



RESOLUCION OENO 15/2003

BACTERIAS LACTICAS

LA ASAMBLEA GENERAL,

Visto el Artículo 5, párrafo 4 de la Convención internacional de unificación de los métodos de análisis y de apreciación de los vinos del 13 de octubre de 1954,

A propuesta de la Subcomisión de métodos de análisis y de apreciación de los vinos,

DECIDE remplazar en el Codex enológico internacional, la monografía existente por la monografía siguiente:

BACTERIAS LACTICAS

1. OBJETO, ORIGEN Y CAMPO DE APLICACION

Las bacterias lácticas son utilizadas en enología para efectuar la fermentación maloláctica. Dichas bacterias deben pertenecer a los tipos *Oenococcus* (*Leuconostoc*), *Lactobacillus* y *Pediococcus* y deben haber sido aisladas de las uvas, los mostos o de los vinos o cultivos derivados del cruzamiento de estas mismas bacterias (cultivos madres originales) que deben ser conservadas en condición de estabilidad genética.

La obtención y la utilización de bacterias genéticamente modificadas (O.G.M.) deben haber sido objeto de una autorización previa de una autoridad competente.

Una bacteria láctica utilizable en enología debe transformar el ácido málico del mosto o del vino en ácido láctico y en dióxido de carbono, no debe producir aminas biógenas, a menos que sea en cantidades mínimas y no debe transmitir gusto extraño ni producir sustancias nocivas para la salud humana.

2. ETIQUETADO

Deben figurar sobre la etiqueta:

- El nombre del género y de la especie, así como la referencia de la(s) cepa(s) atribuida(s) por un organismo oficial de registro de los microorganismos o por instancias internacionales, el seleccionador, el origen y el seleccionador de la cepa y eventualmente el autor que realizó su aislamiento.
- Las instrucciones de uso o el método de reactivación y los eventuales aditivos preconizados por el fabricante.
- La cantidad de células revivificables por gramo de preparación que es garantizada por el fabricante, la pérdida de viabilidad por mes de conservación en las condiciones definidas de temperatura, humedad y aereación, así como el número de lote, la fecha límite de utilización y las condiciones de conservación.
- La indicación de que las bacterias lácticas fueron obtenidas por modificaciones genéticas y también la característica modificada (si es el caso).



3. CARACTERISTICAS

Son utilizadas, ya sea bajo forma líquida, o bajo forma congelada, o bajo forma de polvo obtenido por liofilización o secado, en cultivo puro o en asociación de cultivos puros.

4. LIMITES Y METODOS DE ENSAYO

4.1 – Humedad

Medida por la pérdida de peso de 5 g de producto, secado a 105 °C hasta peso constante (alrededor de 3 horas)

El contenido máximo debe ser inferior a 8%.

4.2 – Metales pesados

Proceder a la dosificación según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser inferior a 10 mg/kg de materia seca, expresada en plomo.

4.3 – Plomo

Proceder a la dosificación según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser inferior a 5 mg/kg de materia seca.

4.4 – Mercurio

Proceder a la dosificación según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser inferior a 1 mg/kg de materia seca.

4.5 - Arsénico

Proceder a la dosificación según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser inferior a 3 mg/kg de materia seca.

4.6 – Cadmio

Proceder a la dosificación según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser inferior a 1 mg/kg de materia seca.

4.7 - Micotoxinas¹

4.8 – Bacterias lácticas revivificables

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional.

El contenido debe ser superior o igual a 10^8 UFC/g o 10^7 UFC/ml.

4.9 – Contenido de células revivificables de bacterias lácticas de una especie diferente de la o las cepas indicadas ²

4.10 – Mohos

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

El contenido debe ser inferior 10^3 UFC/g de polvo.

¹ Punto que será estudiado ulteriormente por la Subcomisión de los métodos de análisis y de apreciación de los vinos.

² Punto que será estudiado por el grupo de expertos "Microbiología del vino"

4.11 - Bactéries acétiques contaminantes

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

La cantidad debe ser inferior a 10^3 UFC/g de polvo o 10^3 UFC/ml. La suma *Acetobacter* + *Gluconobacter* debe ser inferior a 10^3 UFC/g de polvo o 10^3 UFC/ml.

4.12 - Levaduras

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

La cantidad de células revivificables de levaduras contaminantes (como por ejemplo *Schizosaccharomyces* o *Brettanomyces*) totales debe ser inferior a 10^3 UFC/g de polvo o 10^3 UFC/ml.

4.13 - Salmonellas

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

Su ausencia debe ser controlada en una muestra de 25 g.

4.14 - *Pseudomonas aeruginosa*³

4.15 - *Escherichia coli*

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

Su ausencia debe ser controlada en una muestra de 1 g.

4.16 - Estafilococos

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

Su ausencia debe ser controlada en una muestra de 1 g.

4.17 - Coliformes

Proceder al recuento según el método que figura en el Capítulo II del Codex enológico internacional (método en anexo de la presente resolución).

La cantidad debe ser inferior a 10 UFC/g.

5. ADITIVOS

Deben ajustarse a las normativas en vigor.

6 – CONSERVACION

No conservar en acondicionamiento abierto y/o a temperaturas superiores a 10 °C.

Las condiciones de conservación varían según los modos de preparación y de acondicionamiento. En todos los casos, referirse a las prescripciones del fabricante.

³ El punto será estudiado ulteriormente por el grupo de expertos « Microbiología del vino »

METODOS DE ANALISIS MICROBIOLOGICOS

(se hará figurar en el Capítulo II del Codex enológico internacional)

1 – Rehidratación previa de las bacterias

- pesar en forma estéril 1 g de bacterias lácticas,
- agregar en forma estéril 100 ml de agua a temperatura ambiente (20 °C)
- homogeneizar con una placa magnética durante 5 mn
- dejar luego durante 20 mn siempre a temperatura ambiente (20 °C)
- homogeneizar durante 5 mn a temperatura ambiente (20 °C)
- extraer en forma estéril 10 ml y proceder a los controles microbiológicos.

2 –Determinación de la cantidad de bacterias lácticas revivificables.

2.1 - Medio MTB/s agar

Composición:

Glucosa	15 g
Peptona	8 g
Extracto de levadura	5 g
Hidrolizado de caseína	1 g
Zumo de tomate	20 ml
Acetato de Na	3 g
Citrato de NH ₄	2 g
Acido málico	6 g
Sulfato de Mg	0,2 g
Sulfato de Mn	0,035 g
Tween 80	1 ml
TC Vitamina mínima Eagl	10 ml

después de la esterilización:

ajustar pH 5,0 y agregar

Agar	2%
Agua	c.s.p 1000 ml

Sorbato de potasio (400 mg/l de medio líquido) o

agregar directamente en la caja de Petri 0,2 ml de una solución hidroalcohólica de pimaricina de 25% m/v.

Esterilización a 120 °C durante 20mn

Incubar en anaerobio para contrastar los mohos a 25 °C durante 8 a 10 días.

2.2 - Medio Man, Rogosa y Sharpe (MRS)

Las bacterias son cultivadas en un medio MRS líquido (Man, Rogosa, Sharpe 1960) cuya composición es la siguiente :

Agar agar	15 g
Bacto-peptona	10 g
Extracto de carne	10 g
Extracto de levadura	5 g
Acetato de sodio	5 g



RESOLUCION OENO 15/2003

K ₂ HPO ₄	2 g
Citrato trisódico	2 g
MgSO ₄ a 100 mg/l	2,5 ml
MnSO ₄ a 20 mg/l	2 ml
Tween 80	1 ml
Acido DL málico	5 g
Zumo de tomate concentrado*	20 ml
Glucosa	20 g
Ajustar (HCl o NaOH)	pH 4,8
Agua destilada	c.s.p. 1000 ml

Poner en autoclave a 120 °C durante 20 min

Sorbato de potasio (400 mg/l de medio líquido) o
agregar directamente en la caja de Petri 0,2 ml de una solución hidroalcohólica de pimaricina de
25% m/v

Incubar a 25 °C durante 8 a 10 días en anaerobiosis

*el zumo de tomate está destinado a mejorar el crecimiento de las bacterias lácticas.

preparación : elegir zumo de tomate en conserva que contenga al menos 7 g/l de Na Cl (maxi 9 g/l)
centrifugar à 4000 g pendant 20 mn ;
recoger el zumo claro y filtrar sobre papel filtro;
poner en autoclave a 120 °C durante 20 mn.

3 - Mohos

medio Czapeck-Dox/s gelosado

Composición :

Agar agar	15 g
Sacarosa	30 g
NaNO ₃	3 g
K ₂ HPO ₃	1 g
MgSO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
FeSO ₄	0,01 g
Sorbato de potasio	0,4 g
Agua	c.s.p. 1000 ml
Ajustar	PH 3,5

Esterilización a 120 °C durante 20 mn

Agregar directamente en la caja de Petri 0,1 ml de una solución de penicilina de 0,25% en alcohol
puro.

Incubar en aerobiosis a 25 °C durante 10 días.



4 – Bacterias acéticas contaminantes

4.1 – Bacterias acéticas contaminantes

Medio Act/s agar

Composición:

Agar agar bacteriológico	20 g
Extracto de levadura	5 g
Acidos aminados de caseína	5 g
Glucosa	10 g
Ajustar a	pH 4,5
Agua	c.s.p. 1000 ml

Esterilización a 120 °C durante 20 mn
Incubar en aerobiosis a 25 °C durante 7 días.

Sorbato de potasio (400 mg/l de medio líquido) o
agregar directamente en la caja de Petri 0,2 ml de una solución hidroalcohólica de pimaricina de 25% m/v

4.2 – Para la búsqueda de *Acetobacter*

Medio Acb/s agar

Composición:

Extracto de levadura	30 g
Alcohol 95° vol.	20 ml
Verde de bromocresol (sol. 2,2%)	1 ml
Agar	2%
Agua	c.s.p. 1000 ml

Esterilización a 120 °C durante 20 mn.

Agregar directamente en la caja de Petri 0,1 ml de una solución de penicilina de 0,25% en alcohol puro.

Agregar directamente en la caja de Petri 0,2 ml de una solución hidroalcohólica de pimaricina de 25% m/v

Incubar en aerobiosis a 25 °C durante 7 días

4.3 – Para la búsqueda de *Gluconobacter*

Medio Gcb/s agar

Composición

Autolisado de levadura	10 g
Glucosa	3 g
CaCO ₃	3 g
Agar	2%
Agua	c.s.p. 1000 ml

Esterilización a 120 °C durante 20 mn

Agregar directamente en la caja de Petri 0,1 ml de una solución de penicilina de 0,25% en alcohol puro.



RESOLUCION OENO 15/2003

Agregar directamente en la caja de Petri 0,2 ml de una solución hidroalcohólica de pimaricina de 25% m/v

(El CaCO_3 facilita el reconocimiento de las colonias de *Gluconobacter* que lo disuelven produciendo una zona circular más clara alrededor de la colonia)
Incubar en aerobiosis a 25 °C durante 7 días

5 – Recuento de las levaduras

5.1 – Medio YM agar (MALT WICKERHAM)

Composición:

Agar agar bacteriológico	15 g
Extracto de levadura	3 g
Extracto de malta	3 g
Peptona	5 g
Glucosa	10 g
Agua	c.s.p. 1000 ml

Antes de su utilización, el medio debe ponerse en autoclave a 120 °C durante 20 mn.

Luego de la inseminación, las cajas son puestas a incubar a 25 °C en anaerobiosis de 48 a 72 horas.
Contar la cantidad de UFC y registrar el peso de materia seca.

5.2 - Medio YMS agar

Composición :

Gelosa	20 g
Glucosa	20 g
Extracto de levadura	5 g
Extracto de malta	3 g
Peptona	2 g
Acido málico	4 g
Zumo de uva	100 ml
Complejo de vitaminas*	1%
Agua	c.s.p. 1000 ml

Antes de su utilización, el medio debe ponerse en autoclave a 120 °C durante 20 mn.

Luego de la inseminación, las cajas son puestas a incubar a 25 °C en anaerobiosis de 48 a 72 horas.
Contar la cantidad de UFC y registrar el peso de materia seca.

* Complejo de vitaminas (inositol 25 mg, biotina 0,02 mg, pantotenato de Ca 4 mg, ácido fólico 0,002 mg, nicotinamida 4 mg, ácido paraminobenzoico 2 mg, clorohidrato de piridoxina 4 mg, riboflavina 2 mg, tiamina 10 mg, agua c.s.p. 1000)

5.3 - Medio OGA

Composición :

Extracto autolítico de levadura	5 g
Glucosa	20 g
Agar agar bacteriológico	15 g
Eau	c.s.p. 1000 ml

Poner en autoclave a 120°C durante 20 mn.

Luego de inseminación, incubación en aerobiosis a 25 °C durante 48 a 72 horas.
Contar la cantidad de UFC y registrar el peso de materia seca.

6. Recuento de salmonelas

6.1. Principio

La muestra pasa por una fase de pre-enriquecimiento en agua peptonada tamponada unas 16 a 20H a 37 °C. Luego de esta etapa, una parte alícuota de este caldo es inoculada en un dispositivo para cultivo, que debe contener un medio específico y 2 tubos especiales (constituidos por dos partes), y se incuba durante 24 H a 41 °C. Las *Salmonella* emigran de la parte inferior (medio selectivo) a la parte superior (medio indicador). La presencia de *Salmonella* se traduce en un cambio de coloración de esta última.

6.2. Aparatos y condiciones analíticas

Las puestas en cultivo y las diversas preparaciones son realizadas en la zona de esterilidad asegurada por el mechero Bunsen. El material utilizado es sometido a una destrucción por autoclave 1 H a 120 °C o por inmersión en lejía durante 18 H como mínimo (cf procedimiento de limpieza).

- Probeta en vidrio estéril de 125 ml
- bolsa stomacher estéril.
- barreta de cerramiento.
- stomacher.
- tubos de vidrio estériles 16x160 mm.
- tubos de ensayo de vidrio 20x 220 algodónados.
- pipetas estériles de material plástico de 2 ml graduadas en 0,1 ml.
- pipetas estériles de material plástico de 10 ml graduadas en 0,1 ml.
- agitador de tubos.

Dispositivo para rehidratar cultivo.

- una jeringa estéril en material plástico de 2 ml con una aguja estéril.
- pinza brucelle.
- llave para destapar los tubos A y B del dispositivo de cultivo.
- lámina de vidrio limpia.
- pipetas Pasteur estériles algodónadas.
- Öse.
- estufa a 41 °C ± 1 °C.
- estufa a 37 °C ± 1 °C.
- mechero Bunsen.

6.3. Reactivos

- Agua peptonada estéril (EPT)
- agua destilada estéril (EDS).
- frasco estéril de 500 ml atornillado, previamente llenado con 125 ml de EPT .
- frasco estéril de 500 ml atornillado, previamente llenado con 225 ml de EPT .
- medio especial para *Salmonella* :SRTEM.
- disco de novobiocina (1,8 mg de novobiocina).
- gelosa Hektoën (cf DOMIC-08).
- galerie API 20E.
- tubos de gelosa TSAYE inclinada .
- solución de NaCl estéril a 8,5 g/l
- suero anti *Salmonella*.

6.4. Modo de operar

6.4.1 Preparación de la solución madre

La solución madre difiere según la naturaleza de los productos y del índice de dilución.

Agregar en un sachet stomacher una toma de ensayo de 25 gramo(s) ou millilitro(s) de producto a una cantidad de agua peptonada 9 veces superior

Cerrar el sachet por soldadura térmica o con una barrette.

Triturar con el stomacher durante 1 minuto.

6.4.1.1 Fase de pre-enriquecimiento en medio no selectivo líquido:

Incubar la suspensión madre unas 16 a 20H a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4.1.2 Enriquecimiento en medio selectivo líquido:

Preparación del dispositivo de cultivo

- desatornillar la tapa del recipiente para cultivo;
- agregar EDS hasta la línea 1 marcada sobre el cuerpo del recipiente.

Observación : La base de los tubos A y B debe estar situada bajo el nivel del agua.

- adaptar la aguja a la jeringa y asegurarse de que el pistón de la jeringa está hundido (ausencia de aire) ;
- introducir verticalmente la aguja fijada a la jeringa en la pastilla de caucho en el centro del tapón del tubo A (tapón azul), asegurándose que la aguja sea visible bajo este tapón ;
- tirar delicadamente sobre el cuerpo de la jeringa hasta que el líquido llegue a la línea 3 marcada sobre el cuerpo del recipiente.

Observación: no aspirar líquido con la jeringa.

esta operación debe tomar alrededor de 5 segundos.

- Repetir la operación para el tubo B (tapón rojo) ;
- Bien atornillar nuevamente el tapón del recipiente de cultivo;
- Apoyar el costado del recipiente sobre un agitador de tubo manteniéndolo al menos 5 segundos.

Observación: el líquido en los tubos A y B debe ser fuertemente agitado.

- Dejar reposar el dispositivo de cultivo al menos durante 5 minutos ;
- Desatornillar el tapón del recipiente de cultivo y verter el medio SRTEM hasta que el nivel alcance la línea 2 marcada sobre el cuerpo del recipiente;
- Agregar con la pinza *brucelle* un disco de novobiocina ;
- Retirar los tapones de los tubos A (azul) y B (rojo) con la llave, luego tirarlos.

Observación: evitar tocar con las manos los tubos así como también las paredes internas del dispositivo.

Inoculación del dispositivo de cultivo.

- Homogeneizar el cultivo de pre-enriquecimiento;
- Identificar el dispositivo de cultivo anotando el número de análisis en la tapa;
- Desatornillar la tapa.
- Con una pipeta de 2 ml introducir 1 ml de cultivo de pre-enriquecimiento en el recipiente de cultivo.
- Atornillar el tapón sobre el dispositivo de cultivo.
- Anotar la fecha y la hora de incubación.
- Incubar $24\text{H} \pm 30\text{ mn}$ a $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ en posición estrictamente vertical.

6.4.2 Lectura e interpretación

Ella es realizada observando, a través de las paredes del recipiente, la parte superior de los tubos A y B.

La presencia eventual de *Salmonella* se caracteriza por una modificación del color del medio indicador situado en la parte superior de uno de los dos tubos o de los dos tubos:

REACCION	TUBE A	TUBE B
positivo :	todos los grados de coloración negra.	todos los grados de coloración roja o negra
negativo :	ausencia de coloración negra	ausencia de coloración roja o negra

El o los tubo(s) que presentan una reacción positiva es o son sometidos a un aislamiento sobre gelosa selectiva.

- Secar las cajas de gelosa Hektoën en una estufa a $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la desaparición completa de las pequeñas gotas de la superficie del medio (tapa retirada y superficie de la gelosa retornada hacia abajo).
- Extraer una öse en la superficie del medio indicador positivo e inocular en 5 ml de EPT, acondicionados en un medio estéril 16x160 mm, para obtener una dilución del cultivo.
- Proceder de esta manera para cada uno de los tubos positivos.
- Identificar la caja anotando sobre la tapa el nº de análisis y la letra del tubo en curso de confirmación.
- Homogeneizar la dilución del cultivo, extraer una öse.
- Aislar en la superficie de la gelosa Hektoën para permitir el desarrollo de colonias aisladas.
- Incubar 24H a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- seleccionar al menos 2 colonias aisladas consideradas como típicas

6.4.3. Confirmación

6.4.3.1 Tests bioquímicos

- Identificar las diferentes colonias por el empleo de galerías miniaturizadas específicas (galerie API 20E) reportándose a las prescripciones del fabricante.
- incubar 24H a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- inocular en paralelo: una gelosa para confirmar la pureza de la cepa.
1 gelosa TSAYE inclinadas para la tipificación serológica.
- incubar 24H a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- lire la galerie API20E siguiendo las indicaciones del fabricante.
- comparar el perfil obtenido a los perfiles tipo dados por el fabricante.
- conservar la gelosa TSAYE inclinada en el refrigerador hasta su utilización.

6.4.3.2 Tests serológicos :

Son realizados cuando el perfil de una cepa corresponde a una *Salmonella*. Los tests son realizados según las prescripciones definidas por el fabricante a partir de cultivo puro obtenido sobre la gelosa y luego de la eliminación de las cepas auto-aglutinables.



RESOLUCION OENO 15/2003

Eliminación de las cepas auto-aglutinables:

- Colocar una gota de solución salina 8,5 g/l sobre una lámina de vidrio perfectamente limpia.
- Dispersar en ella un poco de cultivo extraído de la gelosa nutritiva para obtener una suspensión homogénea y turbia con ayuda de una pipeta Pasteur.
- Hacer oscilar la lámina 30 a 60s.
- Observar sobre el fondo negro con ayuda de una lupa: si se observan agrupamientos más o menos distintos la cepa es considerada como auto-aglutinable y no puede ser sometida a la tipificación serológica.

6.5. Resultados

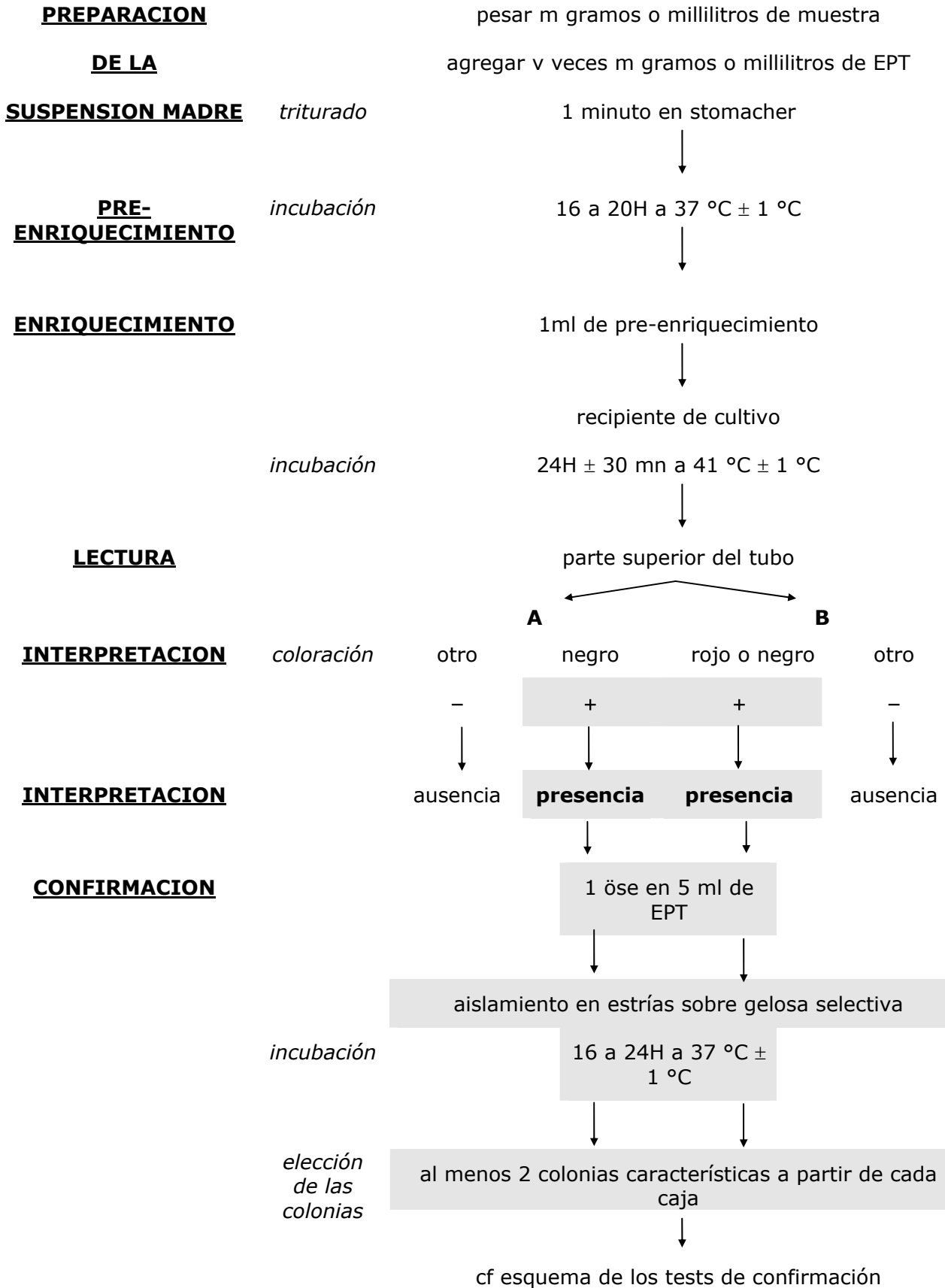
Según los resultados de la interpretación de los tests bioquímicos y serológicos, el resultado se expresa de la manera siguiente:

- Presencia de Salmonella en m gramo(s) o ml de producto.
- Ausencia de Salmonella en m gramo(s) o ml de producto.



RESOLUCION OENO 15/2003

Esquema del modo de operar

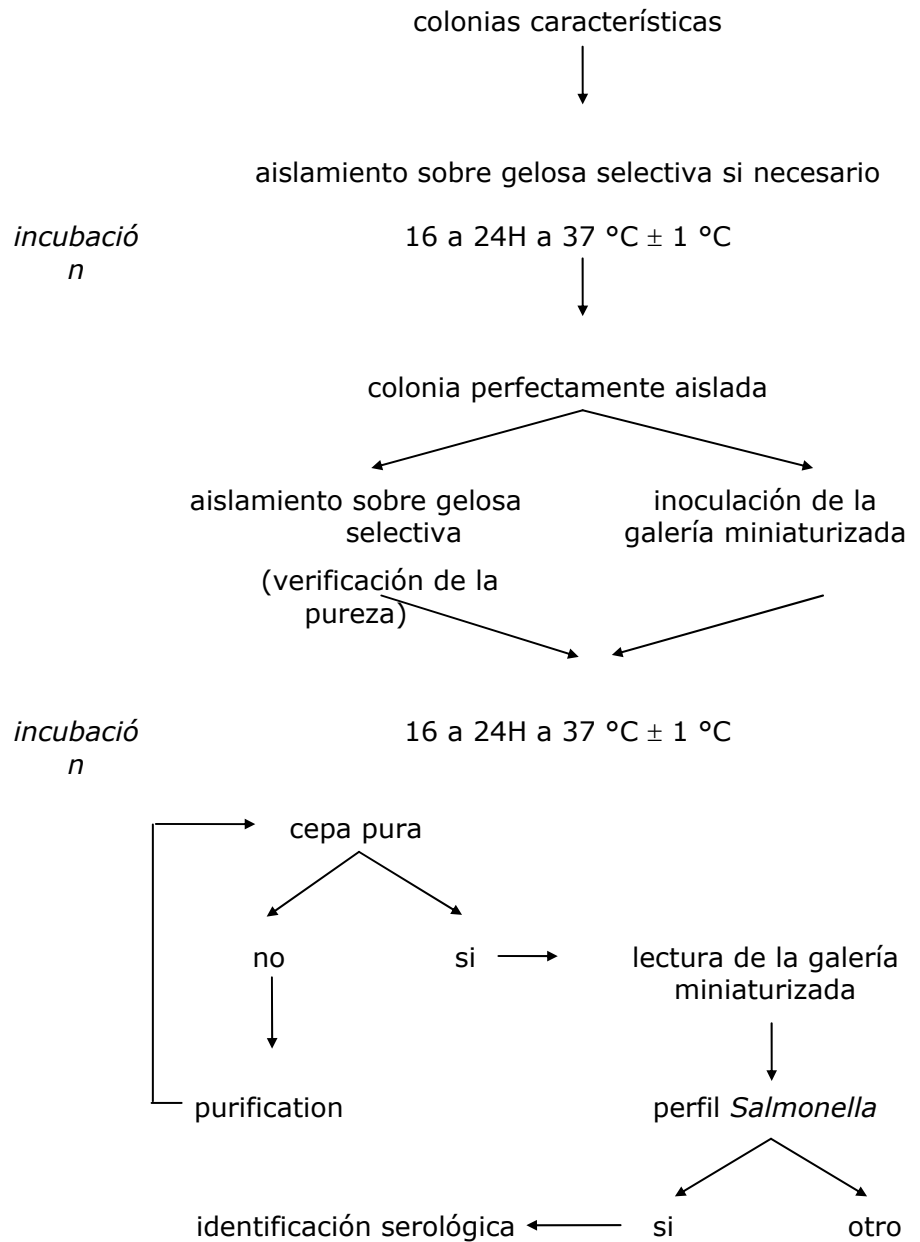


Esquema de los tests de confirmación

ELECCION DE LAS COLONIAS

PURIFICACION

IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE



IDENTIFICACION

SEROLOGICA

repicados

sobre gelosas TSAYE inclinadas

- 1 tubo para la serología

serología

ausencia de auto-aglutinación y aglutinación de los antígenos O :

Salmonella



RESOLUCION OENO 15/2003

Esquema de las interpretaciones bioquímicas y serológicas.

Reacciones bioquímicas	Auto-aglutinación	Reacciones serológicas	Interpretación
típicas	no	antígeno «O» positivo	<i>Salmonella</i>
típicas	no	reacciones negativas	envío a un centro autorizado para determinación del serotipo
típicas	si	no efectuadas	

7. Recuento de los *Escherichia coli* por conteo de las colonias obtenidas a 44 °C

7.1. Principio

Se realiza una inoculación en profundidad en gelosa Rapid *E.coli* en caja de Petri para cada una de las diluciones seleccionadas. Luego de una incubación de 24 H a 44 °C, se hace un recuento de todas las colonias características que aparecen.

7.2. Material de laboratorio y condiciones analíticas

Las puestas en cultivo son realizadas en la zona de esterilidad asegurada por el mechero Bunsen.

Cajas de Petri estériles en material plástico de 90 milímetros de diámetro.
Tubos de ensayo estériles de vidrio 16 x 160 algodónados.
Porta tubos
Pipetas estériles en material plástico de 2 ml graduadas en 0,1 ml.
Baño de agua a 100 °C ± 2 °C.
Baño de agua a 47 °C ± 2 °C.
Agitador de tubos.
Estufa a 44 °C ± 1 °C.
Mechero Bunsen.
Contador de colonias.

7.3. Reactivos

Diluyente estéril para diluciones decimales: triptona sal (TS)
Tubos 16 x 160 estériles pre-rellenados con 9ml de TS estéril
Gelosa Rapid *E.coli* en sobrefusión (R.EC)

7.4. Modo de operar

7.4.1 El medio gelosado

- Derretir la gelosa R.EC en baño de agua a 100 °C evitando todo sobrecalentamiento.
- Jamás utilizar un medio de cultivo a una temperatura superior a 50 °C.
- Para una utilización inmediata, mantener la gelosa en baño de agua a 47 °C ± 2 °C.
- No mantener una sobrefusión de más de 8H.
- Para una utilización diferente, mantener la gelosa en sobrefusión en estufa a 55 °C ± 1 °C.
- Los medios de cultivo derretidos y no utilizados dentro de 8H no serán jamás resolidificados para una utilización posterior.

7.4.2 Puesta en cultivo

- Homogeneizar cada dilución antes de la inoculación en las cajas de Petri y antes de realizar las diluciones decimales.
- Transferir 1 ml, de la suspensión madre o de las diluciones decimales retenidas en las cajas de Petri respectivas, cambiando la pipeta a cada dilución.
- Introducir, como máximo 20 minutos después del inóculo, 15 a 20 ml de R.EC mantenida en baño de agua a 47 °C ± 2 °C.
- Homogeneizar suavemente por agitación.
- Dejar solidificar sobre la mesa de laboratorio (tapa por encima).
- Verter 4 a 5 ml de R.EC mantenida en baño de agua a 47 °C ± 2 °C.
- Dejar solidificar sobre la mesa de laboratorio (tapa por encima).
- Dar vuelta las cajas e incubar inmediatamente en estufa 24H ± 2H a 44 °C ± 1 °C.

7.4.3 Recuento

Las cajas que contengan entre 15 y 150 colonias características en dos diluciones sucesivas son retenidas para el recuento.

Si solamente la caja inoculada con 1ml de la primera dilución contiene colonias características y en cantidad inferior a 15, ella será utilizada para el recuento.

Las colonias características son contadas con ayuda de un contador o manualmente después de $24H \pm 2H$ de incubación.

7.5. Resultados

7.5.1 Caso general

Las cajas contienen entre 15 y 150 colonias características, en dos diluciones sucesivas.

7.5.1.1 Modo de cálculo

Las 2 cajas seleccionadas presentan entre 15 y 150 colonias características. El número N de microorganismos contados a $44,5^{\circ}C$ por mililitro o por gramo de producto es obtenido calculando el promedio ponderado sobre las dos cajas seleccionadas.

$$N = \frac{\sum c}{1,1d}$$

$\sum c$: suma de las colonias características contadas en las 2 cajas seleccionadas

d : índice de dilución correspondiente a la primera dilución

7.5.1.2 Expresión de los resultados

- redondear el número N a dos cifras significativas
- Expresar en potencia de 10

ej. : $1,6 \cdot 10^3$ / g o ml

7.5.2 Estimación de las pequeñas cantidades

Si la caja inseminada con 1 ml de la 1^{era} dilución elegida para el análisis contiene menos de 15 colonias características, expresar el resultado de la manera siguiente:

$$N = c \frac{1}{d}$$

c : suma de las colonias características contadas

d : índice de dilución

Si la caja inoculada con 1 ml de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis no contiene ninguna colonia, expresar el resultado de la manera siguiente:

$$N = < 1 \frac{1}{d} \text{ microorganismo por g o ml}$$

d : índice de dilución

8. Recuento de los estafilococos con coagulasa positiva por conteo y confirmación de las colonias obtenidas a 37 °C

8.1. Principio

A partir de la muestra (producto líquido) o de la solución madre (otros productos), se realizan diluciones decimales y, paralelamente, se inocula en superficie 1 gelosa Baird Parker previamente vertida en la caja de Petri con cada una de las diluciones seleccionadas.

Después de una incubación de 48 H a 37 °C las colonias características y/o no características aparecidas son contadas y luego confirmadas por el test de la coagulasa.

8.2. Material de laboratorio y condiciones analíticas

Las puestas en cultivo son realizadas en la zona de esterilidad asegurada por el mechero Bunsen.

- Tubos de ensayo estériles en vidrio 16x160 algodónados.
- Tubos de hemolisis estériles en material plástico
- Portador de tubos.
- Pipetas estériles en material plástico de 2 ml graduadas en 0,1 ml.
- Igualadores estériles en material plástico.
- Pipetas Pasteur estériles.
- agitador de tubos.
- estufa a 37 °C $\pm$ 1 °C.
- mechero Bunsen.
- Contador de colonias.

8.2.1 Reactivos

- Diluyente estéril por diluciones decimales: triptona sal (TS).
- tubos 16 x 160 estériles rellenos previamente con 9ml de TS estéril.
- gelosa Baird Parker vertida previamente en caja de Petri.
- tubos estériles rellenos previamente con 5ml de caldo cerebro corazón.
- plasma de conejo liofilizado a rehidratar en el momento del empleo.

8.2.2 Modo de operar

8.2.2.1 Puesta en cultivo

- Secar las cajas de gelosa en una estufa a 46 °C $\pm$ 1 °C hasta desaparición completa de las gotas en la superficie del medio (sin tapa y con la superficie de la gelosa vuelta hacia abajo)
- Homogeneizar cada dilución antes de inoculación en la superficie de las cajas gelosadas y antes de la realización de las diluciones decimales
- Poner 0,1 ml, de la suspensión madre y/o de las diluciones decimales seleccionadas en la superficie de la gelosa, cambiando de pipeta a cada dilución.
- Extender cuidadosamente el inóculo lo más rápido posible con un igualador, sin tocar los bordes de la caja.
- Dejar las cajas, con la tapa cerrada, 15 minutos a temperatura ambiente.
- incubar en la estufa 48H $\pm$ 2H a 37 °C $\pm$ 1 °C

8.2.2.2 Recuento

Las cajas que contengan menos de 150 colonias características y no características a nivel de dos diluciones sucesivas son seleccionadas, pero una de ellas debe contener al menos 15 colonias. Las colonias características y no características son contadas ya sea con un contador o manualmente.

colonias características después de $48H \pm 2H$ de incubación :

- Negras o grises, brillantes y convexas, cuyo diámetro es como mínimo de 1 mm y como máximo de 2,5 mm rodeadas de un halo claro y de precipitación.

colonias no características después de $48H \pm 2H$ de incubación :

- Negras y brillantes, con o sin borde blanco estrecho con halos de claridad y de precipitación ausentes o apenas visibles.
- Grises desprovistos de zona clara.

8.2.2.3 Confirmación

Extraer 3 colonias características o tres colonias de cada tipo (característica o no característica) y someterlas al test de la coagulasa.

Test de la coagulas :

a) Cultivo en caldo:

- Extraer una parte de la colonia seleccionada con una pipeta Pasteur esterilizada con la llama del mechero Bunsen e inocularla en un caldo cerebro corazón.
- Repetir esta manipulación con las otras colonias seleccionadas.
- Identificar los tubos por el nº de muestra y su dilución con un marcador azul para las colonias características y un marcador verde para las colonias no características.
- Incubar a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante 20 a $24H \pm 2H$.

b) Búsqueda de la coagulasa libre :

- Agregar 0,5 ml de la cultivo obtenido en caldo cerebro corazón a 0,5 ml de plasma de conejo rehidratado en un tubo para hemolisis estéril e identificar como indicado aquí arriba.
- Repetir esta manipulación para cada cultivo en caldo.
- Incubar 4 a 6H a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- Verificar la presencia de un coágulo, si no, examinar el tubo a $24H \pm 2H$ de incubación.

8.2.3 Resultados

La coagulasa es considerada como positiva cuando el coágulo ocupa $\frac{3}{4}$ del volumen inicialmente ocupado por el líquido.

8.2.3.1 Caso general

Las cajas contienen un máximo de 150 colonias características y/o no características.

Modo de cálculo :

- Cantidad de estafilococos con coagulasa positiva por cada caja: a

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times c^{nc}$$

A^c es la cantidad de colonias características trasplantadas;

A^{nc} es la cantidad de colonias no características trasplantadas;

b^c es la cantidad de colonias características de Estafilococos coagulasa positiva;

b^{nc} es la cantidad de colonias no características de Estafilococos coagulasa positiva

c^c es la cantidad total de colonias características de Estafilococos coagulasa positiva en la caja seleccionada;

c^{nc} es la cantidad total de colonias no características de Estafilococos coagulasa positiva en la caja seleccionada.

Redondear el valor obtenido al número entero más próximo.

- *Cantidad de Estafilococos coagulasa positiva en la toma de ensayo: N*

Es el promedio ponderado, calculado de la manera siguiente a partir de dos diluciones sucesivas retenidas:

$$N = \frac{\sum a}{1,1 \times F} \times 10 \text{ Estafilococos coagulasa positiva por g o ml}$$

$\sum a$: suma de las colonias de Estafilococos coagulasa positiva identificados en las dos cajas seleccionadas

F : índice de dilución correspondiente a la 1^{era} dilución seleccionada.

Expresión de los resultados :

- redondear el número N a dos cifras significativas
- expresar en potencia de 10

ex.: valor obtenido	valor redondeado	resultado
36364	36000	3,6 10 ⁴

8.2.3.2 Estimación de las pequeñas cantidades:

Si la caja inoculada con 0,1 ml de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis contiene menos de 15 colonias, el resultado se expresa de la manera siguiente:

$$N = a \frac{1}{d} \times 10 \text{ Estafilococos coagulasa positiva por g o ml}$$

a : cantidad de Estafilococos coagulasa positiva identificados.

d : índice de dilución de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis.

Si la caja inoculada con 0,1 ml de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis no contiene ningún Estafilococo coagulasa positiva, expresar el resultado de la manera siguiente :

$$N < \frac{1}{d} \times 10$$

d : Índice de dilución de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis.

9 - Recuento de los coliformes por conteo de las colonias obtenidas a 30 °C

9.1. Principio

Se realiza una inseminación en profundidad en gelosa lactosada con bilis al cristal violeta y al rojo neutro (VRBL) en caja de Petri para cada una de las diluciones seleccionadas. Luego de una incubación de 24H a 30 °C se cuentan todas las colonias características aparecidas.

9.2. Material de laboratorio y condiciones analíticas

Las puestas en cultivo son realizadas en la zona de esterilidad asegurada por el mechero Bunsen.

- Cajas de Petri estériles en material plástico, diámetro 90 milímetros.
- Tubos de ensayo estériles en vidrio 16x160 algodónados.
- Tubos de hemolisis estériles en material plástico
- Portador de tubos.
- Pipetas estériles en material plástico de 2 ml graduadas en 0,1 ml.
- Baño de agua (BM) a 47 °C ± 2 °C
- Agitador de tubos.
- Estufa a 30 °C ± 1 °C.
- Estufa a 55 °C ± 1 °C
- Mechero Bunsen.
- Contador de colonias

9.3. Reactivos

- Diluyente estéril para diluciones decimales: triptona sal (TS)
- Tubos de 16 × 160 estériles rellenos previamente con 9ml de TS estéril
- Gelosa lactosada con bilis al cristal violeta y al rojo neutro (VRBL) en sobrefusión.

9.4. Modo de operar

9.4.1 El medio gelosado

- Desde su preparación mantener la gelosa VRBL en surfusión en baño de agua a 47 °C ± 2 °C (utilización inmediata).
- No utilizar jamás un medio de cultivo a una temperatura superior a 50 °C.
- No mantener una sobrefusión de más de 8H.
- Para una utilización diferida mantener la gelosa en sobrefusión en la estufa a 55 °C ± 1 °C.
- Los medios de cultivo fundidos y no utilizados en las 8H no serán jamás resolidificados para una utilización posterior.

9.4.2 Puesta en cultivo

- Homogeneizar cada dilución antes de la inoculación en las cajas de Petri y antes de la realización de las diluciones decimales.
- Transferir 1 ml, de la suspensión madre y/o de las diluciones decimales seleccionadas en las cajas de Petri respectivas cambiando de pipeta a cada dilución.
- Introducir como máximo 20 minutos después del inóculo, 15 a 20 ml de VRBL mantenida en baño de agua a 47 °C ± 2 °C
- Homogeneizar suavemente por agitación.
- Dejar solidificar sobre la mesa de laboratorio (tapa por encima)
- Verter alrededor de 5 ml de VRBL mantenida en baño de agua a 47 °C ± 2 °C
- Dejar solidificar sobre la mesa de laboratorio (tapa por encima)
- Dar vuelta las cajas e incubar inmediatamente en la estufa 24H ± 2H a 30 °C ± 1 °C

9.4.3 Recuento

Las cajas conteniendo menos de 150 colonias características o no características en dos diluciones sucesivas son seleccionadas; pero una de ellas debe contener al menos 15 colonias características.

Si solamente la caja inoculada con 1ml de la 1era dilución contiene colonias características y en cantidad inferior a 15, ella será seleccionada para el recuento.

Las colonias características son contadas con un contador o manualmente.

colonias características después de $24H \pm 2H$ de incubación

- colonias violáceas rodeadas, a veces de una zona rojiza (precipitación de la bilis)
- diámetro $\geq 0,5$ mm

9.5. RESULTADOS

9.5.1 Caso general

Las cajas contienen menos de 150 colonias características o no, en dos diluciones sucesivas pero una de ellas contiene **menos de 15 colonias** características.

Modo de cálculo :

La cantidad N de microorganismos contada a 30 °C por mililitro o por gramo de producto es obtenida calculando el promedio ponderado sobre las 2 cajas seleccionadas.

$$N = \frac{\sum c}{1,1d}$$

$\sum c$: suma de las colonias características contadas sobre las 2 cajas retenidas

d : índice de dilución correspondiente a la 1^{era} dilución.

expresión de los resultados :

- redondear el número N a dos cifras significativas
- expresar en potencia de 10

ej. : $1,6 \cdot 10^3$ / g o ml

9.5.2 Estimación de las pequeñas cantidades

Si la caja inoculada con 1 ml de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis contiene menos de 15 colonias características, el resultado se expresa de la manera siguiente:

$$N = c \frac{1}{d}$$

c : suma de las colonias características contadas

d : índice de dilución

Si la caja inoculada con 1 ml de la 1^{era} dilución seleccionada para el análisis no contiene ninguna colonia, el resultado se expresa de la manera siguiente:

$$N = < 1 \frac{1}{d} \text{ microorganismos por g o ml}$$

d : índice de dilución.