

Calidad y tecnología de miel y de la producción apícola.

Trabajo Práctico N° 9

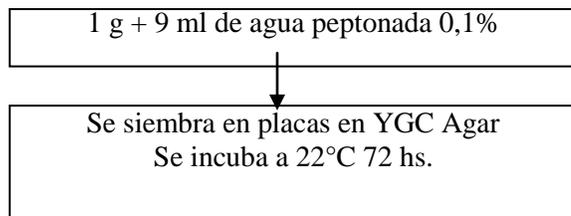
- Conocer los protocolos de análisis microbiológicos de mieles
- Conocer el protocolo para la determinación de esporas de *Loque americana* en miel.
- Conocer el protocolo que se utiliza para determinar la actividad antimicrobiana del propóleo
- Conocer una metodología para la determinación de calidad de propóleos.

1) Análisis microbiológico de mieles

DETERMINACIÓN DE MOHOS Y LEVADURAS

➤ Metodología:

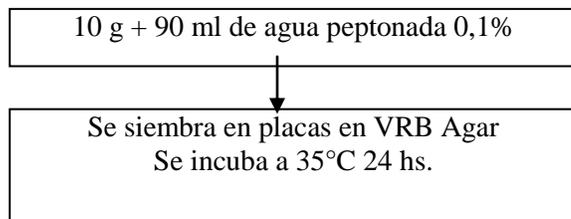
La metodología se basa en las Normas Internacionales de A. P. H. A. Compendium of Methods for the Microbiology Examination of Foods. Método 17.52- 2nd Ed., 1984:



INVESTIGACIÓN DE COLIFORMES

➤ Metodología:

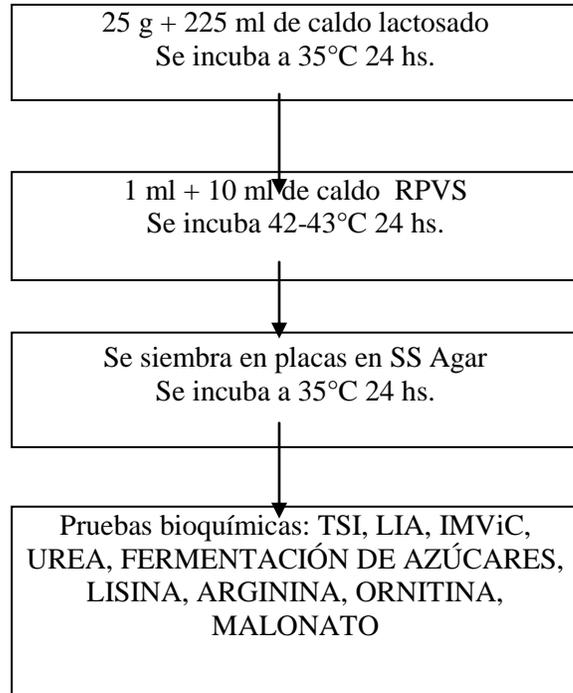
La metodología se basa en las Normas Internacionales de ICMSF Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration. Método 4 – 2nd Ed., 1978.



INVESTIGACIÓN DE SALMONELLA spp.

➤ Metodología:

La metodología se basa en las Normas Internacionales de A. P. H. A. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Método 26.12- 2nd Ed., 1984.



Los criterios microbiológicos que deberá cumplir la miel son:

- Mohos y levaduras: < 10 UFC/g
- Coliformes totales: ausente
- Salmonella spp.: SD/ en 25 g

2) Técnica para determinación de esporas de Loque Americana en miel.

1. Se pesan 21 gr. de miel. Se mezclan con 30 ml de buffer pH 7. Se homogeneiza la muestra.
2. Se toman 13 ml de la muestra y se introducen en tubo de vidrio o plástico.
3. Centrífugar a 3000 rpm durante 30 minutos.
4. Se tira el sobrenadante y el resto es sometido a un shock térmico durante 10 minutos a no mas de 80/ 85 °C.
5. Se plaquea 15 ml de medio agar MPYGP, previo agregado de ácido nalidixico.
6. Se siembra 1 ml de la muestra problema.
7. Incubar las placas de petri en posición invertida a 37°C en una atmósfera de presión de CO2 en aire 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 Larve*:

Coloración de Gram (Gram +)

Catalasa (-)

Voges-Proskauer (-)

Almidón (-)

Gelatina (+)

d-Manita V

Citrato (-)

CN (-)

Las más comunes realizadas como rutina para la confirmación de L.A son las pruebas de catalasa, seguida de una coloración de Gram.

3) Metodología microbiológica para la detección de antibióticos en miel

1. Se pesa 1 gr de miel en un tubo de ensayo perfectamente limpio y seco.
2. Se le agrega 1 ml de buffer fosfato pH 7,2 y se lo agita con Vortex, hasta obtener una solución homogénea.
3. A partir de una suspensión de esporos de *Bacillus cereus* ATCC 11337 se toma una ansada y se siembra en 10 ml en caldo nutritivo.
4. Se lo incuba durante 18 a 20 hs a 36 °C.
5. Se lleva la suspensión de bacterias a una concentración correspondiente a una absorbancia de 0.014 a 625 nm.
6. Por otra parte se fracciona Agar ATB No. 8 (DIFCO) en erlenmeyer de 250 ml y de esta manera se esteriliza en autoclave.
7. Cuando el agar alcanza una temperatura de aproximadamente 45 °C, es inoculado con 1.25 ml de la suspensión de bacterias obtenidas, homogeneizado con agitador Vortex y volcado dentro de una placa estéril.
8. Una vez que la placa se encuentra seca se apoyan los cilindros de acero inoxidable estériles y se introducen en ellos 100 µl de la solución de miel. Cada muestra es analizado por triplicado conjuntamente con las soluciones estándar que son preparadas en el momento de ser usadas.
9. Se lo incuba durante 16 hs a 36 °C, y luego se toma el diámetro del halo de inhibición mediante un calibre tipo Vernier.

Los resultados considerados positivos serán aquellos donde el halo de inhibición supere los 0,62 mm de diámetro.

4) Actividad antimicrobiana en propóleos

Metodología: Método de difusión en placa por pocillos

- Se analizan los extractos etanólicos en distintas concentraciones
- Se preparan los inóculos a partir de cepas de:
 - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - *Escherichia coli* ATCC 25922

Preparación de inóculo:

- Se parte de cultivos puros y frescos, sembrados en overnight, en agar nutritivo.

- Se arrastra la biomasa con sol. Fisiológica
- Esta suspensión se compara con Escala de Mc Farland hasta alcanzar la turbidez del tubo 0,5
- Agar Muller Hinton
- Agregar al medio fundido el inóculo
- Se realizan los pocillos con sacabocados estéril
- Se cargan los pocillos con las muestras a distintas diluciones (10%, 5%, 1,25%, 0,63%, 0,31%)
- En cada placa va un pocillo central con etanol al 70% de control
- Se cubren las placas con papel de filtro
- Posteriormente se incuban a 35- 37°C durante 18-24 hs.

Resultados: Lectura de placas:

- Placas positivas: Orificios con halos de inhibición transparentes
- Placas negativas: crecimiento del inóculo hasta el borde del orificio
- Medición de halos con calibrador en distintas direcciones

5) Calidad de propóleos: Determinación de polifenoles

Propóleos en bruto

- Pesar 0,2 g de propóleos, colocar en mortero y agregar 5 ml de alcohol de 96°C a 40°C.
- Triturar con pilón
- Agregar 15 ml de etanol y filtrar con papel de filtro
- En tres tubos enumerados colocar 1 ml de la solución anterior y agregar:

- 1) 1 ml de acetato de Pb
- 2) 1 ml de hidróxido de sodio
- 3) 0,5 ml de cloruro férrico

En tinturas y jarabes

Tomar 1 ml diluir con 9 ml de etanol y efectuar los ensayos como en el punto 4.

Resultados:

Reacción positiva:
1 tubo: solución turbia, color amarillo opaco
2 tubo: sol. naranja- pardo o naranja
3) sol. naranja, verde o pardo oscuro