



# BÚSQUEDA DE MICROORGANISMOS EN MIEL (S/ CAA)

---

**VET. LIBONATTI CARINA**

**MED. VET. TABERA ANAHI**

**LABORATORIO DE CALIDAD DE MIEL**

**FACULTAD DE CS.VETERINARIAS**

**MAIL DE CONTACTO :[redlab@vet.unicen.edu.ar](mailto:redlab@vet.unicen.edu.ar)**



# MICROORGANISMOS INDICADORES DE CALIDAD

---

- Son microorganismos cuya presencia en determinados alimentos y en cantidades determinadas se utilizan para evaluar la calidad existente o predecir la vida útil de un alimento.
- En la miel se consideran:
  - ***Recuento de Mohos y levaduras***
  - ***Recuento de coliformes totales***

# RECuento DE MOHOS Y LEVADURAS

---



# DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

---

- La metodología se basa en las Normas Internacionales de A. P. H. A. Compendium of Methods for the Microbiology Examination of Foods. Método 17.52- 2<sup>nd</sup> Ed., 1984.

10 g de miel + 90 ml de agua peptonada al 0,1%



Se siembra en placas en YGC Agar  
Se incuba a 22°C 72 hs.

# RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

---

- Método de recuento en placa por extensión en superficie (agar OGY, agar YGC).
- Seleccionar placas correspondientes a una dilución que contengan entre 30 y 300 colonias.
- Se deduce el número de mohos y levaduras viables por g de la muestra de miel relacionada a la dilución correspondiente.

# RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS

---



# RECUENTO DE COLIFORMES TOTALES

---



# RECUESTO DE COLIFORMES TOTALES

---

- La metodología se basa en las Normas Internacionales de ICMSF Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration. Método 4 – 2<sup>nd</sup> Ed., 1978.

10 g de miel + 90 ml de agua peptonada al 0,1%



Se siembra en placas en VRB Agar  
Se incuba a 35°C 24 hs.



# RECuento DE COLIFORMES

---

- Comprende todas las bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas, no formadoras de esporas capaces de fermentar la lactosa produciendo ácido y gas a una temperatura de 32° C dentro de un período de 24 a 48 hs.
- Las pruebas para detectar coliformes en los alimentos nos dan un índice del grado de contaminación de la materia prima, fallas en los procesos de elaboración o recontaminaciones posteriores.

# RECUENTO DE COLIFORMES

- ~~Método de recuento en placa por siembra en profundidad (VRB: Agar Violeta Rojo Bilis)~~
- Únicamente las colonias rojo oscuro que midan 0,5 mm o mas de diámetro , en placas que contengan entre 20 y 200 colonias se considerarán bacterias coliformes.
- Se deduce el número de coliformes viables por g de la muestra de Miel relacionada a la dilución correspondiente.

# RECuento DE COLIFORMES

---



# INDICADORES DE INOCUIDAD

---

- Son microorganismos cuya presencia en determinados alimentos y/o su enumeración en cantidades determinadas se utilizan para evaluar la inocuidad y salubridad de los mismos.
- En la miel se considera:
  - ***Investigación de Salmonella/Shigella spp***

# INVESTIGACIÓN DE SALMONELLA SPP.

- La metodología se basa en las Normas Internacionales A.P.H.A. (2015).  
Detección de *Salmonella* spp. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5th Ed. Chapter 36. Método 36.13.

25 g + 225 ml de caldo lactosado  
Se incuba a 35°C 24 hs.

1 ml + 10 ml de caldo RPVS  
Se incuba 42-43°C 24 hs.

Se siembra en placas en SS Agar  
Se incuba a 35°C 24 hs.

TSI, LIA, IMViC, UREA, FERMENTACIÓN DE AZÚCARES,  
LISINA, ARGININA, ORNITINA, MALONATO

# COLONIAS SOSPECHOSAS DE *SALMONELLA* SPP

---



# CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS (CAA)

<b>Coliformes</b>	<b><math>n = 5</math></b>	<b><math>c = 0</math></b>	<b><math>m = 0</math></b>	<b><math>M = 0</math></b>
	<b><math>&lt; 1 \text{ UFC/g}</math></b>			
<b>Mohos y levaduras</b>	<b><math>n = 5</math></b>	<b><math>c = 2</math></b>	<b><math>m = 10</math></b>	<b><math>M = 100</math></b>
	<b><math>&lt; 10 \text{ UFC/g}</math></b>			
<b>Salmonella/ Shigella spp</b>	<b><math>n = 10</math></b>	<b><math>c = 0</math></b>	<b><math>m = 0</math></b>	<b><math>M = 0</math></b>
	<b><math>SD\text{-}ND/ 25 \text{ g}</math></b>			

N= N° de unidades de muestra. C= máx. N° de unidades muestrales en las que se permite un resultado adverso. m= línea divisoria que separa las unidades de muestra en 2 clases: rechazables y aceptables. M= separa unidades de muestra provisionalmente aceptables de las rechazables.

# DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS QUE INCUMBEN ~~A LA SALUD HUMANA (S/ CAA)~~

- Recuentos de mohos y levaduras
- Determinación de coliformes
- Investigación de *Salmonella* spp
- Investigación de esporas de *Clostridium botulinum*  
(exigencia de Noruega)



# LOQUE AMERICANA

---



# LOQUE AMERICANA

- ~~Enfermedad de la cría de las abejas de 1 a 2 días de edad~~
- Forma infectiva: esporas de *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* que son ingeridas por las larvas
- Muy contagiosa aparece en cualquier época del año
- No se presenta como epidemia, avanza en forma progresiva
- Difusión mundial. En Argentina se detectó por primera vez en 1989 y ahora está ampliamente diseminada. Ingresó al país por una importación de reinas de USA.

# LOQUE AMERICANA

- ~~Diseminación: las abejas encargadas de la limpieza~~ remueven las larvas muertas, contaminación entre colmenas, por pillaje, enjambres, intercambio de marcos, paquetes, abejas, servicio de polinización.
- Esporas termoresistentes: 100° C durante 30´.
- Una escama:  $2,5 \times 10^9$  esporas
- Las escamas se rompen y son de difícil extracción
- Contaminación de microorganismos acompañantes: *Paenibacillus alvei* (olor pútrido)

# DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS QUE INCUMBEN A LA SANIDAD ANIMAL NO ZONÓTICA

---

- Investigación de esporas de *Paenibacillus larvae*  
(exigencia de Chile y Brasil)

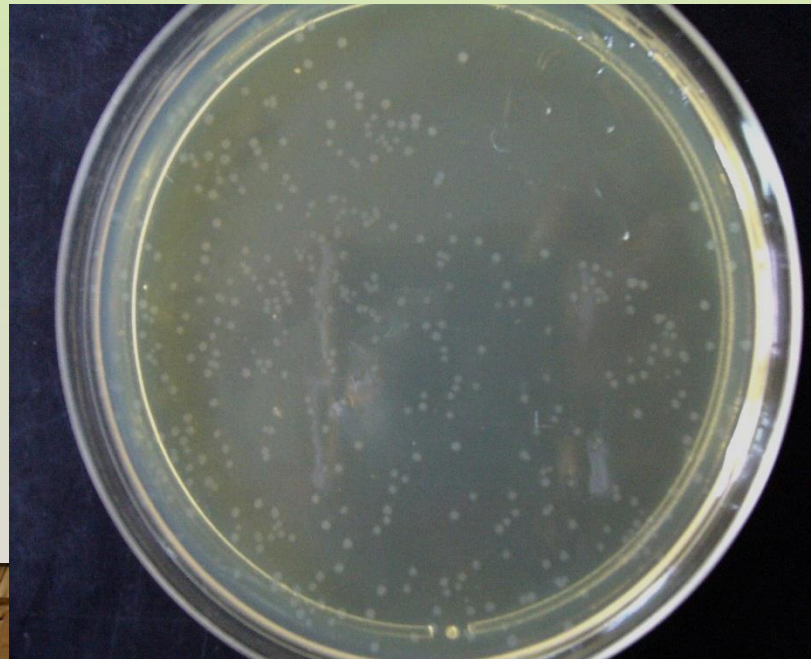
# TÉCNICA

- Se pesan 21 gr. de miel. Se mezclan con 30 ml de buffer pH 7. Se homogeneiza la muestra.
- Se toman 13 ml de la muestra y se introducen en tubo de vidrio o plástico de centrifuga.
- Centrifugar a 3000 rpm durante 30 minutos.
- Se tira el sobrenadante y el resto es sometido a un shock térmico durante 10 minutos a no mas de 80-85° C.
- Se plaquea 15 ml de medio agar MPYGP, previo agregado de ácido nalidíxico.
- Se siembra 0,1 ml de la muestra problema.
- Incubar las placas de petri en posición invertida a 37° C en una atmósfera con CO<sub>2</sub> durante 7 días.

# VISUALIZACIÓN DE LAS COLONIAS

---

- Las colonias de Loque americana se presentan de color blanquecino, esféricas, con bordes irregulares y pequeñas.



# PRUEBAS DE CONFIRMACIÓN DEL *PAENIBACILLUS LARVAE*

---

- Coloración de Gram (Gram +)
- Catalasa (-)
- Voges Proskauer (-)
- Almidón (-)
- Gelatina (+)
- d-Manitol v
- Citrato (-)
- Caldo Nutritivo (-)

# COLORACIÓN DE GRAM

---

