratorio (masa de muestra, pesadas, diluciones, etc.), cuentas.
- c) Resultado obtenido
- d) OBSERVACIONES

Artículo 555 - (Resolución Conjunta SPReI N°252/2014 y SAGyP N° 218/2014)

“La leche destinada a ser consumida como tal o la destinada a la elaboración de leches y productos lácteos, deberá presentar las siguientes características físicas y químicas:

Requisito	Valores aceptados	Método de análisis
Densidad a 15°C	1,028 a 1,034	AOAC 18th Ed. 925.22
Materia grasa (*) (g/100cm ³)	Mín. 3,0	ISO 1211/IDF 001:2010
Extracto Seco No Graso (**) (g/100g)	Mín. 8,2	ISO 6731/IDF 021:2010
Acidez (g. Ácido láctico/100cm ³)	0,14 a 0,18	AOAC 18th Ed. 947.05
Descenso crioscópico	Máx. -0,512 °C (equivalente a -0,530°H)	ISO 5764 – IDF 108:2009
Proteínas Totales (N x 6,38) (**) (g/ 100g)	Mín. 2,9	ISO 8968 – 2 – IDF 020-2:2001

(*) En condiciones excepcionales podrá ser comercializada leche con un contenido graso inferior al 3% si la autoridad sanitaria provincial, previo estudio de evaluación, lo considera aceptable para su jurisdicción. En dicho caso el contenido de materia grasa deberá ser declarado en el rotulado con letras de buen tamaño realce y visibilidad. (**) Podrá ser expresado en su equivalente en g/100cm³ tomando para la conversión el valor de densidad (a 15°C) correspondiente.