

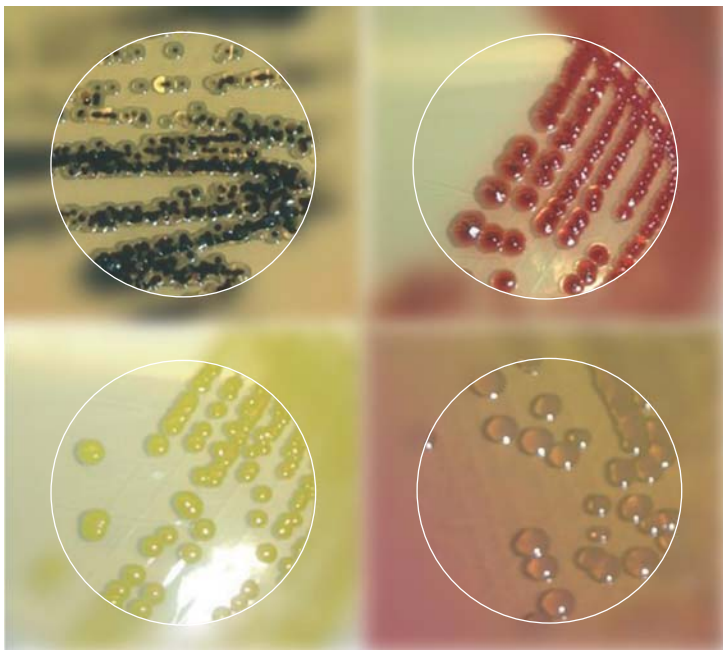
# ANÀLISI MICROBIOLÒGICA I HIGIENE DELS ALIMENTS

Núria Rius Bofill (coordinació)

Núria Rius Bofill

Mercedes Berlanga Herranz

Ana M. Marqués Villavecchia



# ANÀLISI MICROBIOLÒGICA I HIGIENE DELS ALIMENTS

Núria Rius Bofill (coordinació)  
Núria Rius Bofill  
Mercedes Berlanga Herranz  
Ana M. Marqués Villavecchia



# INTRODUCCIÓ

Els aliments que consumeix l'home són principalment d'origen vegetal i animal. Coneixent els microorganismes que acompanyen els aliments en el seu estat natural i les manipulacions a les quals seran sotmesos es pot predir quins microorganismes hi haurà en un determinat producte alimentari després de la seva elaboració.

Molts aliments s'obtenen gràcies a l'acció controlada de determinats microorganismes. En alguns casos en són contaminants naturals i en d'altres són afegits expressament durant la seva fabricació o producció. Ara bé, els microorganismes també juguen un paper important en l'alteració dels aliments. La contaminació microbiana d'un aliment pot tenir conseqüències més o menys greus; des de la pèrdua de les seves característiques organolèptiques fins a la producció en el consumidor d'intoxicacions i toxoinfeccions greus i inclús la mort.

La contaminació microbiana dependrà dels següents factors: (1) origen de les primeres matèries; (2) la seva qualitat microbiològica en estat fresc o no elaborat; (3) condicions sanitàries durant la manipulació i elaboració del producte; i (4) condicions d'envasament, transport i emmagatzematge del producte acabat.

Els microorganismes poden arribar als aliments per diferents vies:

- Per les mans brutes de les persones que els manipulen.
- Per l'aire, bé en forma de petites gotes que s'expulsen per la boca i el nas en parlar, però sobretot en tossir o esternudar.
- Per contacte amb utensilis mal rentats o amb d'altres aliments contaminats.
- Per aigua contaminada amb la qual s'han rentat els aliments que es mengen crus o que s'ha emprat per regar-los.
- Per insectes, especialment les mosques i els escarabats de cuina.
- Pels pinsos, que constitueixen una font important de *Salmonella* i *Listeria monocytogenes*.
- Per la pròpia microbiota que forma part d'alguns aliments conspicus (formatges, embotits, etc.)

La presència de certs microorganismes en els aliments pot donar lloc a diverses malalties en l'home que s'enquadren en dos grups generals: les intoxicacions i les infeccions. Es considera **intoxicació** quan el microorganisme responsable es multiplica en l'aliment, produint una toxina que en ser ingerida provoca la malaltia. En el cas de la **infecció**, el microorganisme causal es troba a l'aliment i en ser consumit amb ell origina un procés patològic determinat. En alguns casos tenen lloc els dos efectes alhora.

De tot el que ha estat exposat podem deduir que els microorganismes d'importància alimentària són aquells que són presents de forma natural a l'aliment, els que hi han estat afegits de manera intencionada durant la seva elaboració i els que el contaminen. Evidentment, els aliments contenen un nombre variable de bacteris, floridures i llevats, i sovint ens preguntem si un determinat aliment és innoce fixant-nos en el nombre

total de microorganismes. La pregunta és doble: Quin és el nombre total de microorganismes presents per gram o mil·lilitre? I, quins tipus de microorganismes estan presents en aquest nombre?. En el cas d'alguns microorganismes, per exemple *Salmonella*, n'hi ha prou amb la seva presència en una quantitat determinada d'aliment, perquè aquest sigui considerat **no apte per al consum públic**.

Aquest llibre recull els protocols experimentals d'anàlisi microbiològica d'aliments i dels controls microbiològics relacionats amb la Higiene dels Aliments. El llibre s'ha estructurat en els onze capítols següents :

- I. Seguretat en el laboratori.
- II. Obtenció i preparació de les mostres.
- III. Metodologia per a la anàlisi microbiològica d'aliments.
- IV. Criteris microbiològics significatius per a aliments.
- V. Control microbiològic de superfícies.
- VI. Control microbiològic de l'aire.
- VII. Manipuladors d'aliments.
- VIII. Valoració microbiològica dels desinfectants.
- IX. Sensibilitat dels microorganismes als desinfectants.
- X. Medis de cultiu, solucions i colorants.
- XI. Esterilització.

El capítol I tracta de les mesures de seguretat **imprescindibles** en un laboratori de microbiologia.

En el capítol II s'explica com preparar les mostres d'aliment. El capítol III consta de 24 apartats on es descriuen els mètodes analítics per al recompte i investigació dels microorganismes o grups de microorganismes més importants que es poden trobar en els aliments. La redacció de l'informe final s'explica al capítol IV. Aquest capítol també recull els criteris microbiològics de menjars preparats i d'alguns aliments.

Els capítols del V al IX descriuen els protocols experimentals relacionats amb els aspectes microbiològics de la Higiene dels Aliments.

El capítol X fa referència a la preparació de medis de cultiu, solucions, reactius i colorants. També inclou els protocols de les tincions simples i diferencials. El darrer és una revisió de les diferents tècniques d'esterilització emprades en microbiologia.

L'edició electrònica del llibre conté un capítol annex amb fotografies en color de cultius, de proves bioquímiques de confirmació d'alguns dels microorganismes descrits en els capítols III i VII, i de cultius obtinguts en el control microbiològic de superfícies i d'aire, i en la valoració microbiològica de desinfectants.

# ÍNDEX

## CAPÍTOL I

<b>1. Seguretat en el laboratori</b> .....	1
1.1. Formes d'exposició .....	1
1.2. Avaluació del risc .....	2
1.2.1. Nivells de seguretat recomanats segons els agents infecciosos .....	2
1.3. Principis de bioseguretat .....	2
1.3.1. Tècniques i pràctiques de laboratori .....	3
1.3.2. Equip de seguretat .....	3
1.3.3. Disseny de l'edifici .....	4
1.4. Nivells de seguretat .....	4
1.4.1. Pràctiques microbiològiques en un laboratori de bioseguretat 1 (LBS 1) .....	4
1.4.2. Laboratori de bioseguretat 2 (LBS 2) .....	8
1.4.3. Laboratori de bioseguretat 3 (LBS 3) .....	9
1.4.4. Laboratori de bioseguretat 4 (LBS 4) .....	9
1.5. Bibliografia .....	10

## CAPÍTOL II

<b>2. Obtenció i preparació de les mostres</b> .....	11
2.1. Mostratge .....	11
2.1.1. Nombre de mostres .....	11
2.1.2. Mostratge aleatori .....	11
2.1.3. Condicions per al mostratge .....	12
2.2. Preparació de les mostres .....	15
2.2.1. Material .....	15
2.2.2. Procediment operatiu .....	15
2.3. Preparació de les dilucions decimals o banc de dilucions .....	16
2.3.1. Material .....	16
2.3.2. Procediment operatiu .....	16
2.4. Bibliografia .....	17

## CAPÍTOL III

<b>3. Metodologia per a la anàlisi microbiològica d'aliments</b> .....	19
3.1. Recompte de bacteris aerobis mesòfils .....	19
3.1.1. Sembra en profunditat .....	19
3.1.2. Sembra per superfície .....	22
3.1.3. Mètode de les gotetes d'agar .....	22
3.2. Recompte, aïllament i identificació de fongs .....	23
3.2.1. Recompte de fongs .....	23
3.2.2. Aïllament de floridures i llevats .....	24
3.2.3. Identificació de les floridures .....	25

3.2.4. Identificació dels llevats .....	30
3.3. Recompte d'Enterobacteriaceae totals .....	32
3.3.1. Sembra per superfície .....	32
3.3.2. Sembra en profunditat pel mètode de la doble capa d'agar .....	33
3.3.3. Resultats .....	33
3.4. Investigació d'Enterobacteriaceae.....	34
3.4.1. Enriquiment en medi líquid selectiu .....	35
3.4.2. Aïllament en medi sòlid selectiu .....	35
3.4.3. Comprovació de les colònies .....	36
3.4.4. Resultats .....	36
3.5. Recompte d'Enterobacteriaceae lactosapositives .....	36
3.5.1. Sembra per superfície.....	36
3.5.2. Mètode de filtració per membrana .....	37
3.6. Recompte de coliformes totals: valoració pel nombre més probable .....	38
3.6.1. Material .....	39
3.6.2. Procediment operatiu.....	39
3.6.3. Resultats .....	40
3.7. Recompte d'Escherichia coli .....	42
3.7.1. Material .....	42
3.7.2. Procediment operatiu .....	42
3.7.3. Resultats .....	42
3.8. Investigació d'Escherichia coli .....	46
3.8.1. Prova ràpida per al recompte i la investigació d'Escherichia coli .....	46
3.8.2. Proves ràpides per a la identificació de soques patògenes d'Escherichia coli .....	47
3.9. Sistema ràpid d'identificació de les enterobacteriàcies.....	48
3.9.1. Material .....	48
3.9.2. Procediment operatiu .....	49
3.9.3. Resultats .....	49
3.9.4. Proves complementàries: reducció de nitrats .....	51
3.9.5. Proves addicionals .....	52
3.10. Investigació de Salmonella .....	55
3.10.1. Pre-enriquiment en medi líquid no selectiu .....	56
3.10.2. Enriquiment en medis líquids selectius .....	56
3.10.3. Aïllament en medis sòlids diferencials .....	58
3.10.4. Confirmació bioquímica .....	59
3.10.5. Confirmació serològica: aglutinació en porta .....	63
3.10.6. Proves ràpides per a la investigació de Salmonella.....	66
3.11. Investigació de Shigella .....	67
3.11.1. Enriquiment en medis líquids selectius .....	67
3.11.2. Aïllament diferencial en medis sòlids selectius .....	68
3.11.3. Confirmació bioquímica .....	69
3.11.4. Confirmació serològica: aglutinació en porta .....	69
3.12. Recompte d'Staphylococcus .....	70
3.12.1. Material .....	71
3.12.2. Procediment operatiu .....	71
3.12.3. Resultats .....	71
3.13. Investigació d'Staphylococcus aureus .....	73

3.13.1. Enriquiment en medi líquid no selectiu .....	74
3.13.2. Aïllament en medi sòlid selectiu .....	74
3.14. Recompte de <i>Clostridium perfringens</i> .....	75
3.14.1. Regeneració dels medis de cultiu .....	75
3.14.2. Cultiu en anaerobiosi. Sistema d'anaerobiosi GasPak® .....	75
3.14.3. Tècnica per a l'enumeració en medi líquid .....	76
3.14.4. Tècnica per a l'enumeració en medi sòlid. Mètode de recompte en tubs .....	77
3.15. Recompte de <i>Clostridium</i> sulfitoreductors .....	78
3.15.1. Material .....	78
3.15.2. Procediment operatiu .....	78
3.15.3. Resultats .....	78
3.16. Recompte d'espores de <i>Clostridium</i> sulfitoreductors .....	79
3.17. Recompte d' <i>Enterococcus</i> .....	79
3.17.1. Valoració pel nombre més probable .....	79
3.17.2. Mètode de filtració per membrana.....	81
3.17.3. Proves addicionals .....	82
3.18. Investigació de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	83
3.18.1. Enriquiment en medi líquid selectiu .....	84
3.18.2. Aïllament diferencial en medi sòlid selectiu .....	84
3.18.3. Proves confirmatives .....	85
3.19. Recompte de <i>Bacillus cereus</i> .....	89
3.19.1. Tècnica del recompte en placa .....	89
3.19.2. Valoració pel nombre més probable .....	90
3.19.3. Proves confirmatives .....	91
3.20. Investigació de <i>Bacillus cereus</i> .....	93
3.20.1. Enriquiment en medi líquid selectiu .....	93
3.20.2. Aïllament en medi sòlid selectiu.....	93
3.21. Recompte de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	94
3.21.1. Material .....	94
3.21.2. Procediment operatiu .....	94
3.21.3. Resultats .....	94
3.21.4. Proves confirmatives .....	95
3.22. Investigació de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	97
3.22.1. Pre-enriquiment en medi líquid no selectiu .....	97
3.22.2. Enriquiment en medi líquid selectiu .....	98
3.22.3. Aïllament diferencial en medis sòlids selectius .....	98
3.22.4. Confirmació bioquímica .....	99
3.22.5. Proves ràpides per a la detecció de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	103
3.23. Recompte de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	103
3.23.1. Material .....	103
3.23.2. Procediment operatiu .....	103
3.23.3. Resultats .....	103
3.23.4. Proves confirmatives .....	104
3.24. Bibliografia .....	104
<b>CAPÍTOL IV</b>	
<b>4. Criteris microbiològics significatius per a aliments</b> .....	<b>105</b>
4.1. Definicions .....	105
4.2. Selecció dels criteris microbiològics .....	106

4.3. Normes microbiològiques de menjars preparats .....	106
4.3.1. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup A .....	106
4.3.2. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup B .....	107
4.3.3. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup C .....	108
4.3.4. Normes microbiològiques dels menjars preparats del grup D .....	108
4.3.5. Criteris per a la valoració dels resultats de les anàlisi .....	108
4.4. Protocol d'anàlisi microbiològica d'aliments .....	109
4.4.1. Carn picada .....	109
4.4.2. Musclos .....	110
4.4.3. Patates fregides i productes d'aperitiu .....	111
4.4.4. Beguda refrescant no alcohòlica .....	112
4.4.5. Galetes .....	113
4.4.6. Aigües minerals naturals .....	114
4.4.7. Gelats .....	115
4.5. Redacció d'informes .....	116
4.5.1. Exemple 1 .....	117
4.5.2. Exemple 2 .....	119
4.6. Bibliografia .....	121
<b>CAPÍTOL V</b>	
<b>5. Control microbiològic de superfícies .....</b>	<b>123</b>
5.1. Mètode del bastonet esbandit .....	123
5.1.1. Material .....	123
5.1.2. Procediment operatiu .....	124
5.1.3. Resultats .....	124
5.2. Mètode de la placa de contacte (placa RODAC) .....	125
5.2.1. Material .....	125
5.2.2. Procediment operatiu .....	125
5.2.3. Resultats .....	125
5.3 Sistema Hygicult® .....	126
5.2.1. Material .....	126
5.2.2. Procediment operatiu .....	126
5.2.3. Resultats .....	127
5.4. Bibliografia .....	128
<b>CAPÍTOL VI</b>	
<b>6. Control microbiològic de l'aire .....</b>	<b>131</b>
6.1. Obtenció de mostres d'aire .....	131
6.1.1. Mètode de sedimentació .....	131
6.1.2. Aerocentrífugues (col.lectors d'impacte) .....	131
6.1.3. Mètode de xoc en líquid o borbolladors .....	132
6.2. Elecció del sistema de mostratge .....	132
6.3. Recompte de bacteris aerobis mesòfils pel mètode de sedimentació .....	132
6.3.1. Material .....	132
6.3.2. Procediment operatiu .....	132
6.3.3. Resultats .....	133
6.4. Recompte de bacteris aerobis mesòfils amb aerocentrífuga .....	133
6.4.1. Material .....	133
6.4.2. Procediment operatiu .....	133



6.4.3. Resultats .....	134
6.5. Bibliografia .....	135
<b>CAPÍTOL VII</b>	
<b>7. Manipuladors d'aliments .....</b>	<b>137</b>
7.1. Contaminació d'aliments per manipulació .....	137
7.2. Contaminació .....	137
7.2.1. Contaminació des del tracte digestiu .....	137
7.2.2. Contaminació per via cutània .....	138
7.2.3. Contaminació per via respiratòria .....	138
7.3. Requisits dels manipuladors d'aliments: «Real Decreto 202/2000, 11 de febrero» .....	138
7.4. Higiene personal .....	139
7.4.1. Control microbiològic de les mans .....	139
7.5. Anàlisi de portadors d' <i>Staphylococcus aureus</i> a la mucosa nasal .....	140
7.5.1. Enriquiment en medi líquid no selectiu .....	140
7.5.2. Aïllament en medi sòlid selectiu .....	141
7.5.3. Confirmació de les colònies .....	141
7.6. Bibliografia .....	142
<b>CAPÍTOL VIII</b>	
<b>8. Valoració microbiològica dels desinfectants .....</b>	<b>143</b>
8.1. Valoració d'un desinfectant segons les normes AFNOR .....	144
8.1.1. Material .....	144
8.1.2. Procediment operatiu .....	144
8.1.3. Resultats .....	148
8.2. Coeficient de fenol .....	148
8.3. Bibliografia .....	149
<b>CAPÍTOL IX</b>	
<b>9. Sensibilitat dels microorganismes als desinfectants .....</b>	<b>151</b>
9.1. Mètode de difusió en agar .....	151
9.1.1. Material .....	152
9.1.2. Procediment operatiu .....	152
9.1.3. Resultats .....	153
9.2. Bibliografia .....	153
<b>CAPÍTOL X</b>	
<b>10. Medis de cultiu, solucions i colorants .....</b>	<b>155</b>
10.1. Medis de cultiu .....	155
10.1.1. Tipus de medis de cultiu .....	155
10.2. Preparació dels medis de cultiu .....	156
10.3. Control dels medis de cultiu .....	157
10.4. Medis de cultiu no comercials .....	157
10.4.1. Aigua de triptona amb sal (TW) .....	157
10.4.2. Aigua de triptona mb 3% de NaCl (TW 3%) .....	157
10.4.3. Agar per a anaerobis sense glucosa ni indicador .....	157
10.4.4. Agar nutritiu amb 3% de NaCl (TSA 3%) .....	158
10.4.5. Agar triptona de soja amb extracte de llevat (TSA-YE) .....	158
10.4.6. Agar triptona sulfit neomicina (TSN) .....	158
10.4.7. Brou lactosa sulfit (CLS) .....	158
10.4.8. Brou lisina descarboxilasa amb 3% de NaCl (LIB 3%) .....	159
10.4.9. Brou per a <i>Listeria</i> LEB 1 .....	159

10.4.10. Brou per a <i>Listeria</i> LEB 2 .....	160
10.4.11. Brou nitrats .....	160
10.4.12. Brou púrpura de bromocresol amb ramnosa .....	161
10.4.13. Brou púrpura de bromocresol amb xilosa .....	161
10.4.14. Brou sal polimixina (CSP) .....	162
10.4.15. Brou triptona de soja amb extracte de llevat (TSB-YE) .....	162
10.4.16. Brou tripticasa de soja polimixina .....	162
10.5. Solucions salines .....	162
10.5.1. Ringer ¼ .....	163
10.5.2. Ringer ¼ amb cisteïna .....	163
10.6. Reactius .....	163
10.6.1. Reactiu per al TDA .....	163
10.6.2. Reactiu de Barrit .....	163
10.6.3. Reactiu de Griess .....	163
10.6.4. Reactiu per a la catalasa .....	164
10.6.5. Reactiu de Kovacs .....	164
10.6.6. Reactiu de l'oxidasa .....	164
10.7. Tincions .....	164
10.7.1. Tincions simples .....	164
10.7.2. Tincions diferencials .....	165
10.8. Colorants .....	167
10.8.1. Blau de lactofenol .....	167
10.8.2. Cristall violeta (modificació de Hucker) .....	167
10.8.3. Fucsina diluïda .....	167
10.8.4. Lugol .....	168
10.8.5. Negre Sudan .....	168
10.8.6. Safranina .....	168
10.8.7. Verd malaquita .....	168
10.9. Bibliografia .....	169
<b>CAPÍTOL XI</b>	
<b>11. Esterilització</b> .....	171
11.1. Esterilització física .....	171
11.1.1. Esterilització per calor humida .....	171
11.1.2. Esterilització per calor seca .....	172
11.1.3. Incineració .....	173
11.1.4. Esterilització per filtració .....	174
11.1.5. Esterilització per radiació .....	175
11.2. Esterilització química .....	175
11.2.1. Òxid d'etilè .....	175
11.2.2. $\beta$ -propiolactona .....	176
11.2.3. Glutaraldehyd .....	176
11.2.4. Formaldehyd .....	176
11.3. Preparació del material a utilitzar .....	176
11.4. Bibliografia .....	177

## CAPÍTOL II

### 2. OBTENCIÓ I PREPARACIÓ DE LES MOSTRES

#### 2.1. Mostratge

El mostratge consisteix a separar un nombre determinat de mostres d'un lot, una tramesa, etc., amb la finalitat d'obtenir una mostra representativa del total i uns resultats analítics fiables.

##### 2.1.1. Nombre de mostres

Per tal que el mostratge tingui utilitat estadística, s'ha d'analitzar un nombre apreciable d'unitats d'un lot.

Se suggereix que el nombre de mostres es correspongui amb l'arrel quadrada del nombre total d'unitats que constitueix el lot. I també que, tenint en compte el volum del lot, s'agafi l'1% del total quan el lot és gran i el 10% quan el lot és petit. Aquests mostratges són aplicables a lots procedents d'indústries de les quals es desconeix el control que s'ha fet. Si es tracta de productes sotmesos a un control regular, és suficient analitzar 5-10 mostres de cada lot.

##### 2.1.2. Mostratge aleatori

El mètode de mostratge aleatori consisteix a separar del lot un nombre de mostres calculat prèviament utilitzant la taula de números a l'atzar. Aquesta taula està integrada per 100 columnes i 100 files de dígitos 0, 1, 2, ..., 9, disposats en ordre aleatori i generats aleatòriament, de manera que en qualsevol columna cada dígit és completament independent dels altres dígitos de la taula.

Primer s'enumeren consecutivament cadascun dels paquets, contenidors o unitats del producte que s'ha de mostrejar. Després s'escull a l'atzar una pàgina de la taula de números aleatoris, per exemple emprant cartolines numerades dins d'una caixa. S'introdueixen en una caixa cartolines numerades amb les pàgines de la taula de números aleatoris i, sense mirar, se agafa una cartolina, el número de la cartolina ens indicarà el número de la pàgina de la taula de números aleatoris que utilitzarem. A continuació, i sense mirar, s'assenyala amb un llapis un punt qualsevol de la taula. El dígit més proper al senyal del llapis servirà de punt de partida per a la separació de les mostres que han de ser analitzades.

Vegem-ne un exemple emprant la taula 2.1. Suposem que el lot té 300 unitats i que amb el llapis hem assenyalat el lloc que correspon a la fila 7 i a la columna 17. Aquest dígit és l'1, i els dígitos de les columnes 18 i 19 són 1 i 0. Per tant, la unitat que s'ha de separar del lot és la que hem marcat amb el

número 110. A continuació es passa a la fila 8 i a les mateixes columnes 17, 18 i 19, a les quals correspon el número 390. No podem separar la unitat 390, ja que només tenim 300 unitats. Passarem a la fila 9 i a les mateixes columnes 17, 18 i 19, etc., fins a obtenir el nombre de mostres que necessitem.

*Columnes*

	1 2 3	4 5 6	7 8 9	10 11 12	13 14 15	16 17 18	19 20 21	22 23 24	25 26 27	28 29 30
1	0 7 4	0 3 4	1 7 2	1 9 9	1 2 2	1 3 6	0 5 2	1 2 3	1 4 4	0 9 4
2	0 1 3	0 2 0	1 8 5	1 6 8	0 0 7	1 6 1	1 1 4	0 4 3	1 8 2	0 5 5
3	0 2 4	1 9 5	0 4 4	0 2 6	0 5 7	0 3 3	0 7 5	0 0 2	1 9 6	0 5 3
4	0 4 8	1 1 0	1 2 7	1 6 9	0 9 6	0 6 9	0 7 7	1 3 2	1 2 8	0 4 5
5	1 1 1	0 5 1	0 7 3	1 3 4	0 8 4	0 4 0	0 7 9	1 0 9	0 4 7	0 1 4
6	1 7 1	1 0 5	1 9 1	0 4 2	0 6 6	0 0 6	1 5 9	1 0 4	1 7 9	0 1 9
7	0 2 2	1 1 8	1 5 1	0 1 5	0 9 2	0 1 1	0 5 4	0 0 1	1 5 8	0 3 5
8	0 0 5	1 2 4	1 4 7	1 9 8	1 5 6	1 3 9	0 6 2	1 1 5	1 4 3	0 8 9
9	0 5 9	1 0 7	1 3 3	0 9 8	0 2 7	1 3 1	1 4 9	0 0 4	0 9 0	1 1 7
10	0 4 1	0 8 3	0 0 9	1 0 3	0 1 8	0 1 6	1 5 0	1 8 8	1 7 0	0 0 3
11	1 8 0	1 3 8	1 6 0	1 8 9	0 6 0	0 3 8	1 6 3	0 0 8	1 0 0	1 1 2
12	0 6 5	0 9 3	1 2 0	0 5 0	0 6 1	1 0 6	0 5 6	0 3 0	1 6 4	1 2 5
13	0 9 5	1 5 5	0 8 5	1 5 3	0 4 6	0 5 8	0 3 2	1 9 7	0 6 8	1 9 0
14	1 6 5	1 4 5	2 0 0	0 9 7	0 2 5	1 8 7	0 2 1	1 7 5	0 7 2	0 1 7
15	0 7 1	1 5 7	1 7 4	1 4 6	1 8 1	0 9 9	0 3 9	0 8 6	1 9 3	0 2 8
16	1 0 1	0 1 0	1 4 1	0 7 8	0 2 3	0 8 1	1 7 7	1 7 6	1 9 2	0 3 2
17	0 8 7	0 7 0	0 8 8	1 5 2	1 2 6	0 3 1	0 1 2	1 3 7	1 8 4	1 1 6
18	1 3 0	0 2 9	1 6 7	0 6 7	1 1 3	1 3 5	0 7 6	0 3 6	1 2 1	1 8 6
19	0 6 4	1 8 3	1 9 4	1 1 9	1 4 8	1 4 0	0 4 9	1 5 4	1 6 2	1 2 9
20	0 9 1	1 4 2	0 8 0	1 0 2	1 7 3	0 6 3	1 7 8	0 3 7	1 0 8	1 6 6

TAULA 2.1. Exemple de taula de números a l'atzar

Si es tracta de caixes grans que contenen paquets petits, primer es fa un mostratge aleatori de les caixes i, seguint el mateix procediment, s'escullen els paquets que s'han d'analitzar.

### 2.1.3. Condicions per al mostratge

És molt important que la **persona** que faci el mostratge estigui ben entrenada i conegui la finalitat i la importància de la seva tasca, ja que una presa de mostres incorrecta pot influir en la valoració dels resultats de les anàlisis.

Si és possible, les mostres s'enviaran al laboratori en els seus envasos originals.

Quan els envasos són molt grans i difícils de transportar, s'agafen asèpticament mostres representatives i es passen a envasos estèrils més petits.

A vegades, les mostres que s'han de recollir són úniques. Això és molt freqüent quan es tracta d'aliments sospitosos de toxiinfecció alimentària.

Els aliments **a l'engròs** es mostregen agafant amb material estèril porcions de diferents zones i traslladant-los, en condicions asèptiques, a envasos estèrils.

Si es tracta d'una **mostra líquida**, primer s'agita l'envàs i després es trasllada, asèpticament i a un envàs estèril, una quantitat determinada de mostra.

Si la mostra és **aigua de l'aixeta**, aquesta s'ha de desinfectar amb alcohol. A continuació, s'obre l'aixeta i es deixa córrer l'aigua. Es tanca l'aixeta i es flameja la gota que queda penjant fins que en surten vapors. S'obre l'aixeta una altra vegada i es deixa córrer l'aigua durant 1-2 minuts abans de recollir-la en el recipient estèril per a la presa de mostres. Es tanca aquest recipient en condicions asèptiques.

Les mostres de productes **sòlids** (formatges, pernills, aliments congelats, etc.) s'agafen emprant serres, trepants, ganivets, etc., estèrils i s'introdueixen asèpticament en recipients estèrils.

El *temps* transcorregut entre la presa de la mostra i el començament de l'anàlisi d'aquesta en el laboratori ha de ser tan curt com sigui possible.

El *transport* de la mostra ha de ser ràpid i s'ha de procurar mantenir les temperatures de refrigeració o de congelació dels productes que ho necessitin.

Es recomana *desar* les mostres a 4°C fins al moment de la seva anàlisi. Cal recordar, però, que la refrigeració de les mostres durant períodes de tres dies o més pot conduir a la multiplicació dels microorganismes psicròfils presents en la mostra i pot originar la mort d'alguns bacteris mesòfils o termòfils. Si la mostra està congelada, s'ha de descongelar en el seu envàs original durant 18 hores com a màxim en una nevera a 2°C a 5°C. Si la mostra congelada pot ser fàcilment triturada —per exemple, els gelats—, no cal descongelar-la.

És absolutament necessari *anotar* la història del mostratge, el transport i l'emmagatzematge de les mostres. Les dades més importants per al microbiòleg són les següents:

- Nom i adreça de la persona que ha pres les mostres.
- Nom i adreça del lloc on s'han pres les mostres.
- Data i hora de la presa de les mostres.
- Raó de la presa de les mostres (control rutinari, brot de toxiinfecció, etc.).
- Nom, mida i marca de les unitats que formen el lot.
- Mètode de mostratge emprat.
- Lloc i temperatura de l'aliment en agafar la mostra.
- Temps transcorregut entre la preparació de l'aliment (en un restaurant, en un *self-service*, etc.) i la presa de les mostres.
- Sistema de transport de les mostres del lloc d'origen al laboratori d'anàlisi.
- Condicions de l'aliment en arribar al laboratori (pH,  $a_w$ , aspecte, etc.).
- Temperatura de l'aliment en arribar al laboratori.
- Data i hora d'arribada de la mostra al laboratori.

Totes aquestes dades s'han d'anotar en un full d'anàlisi (taula 2.2) on també hi han de constar les dades següents:

- Tipus d'anàlisi realitzada i resultats obtinguts.
- Nom de la persona encarregada de l'anàlisi.
- Data i hora de començament de l'anàlisi.

— Data i hora d'acabament de l'anàlisi.

Núm. de registre de la mostra:	Nom del client o empresa:	Tipus de mostra:	
Persona que ha pres la mostra			
Nom:		Empresa:	Signatura:
Raó de la presa de la mostra:			
<input type="checkbox"/> Brot de toxiinfecció <input type="checkbox"/> Primera anàlisi (cal especificar-les)		<input type="checkbox"/> Control periòdic <input type="checkbox"/> Mostra ambiental <input type="checkbox"/> Anàlisi de manipuladors d'aliments <input type="checkbox"/> Control esporàdic <input type="checkbox"/> Altres	
Presa de les mostres			
Mètode de mostratge:		Nre. de mostres/lot:	Lloc del mostratge:
Temperatura del lloc del mostratge:		Temps entre el servei i la presa de les mostres:	
Sistema de transport:		Temperatura de transport:	
Condicions de l'aliment en arribar al laboratori			
Aspecte:		pH:	Temperatura:
a <sub>w</sub> :			
Tipus d'anàlisi	Mètode	Medi de cultiu	Resultats
<input type="checkbox"/> Total d'aerobis mesòfils			
<input type="checkbox"/> Total de psicròtrofs			
<input type="checkbox"/> Fongs i llevats			
<input type="checkbox"/> Coliformes			
<input type="checkbox"/> Enterobacteriàcies			
<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Salmonella</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Shigella</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Clostridium sulfitoreductors</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Clostridium perfringens</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus aureus</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Bacillus cereus</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Enterococcus</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<input type="checkbox"/> <i>Listeria monocytogenes</i>			
<input type="checkbox"/> Altres (especifiqueu-los)			
Persona encarregada de l'anàlisi:	Aliment rebut: Dia: Hora:	Començament de l'anàlisi Dia: Hora:	Acabament de l'anàlisi Dia: Hora:

TAULA 2.2. Full d'anàlisi de mostres d'aliments

Quan les mostres siguin restes d'aliments sospitosos de toxiinfecció alimentària, és convenient conèixer la simptomatologia i l'estudi epidemiològic de la malaltia. Aquestes dades ajudaran el microbiòleg a obtenir resultats en el mínim temps possible.

## 2.2. Preparació de les mostres

La preparació de les mostres per a la seva anàlisi microbiològica exigeix unes regles de manipulació asèptica molt estrictes, així com la utilització de material i diluents estèrils per tal d'evitar la contaminació exterior de l'aliment.

La fracció d'aliment que s'analitza ha de ser representativa de la totalitat de la mostra. En general, la mostra analítica hauria de ser aproximadament de 200 g. Per raons pràctiques per a l'anàlisi s'utilitzen entre 10 i 50 g; la resta es reserva per si s'ha de repetir l'anàlisi.

Si l'aliment està integrat per diferents components, s'agafen fraccions representatives de cadascun d'aquests en superfície i en profunditat.

La presa de les mostres s'ha de fer sempre en condicions asèptiques molt estrictes i amb material estèril, utilitzant, si és possible, cambres de flux laminar i SEMPRE a prop de la flama del bec Bunsen.

### 2.2.1. Material

- Ampolla amb 1 L d'aigua de triptona amb sal (TW) o solució de Ringer  $\frac{1}{4}$ , estèrils o aigua de peptonada.
- Instruments per a la presa de les mostres: tisores, ganivets, culleres, espàtules (tot estèril).
- Bosses de Stomacher estèrils.
- Triturador-homogeneïtzador o Stomacher.
- Flascó per mantenir la bossa amb la mostra en posició vertical.
- Balances.
- Alcohol.
- Bec Bunsen.

### 2.2.2. Procediment operatiu

Les **mostres sòlides** s'han de tallar en trossos molt petits emprant tisores, ganivets, etc., estèrils. S'han d'evitar els ossos, les espines, etc. S'ha d'agafar sempre mostra de l'interior i de la superfície de l'aliment.

Primer es tara el recipient estèril (bossa de plàstic estèril dins d'un suport que permeti mantenir-la en posició vertical) i a continuació es pesen 25 g de mostra i s'hi afegeixen 225 g de diluent. Haurem preparat una **dilució 1/10 de la mostra**. Com que a vegades no és fàcil pesar la mostra amb exactitud, per obtenir una dilució 1/10 de la mostra problema només cal multiplicar per 9 la quantitat d'aliment que s'ha pesat; així, haurem calculat la quantitat de diluent que hem d'afegir a la mostra per obtenir la dilució 1/10 desitjada.

La **tritració** de la mostra és una operació molt important. S'ha d'evitar destruir els microorganismes a causa de la ruptura dels seus embolcalls o d'un escalfament excessiu. A més de triturar perfectament l'aliment, també és necessari obtenir una barreja homogènia.

Per triturar i homogeneïtzar la mostra utilitzarem un **tritració de paletes** o **Stomacher**, que actua colpejant rítmicament la barreja d'aliment i diluent que hem introduït prèviament en una bossa de plàstic estèril. Els cops produïts per les paletes trenquen l'aliment i deixen els microorganismes en suspensió.

Molts **aliments líquids** es barregen i dispersen normalment d'una manera fàcil. En aquest cas s'agita la mostra i es prepara el banc de dilucions directament (apartat. 2.3). Altres aliments líquids, semilíquids o espessos —per exemple, la margarina, la xocolata o la mantega—, és necessari escalfar-los a 40°C, aproximadament, per millorar la dispersió i dissolució de la matriu i facilitar l'alliberament dels microorganismes del medi.

## 2.3. Preparació de les dilucions decimals o banc de dilucions

Segons el grau de contaminació microbiana de la mostra que es vol analitzar, algunes vegades serà necessari fer dilucions de la mostra original, per tal de poder obtenir resultats numèrics correctes.

Normalment, les dilucions de la mostra es fan de manera decimal (1/10) i esglaonada; d'aquesta manera s'obté una sèrie successiva de dilucions fins a arribar al grau de dilució adient per poder realitzar el recompte dels microorganismes presents en la mostra.

### 2.3.1. Material

- Dilució 1/10 de l'aliment sòlid (apartat 2.2.2) o mostra líquida directa.
- Tubs amb 9 mL de solució de Ringer ¼.
- Micropipetes d'1 mL i puntes estèrils.
- Mixo-tub o vòrtex.
- Bec Bunsen.

### 2.3.2. Procediment operatiu

Per explicar el procediment que s'ha de seguir, ho farem amb un exemple (figura 2.1): primer s'agita el tub, el flascó o el recipient que conté la mostra que s'ha d'analitzar, per tal d'homogeneïtzar-ne el contingut. Després s'agafa 1 mL de la mostra amb una pipeta o una micropipeta estèrils. Aquesta part alíquota s'introdueix en un tub que conté 9 mL de diluent (solució de Ringer ¼) estèril. Així, hem preparat la dilució  $10^{-1}$  (1/10). Homogeneïtzem el contingut del tub utilitzant un Mixo-tub o vòrtex. A continuació, agafem 1 mL de la dilució  $10^{-1}$  i el traslladem a un altre tub amb 9 mL de diluent. Tindrem la dilució  $10^{-2}$ . Homogeneïtzem el contingut del tub i repetim l'operació fins a obtenir la dilució  $10^{-3}$  i, a continuació, la dilució  $10^{-4}$  (dilució 1/10 de  $10^{-3}$ ).

En l'anàlisi de **mostres sòlides** s'ha de tenir en compte que es parteix de la dilució 1/10.



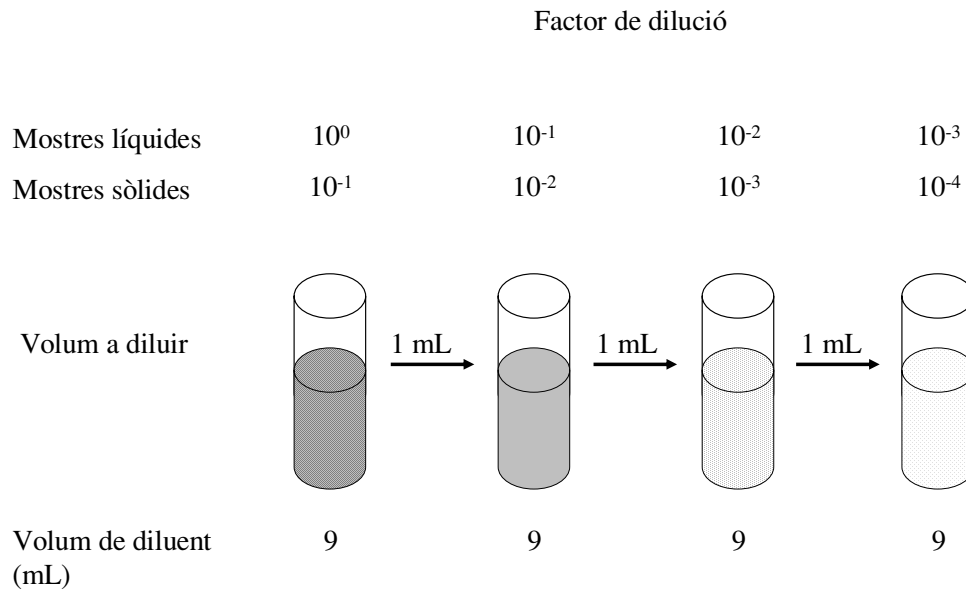


FIGURA 2.1. Esquema d'un banc de dilucions

## 2.4. Bibliografia

ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1999. *Microorganismos de los alimentos 2. Métodos de muestreo para análisis microbiológicos: principios y aplicaciones específicas*. 2ª ed. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza.

Mossel D.A.A., Moreno B. y Struijk C.B. 2003. *Microbiología de los alimentos*. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza.

Murray P.R., Baron E.J., Jorgensen J.H, Pfaller M.A. and Tenover F.C. (eds.). 2003. *Manual of Clinical Microbiology*. 8ª ed. ASM Press. Washington, DC.

Pascual Anderson M.R. y Calderón Pascual V. 2000. *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas*. Editorial ACRIBIA S.A. Zaragoza.

## CAPÍTOL III

### 3. METODOLOGIA PER A L'ANÀLISI MICROBIOLÒGICA D'ALIMENTS

#### 3.1. Recompte de bacteris aerobis mesòfils

L'objectiu del recompte de bacteris aerobis mesòfils és fer una estimació de la microbiota bacteriana mesòfila, sense especificar quins tipus de bacteris hi ha a la mostra. Aquesta anàlisi té un valor limitat com a indicador de la presència d'agents patògens o de les toxines d'aquests. Un recompte de bacteris aerobis mesòfils baix no assegura que la mostra no estigui contaminada amb patògens; un recompte total alt tampoc significa, inevitablement, la presència de microbiota patògena.

Excepte en els aliments fermentats, no és aconsellable que en un aliment hi haig un nombre elevat de bacteris aerobis mesòfils, encara que aquests microorganismes no siguin patògens o no hagin alterat de manera apreciable les característiques organolèptiques de l'aliment. Un recompte alt de bacteris mesòfils en un aliment pot ser degut a diferents causes i pot tenir diferents significats:

- Primeres matèries excessivament contaminades.
- Manipulació incorrecta durant l'elaboració de l'aliment.
- Condicions inadequades de temps i/o temperatura durant l'emmagatzematge.
- Possibilitat que hi pugui haver bacteris patògens, ja que els bacteris transmesos pels aliments solen ser mesòfils.
- Indicació d'una alteració immediata de l'aliment.

En general, el recompte de bacteris aerobis mesòfils permet conèixer la qualitat sanitària dels aliments.

Per dur a terme el recompte de bacteris aerobis mesòfils d'una mostra d'aliment es poden seguir diferents tècniques de sembra en placa.

#### ***3.1.1. Sembrada en profunditat***

##### ***3.1.1.1. Material***

- Banc de dilucions de la mostra d'aliment

- Tubs amb 20 mL de TSA, fos i mantingut en un bany d'aigua a 45°C
- Plaques de Petri buides estèrils
- Micropipeta d'1 mL i puntes estèrils
- Estufa bacteriològica a 30°C ± 1°C

### 3.1.1.2. Procediment operatiu

Es preparen dilucions decimals de l'aliment que s'ha d'analitzar (ap. 2.3.2). Es vessen parts alíquotes d'1 mL de la mostra o dilució en diferents plaques de Petri buides estèrils i s'hi afegeixen 20 mL de TSA fos i mantingut a 45°C. El temps màxim entre les dues operacions és de 10 minuts. Per homogeneïtzar el contingut de les plaques, aquestes s'agiten mitjançant moviments rotatoris en ambdós sentits i procurant que el medi no mulli la tapa de les plaques. Com a mínim se sembren tres dilucions decimals consecutives de l'aliment que s'ha d'analitzar, emprant tres plaques per dilució. Es deixa solidificar el contingut de les plaques, que es deixen tancades damunt la taula del laboratori i s'incuben després en posició invertida, per evitar que l'aigua de condensació caigui sobre el medi, a l'estufa a 30°C ± 1°C durant 24-48 hores (fig. 3.1).

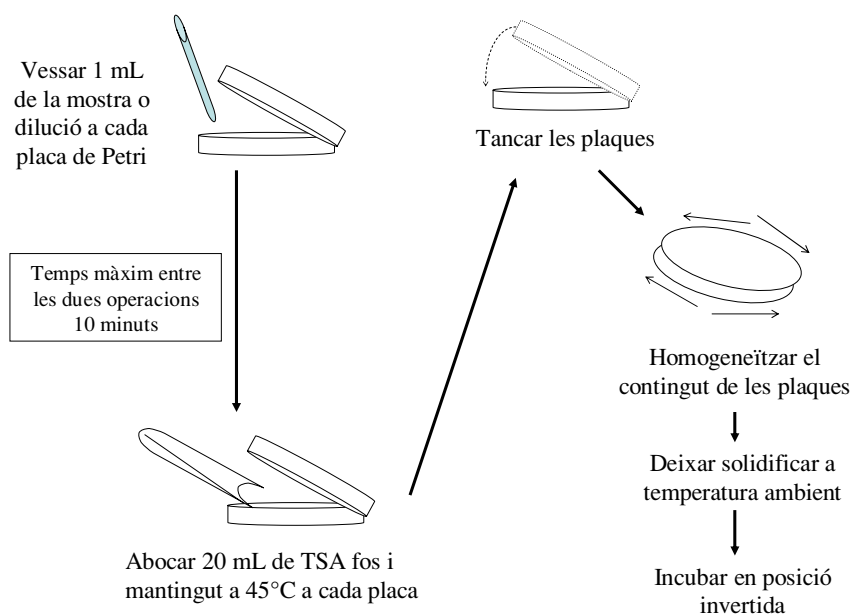


FIGURA 3.1. Sembrada en profunditat

### 3.1.1.3. Resultats

Observarem colònies en profunditat (immerses en el medi) i en superfície. Es recomana utilitzar un comptador de colònies per tal de fer més fàcil la lectura. En cas de no tenir-ne, cal comptar les colònies a contralavor per poder veure-les totes. Les colònies es van marcant amb un retolador a mesura que es van comptant, per tal de no deixar-ne cap per comptar i de no comptar-ne cap dues vegades. Si el recompte no es fa en el mateix moment de treure les plaques de l'estufa, es poden conservar a 4°C-10°C com a màxim 24 hores.

Per obtenir el nombre de bacteris aerobis mesòfils totals revivificables per g o mL de mostra analitzada (ufc/g o mL) es compten les colònies de les plaques corresponents a una dilució, que contenen entre 30 i 300 colònies, se'n calcula la mitjana aritmètica i es multiplica pel factor de dilució, que és la inversa de la dilució per la inversa de l'indòcul.

$$\text{ufc / g o mL} = \text{mitjana} \cdot \frac{1}{\text{dilució}} \cdot \frac{1}{\text{indòcul}}$$

Si una de les plaques de la dilució escollida presenta una mica menys de 30 colònies o una mica més de 300, també s'ha de comptar i s'ha d'emprar el nombre obtingut per calcular la mitjana aritmètica.

Quan les plaques de dues dilucions successives presenten entre 30 i 300 colònies, s'han de calcular els recomptes de cada dilució. El resultat final serà la mitjana dels dos valors obtinguts, sempre que un d'aquests no sigui superior al doble de l'altre; en aquest cas, es donarà com a recompte en placa el valor més baix.

Si totes les plaques tenen més de 300 colònies, les plaques de la dilució més elevada (menys concentrada) es divideixen en seccions radials (2, 4 o 8) i es compten les colònies que hi ha en una o més seccions. Es multiplica el total de colònies obtingudes en cada cas pel factor adient, per tal d'aconseguir una estimació del nombre total de colònies presents en la placa. Es calcula la mitjana aritmètica i es multiplica pel factor de dilució corresponent. El valor obtingut serà el **recompte estimat**.

Si en fer el recompte emprant el sistema de seccions radials explicat en l'apartat anterior, es compten més de 200 colònies en una secció corresponent a la vuitena part de la placa, es multiplica 1.600 (200 · 8) pel factor de dilució i el **recompte estimat** s'expressa com a superior (>) al valor obtingut. En aquests casos, s'aconsella indicar entre parèntesis la dilució utilitzada.

Quan no es troben colònies a les plaques corresponents a la dilució més concentrada, el **recompte estimat** s'expressa com a inferior (<) a 1 multiplicat pel factor de dilució més concentrat.

El recompte s'expressa emprant només dues xifres significatives i mitjançant notació científica. Per exemple, si el valor calculat ha estat de 45.200, aquest s'ha de donar com  $45 \times 10^3$  o  $4,5 \times 10^4$ . Si el tercer dígit començant per l'esquerra és 5 o superior, s'arrodoneix. Per exemple, si el valor calcular és 836.000, aquest s'ha de donar com  $84 \times 10^4$  o  $8,4 \times 10^5$ .

Pot passar que a les plaques hi hagi colònies de creixement difós en superfície. Si l'àrea que ocupen aquestes colònies no supera la meitat de la placa, es compten les colònies d'altres tipus que es troben fora d'aquesta zona i es corregeix la xifra obtinguda tenint en compte l'àrea on no s'han pogut comptar colònies.

Si la zona ocupada per aquest tipus de colònia supera la quarta part de la superfície de la placa, s'ha d'anotar. Si presenten aquest problema més d'una placa de cada vint, s'han de prendre mesures per evitar-lo (per exemple, assecar bé les plaques o reduir la humitat de l'estufa d'incubació).

Si en fer un recompte el nombre de microorganismes que hi ha en la dilució més concentrada és menor que el que hi ha en la dilució més elevada, es pot sospitar que l'aliment que s'està analitzant conté inhibidors.

Si s'utilitza el mètode de recompte en placa per decidir si un aliment, un lot, una partida, etc., s'accepta o es rebutja, només es poden emprar els resultats reals, mai el recompte estimat. Des del punt de vista dels organismes oficials, el recompte estimat només és útil com a aproximació inicial per valorar la qualitat bacteriològica d'un aliment.

### ***3.1.2. Sembra per superfície***

#### ***3.1.2.1. Material***

- Banc de dilucions de la mostra d'aliment
- Plaques amb 20 mL de TSA
- Micropipeta de 0,1 mL i puntes estèrils
- Nansa de Digralsky
- Alcohol
- Estufa bacteriològica a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

#### ***3.1.2.2. Procediment operatiu***

Es preparen dilucions decimals de l'aliment que s'ha d'analitzar (ap. 2.3.2). Es vessen parts alíquotes de 0,1 mL de la mostra o la dilució en diferents plaques de Petri amb 20 mL de TSA. Amb la nansa de Digralsky, flamejada prèviament amb alcohol, es reparteix l'inòcul per tota la superfície de la placa, efectuant moviments de rotació i fins que el líquid quedi completament absorbit. Com a mínim s'han de sembrar tres dilucions decimals consecutives de l'aliment que s'ha d'analitzar, emprant tres plaques per dilució. Les plaques s'incuben en posició invertida a l'estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durant 24-48 hores.

#### ***3.1.2.3. Resultats***

Observarem colònies en la superfície del medi de cultiu. El recompte de les colònies i el càlcul del nombre de bacteris aerobis mesòfils totals revivificables per gram o mil·lilitre d'aliment es fa seguint les indicacions de l'apartat 3.1.1.3.

### ***3.1.3. Mètode de les gotetes d'agar***

En el mètode de les gotetes d'agar de Sharpe i Kilsby (1971), les dilucions decimals de la mostra es preparen en tubs amb TSA estèril, fos i mantingut a  $45^{\circ}\text{C}$ .

#### ***3.1.3.1. Material***

- Tubs amb 9 mL de TSA, fos i mantingut en un bany d'aigua a  $45^{\circ}\text{C}$
- Micropipeta d'1 mL i puntes estèrils
- Nansa calibrada o micropipeta de 0,1 mL i puntes estèrils
- Mixo-tub o vòrtex
- Dues plaques de Petri buides i estèrils

---

— Estufa bacteriològica a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$

### 3.1.3.2. Procediment operatiu

Es marca el fons de dues plaques de Petri buides i estèrils dividint-les en seccions iguals i s'indica en cadascuna la dilució que se sembrarà.

Es preparen dilucions decimals de l'aliment utilitzant tubs amb 9 mL de TSA fos i mantingut a  $45^{\circ}\text{C}$ . Es dipositen gotetes de 0,1 mL de cada dilució al fons de la placa de Petri, en la secció corresponent. La sembra es fa per duplicat i cada placa pot tenir com a màxim 6 gotetes. Les plaques de Petri inoculades es deixen tancades sobre la taula del laboratori fins que les gotetes s'hagin solidificat. Les plaques s'incuben, **sense invertir-les**, durant 24 hores a l'estufa a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### 3.1.3.3. Resultats

Utilitzant una lupa de 10 augments, es compten les microcolònies en les dilucions que presenten un nombre igual o inferior a 20 colònies per gota. El càlcul del nombre de bacteris aerobis mesòfils totals revivificables per gram o mil·lilitre d'aliment es fa seguint les indicacions de l'apartat 3.1.1.3.

## 3.2. Recompte, aïllament i identificació de fongs

Els fongs són un grup gran i divers que inclou organismes filamentosos, anomenats *floridures*, i organismes unicel·lulars, anomenats *llevats*. Els fongs són molt importants clínicament i industrialment. Les infeccions causades per fongs s'anomenen *micosis*. Algunes floridures produeixen toxines al·lucinògenes o molt tòxiques quan són ingerides. Les activitats químiques de molts fongs són molt importants en la indústria alimentària. Per exemple, algunes espècies de *Penicillium* confereixen l'aroma característica a formatges com el gorgonzola, el camembert i el rocafort; diferents espècies d'*Aspergillus* s'utilitzen per fermentar la salsa de soja i per produir àcid cítric, àcid glucònic i àcid gàl·lic, i diferents soques de *Saccharomyces cerevisiae* s'empren per fer pa, cervesa i vi.

### 3.2.1. Recompte de fongs

La contaminació fúngica d'un aliment té molta importància no només per la seva acció deterioradora, sinó també per la capacitat d'algunes floridures de sintetitzar una gran varietat de micotoxines, de provocar infeccions i, fins i tot, de provocar reaccions al·lèrgiques en persones hipersensibles als antígens fúngics. Generalment, l'acció dels llevats és simplement infectiva. Per aquests motius, per conèixer la qualitat microbiològica de diferents productes s'ha de fer un recompte de floridures i llevats.

#### 3.2.1.1. Material

- Banc de dilucions de la mostra d'aliment
- Plaques amb 20 mL d'agar OGYE (agar amb extracte de llevat, glucosa i oxitetraciclina)
- Micropipeta de 0,1 mL i puntes estèrils
- Nansa de Digralsky
- Alcohol

- Estufa bacteriològica a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Nansa de Kolle
- Material i reactius per a la tinció de Gram o una tinció simple amb blau de metilè
- Oli d'immersió

### **3.2.1.2. Procediment operatiu**

Se sembren per superfície parts alíquotes de 0,1 mL de les dilucions 1/10 ( $10^{-1}$ ) i 1/100 ( $10^{-2}$ ). Si la mostra és líquida, se sembren parts alíquotes de 0,1 mL de la mostra directa i de la dilució 1/10. S'utilitza l'agar OGYE i se sembren tres plaques per dilució. Les plaques sembrades s'incuben a  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durant 5 dies, si bé es fa una lectura prèvia 2 dies després de la incubació.

Quan l'aliment que es vol analitzar té un alt contingut de proteïna o bé no es disposa d'una estufa a  $22^{\circ}\text{C}$  i les plaques s'han d'incubar a  $35^{\circ}\text{C}$ , és millor utilitzar l'agar rosa de Bengala amb cloramfenicol.

Per a la revivificació de la microbiota fúngica d'un aliment, alguns autors recomanen afegir Tween 80 al medi de resuspensió (0,1 mL de Tween 80 per 1.000 mL de diluent).

### **3.2.1.3. Resultats**

Observarem colònies en la superfície del medi de cultiu. Abans de fer el comptatge, cal distingir les colònies de llevats de les colònies formades pels bacteris presents a la mostra que hagin pogut créixer en aquestes condicions culturals. Per a això, només cal fer una tinció simple, amb blau de metilè, o una tinció de Gram de tots els tipus colonials que puguin induir a error. La cèl·lula d'un llevat és molt més gran que la d'un bacteri. Es compten les colònies de les plaques procedents de la mateixa dilució que presenten entre 0 i 50 colònies fúngiques.

El càlcul del nombre de fongs i llevats per gram o mil·lilitre d'aliment es fa seguint les indicacions de l'apartat 3.1.1.3.

## **3.2.2. Aïllament de floridures i llevats**

Després del recompte, s'han d'obtenir cultius purs de tots els tipus morfològics diferents de colònies fúngiques.

### **3.2.2.1. Material**

- Plaques del recompte de fongs
- Plaques d'agar extracte de malta o d'agar Sabouraud glucosat
- Nansa de Kolle
- Estufa bacteriològica a  $20^{\circ}\text{C}$ - $25^{\circ}\text{C}$

### 3.2.2.2. *Procediment operatiu*

L'aïllament es fa mitjançant sembra per esgotament en plaques d'agar extracte de malta o d'agar Sabouraud glucosat. Les plaques s'incuben durant 5-7 dies a 20-25°C.

### 3.2.2.3. *Resultats*

S'obtenen cultius purs dels diferents tipus de floridures i llevats aïllats.

## 3.2.3. *Identificació de les floridures*

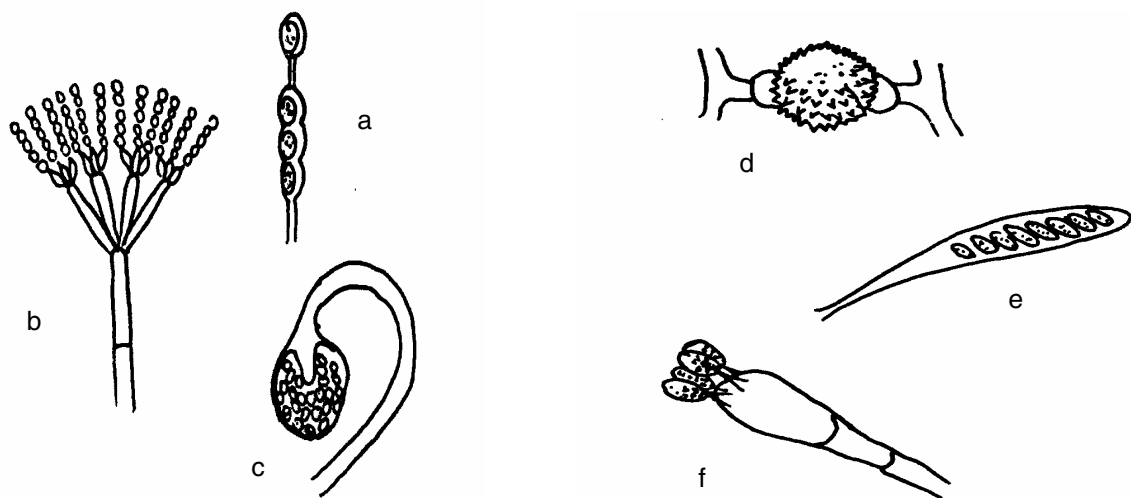
Les floridures són microorganismes eucariotes pluricel·lulars i filamentosos. L'estructura o cos vegetatiu d'un fong s'anomena *tal·lus*. El tal·lus està format per filaments o *hifes*, d'uns 5 µm de diàmetre, que generalment estan ramificats. El conjunt d'hifes s'anomena *miceli*. Generalment, el miceli forma una estructura visible a primera vista. Els fongs creixen per elongació de la part apical de les hifes. Una petita quantitat de miceli és suficient per a la formació d'un nou tal·lus.

Els mecanismes de reproducció dels fongs filamentosos són extraordinàriament diversos i s'utilitzen com a base per a la seva classificació. Es poden distingir dos tipus de reproducció: la sexual i l'asexual. La **reproducció sexual** consisteix en la unió o conjugació de dos nuclis. Aquest procés té lloc en tres etapes: plasmogàmia, cariogàmia i meiosi. En alguns fongs, aquestes tres etapes poden tenir lloc durant diferents estadis del seu desenvolupament. En la figura 3.2 es mostren els tres tipus d'espores sexuals formades pels fongs: *zigòspores*, *ascòspores* i *basidiòspores*.

La **reproducció asexual** dels fongs té lloc per fragmentació o per formació d'espores. Les espores asexuals dels fongs es poden formar de diferents maneres (fig. 3.2). *Clamidòspores*: les cèl·lules de l'interior de l'hifa s'arrodoneixen i queden embolcallades per una paret gruixuda. *Conidiòspores*: espores formades en hifes diferenciades, anomenades *conidiòfors*. Generalment, els conidis formen cadenes o raïms.

En els fongs, la diversitat de les estructures productores de conidis és molt gran i s'utilitza com a característica fonamental per classificar aquest tipus de microorganismes (*Aspergillus*, *Penicillium*... (fig. 3.3)). Alguns fongs formen espores asexuals a l'interior d'un receptacle o una estructura anomenada *esporangi*. Quan assoleix la maduresa, l'esporangi es trenca i s'alliberen les espores, que s'anomenen *esporangiòspores*.



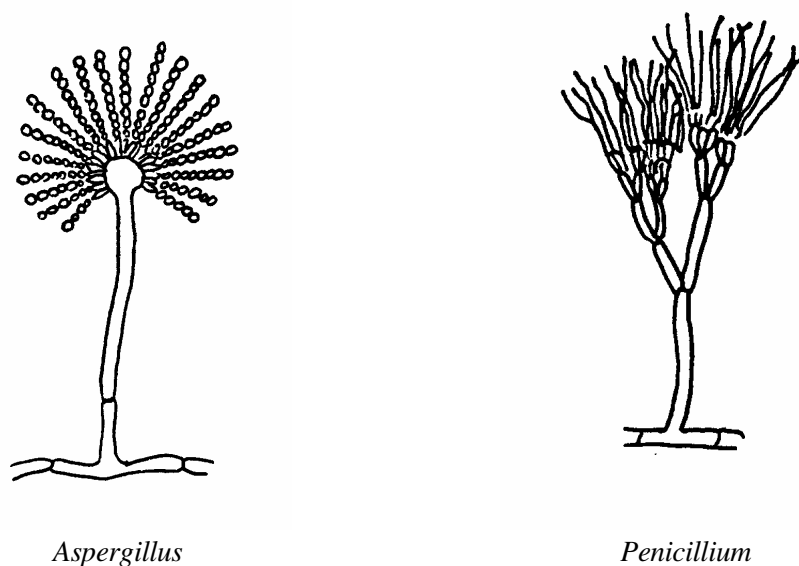


*Espores asexuals*

*Espores sexuals*

FIGURA 3.2. Tipus d'espores formades per les floridures. Espores asexuals: a) clamidòspores, b) conidiòspores, c) esporangiòspores.

Espores sexuals: d) zigòspores, e) ascòspores, f) basidiòspores.



*Aspergillus*

*Penicillium*

FIGURA 3.3. Diferències conidials entre els gèneres *Aspergillus* i *Penicillium*

Els fongs filamentosos es caracteritzen i es classifiquen per l'aspecte de les seves colònies (color, forma, textura superficial), per l'organització de les seves hifes i per l'estructura i l'organització de les seves espores.

### 3.2.3.1. Observació microscòpica de floridures

#### Material

- Cultiu pur en placa
- Nansa de picadura o cinta adhesiva
- Portaobjectes
- Cobreobjectes
- Solució de blau de lactofenol
- Oli d'immersió

#### Procediment operatiu

L'observació microscòpica de fongs es fa pel **mètode de la cambra humida**, utilitzant blau de lactofenol. Es parteix d'un cultiu en medi sòlid i la mostra es pot agafar de dues maneres: utilitzant nanses de picadura o bé cinta adhesiva. En el primer cas se segueix el protocol següent:

1. Es diposita una gota de solució de blau de lactofenol damunt d'un portaobjectes net.
2. Es transferix asèpticament una petita quantitat de miceli a la gota de colorant.
3. Es distribueix homogèniament amb l'ajuda de la nansa de picadura.
4. Es cobreix amb el cobreobjectes i s'observa al microscopi.

Quan no es disposa de nansa de picadura o bé quan no s'ha aconseguit agafar miceli amb l'ajut d'una nansa, la mostra es pot agafar utilitzant cinta adhesiva (fig. 3.4). El protocol que s'ha de seguir és el següent:

1. Es talla un tros de cinta adhesiva una mica més gran que la llargada del portaobjectes.
2. Es col·loca al voltant d'un dels extrems del portaobjectes amb el cantó adhesiu a la part exterior.
3. S'enfonsa l'extrem del portaobjectes amb la cinta adhesiva dins d'una colònia, de manera que fem un tall a la colònia i a l'agar.
4. S'inverteix la cinta adhesiva i es col·loca longitudinalment damunt del portaobjectes de manera que la mostra quedi centrada en el portaobjectes.
5. Es transfereix una gota de solució de blau de lactofenol on hi ha la mostra, que hi entrarà per capil·laritat, i s'observa al microscopi.

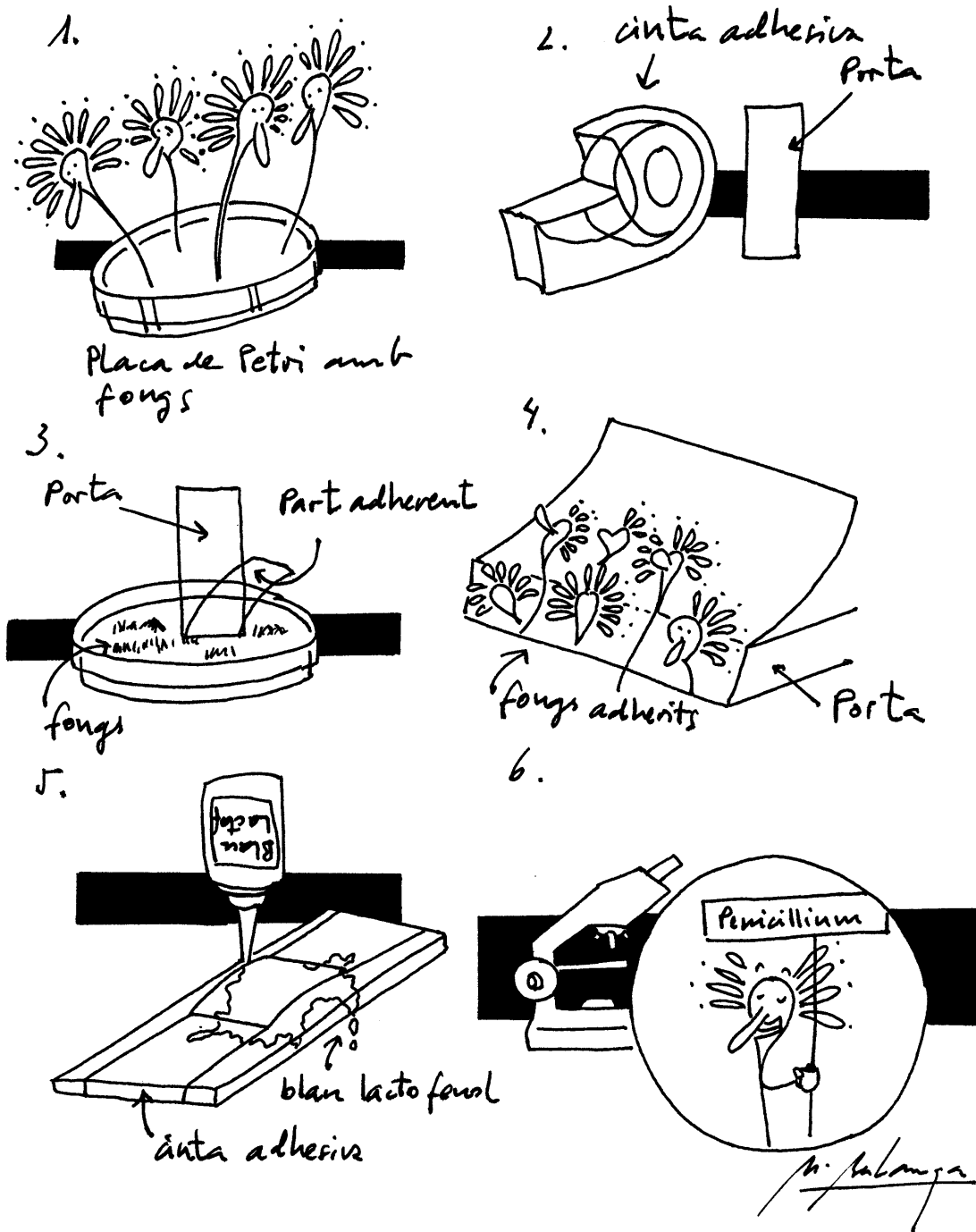


FIGURA 3.4. Protocol de la tinció amb blau de lactofenol. 1) Placa de Petri amb floridures. 2) Es talla un tros de cinta adhesiva una mica més llarg que el portaobjectes. 3) Es col·loca la cinta al voltant d'un dels extrems del portaobjectes amb el cantó adhesiu a la part exterior i s'enfonsa dins d'una colònia fent un tall a l'agar. 4) Els fongs queden adherits a la cinta adhesiva. 5) S'inverteix la cinta adhesiva i es col·loca damunt del portaobjectes. S'hi afegeix una gota de blau de lactofenol. 6) S'observa al microscopi.