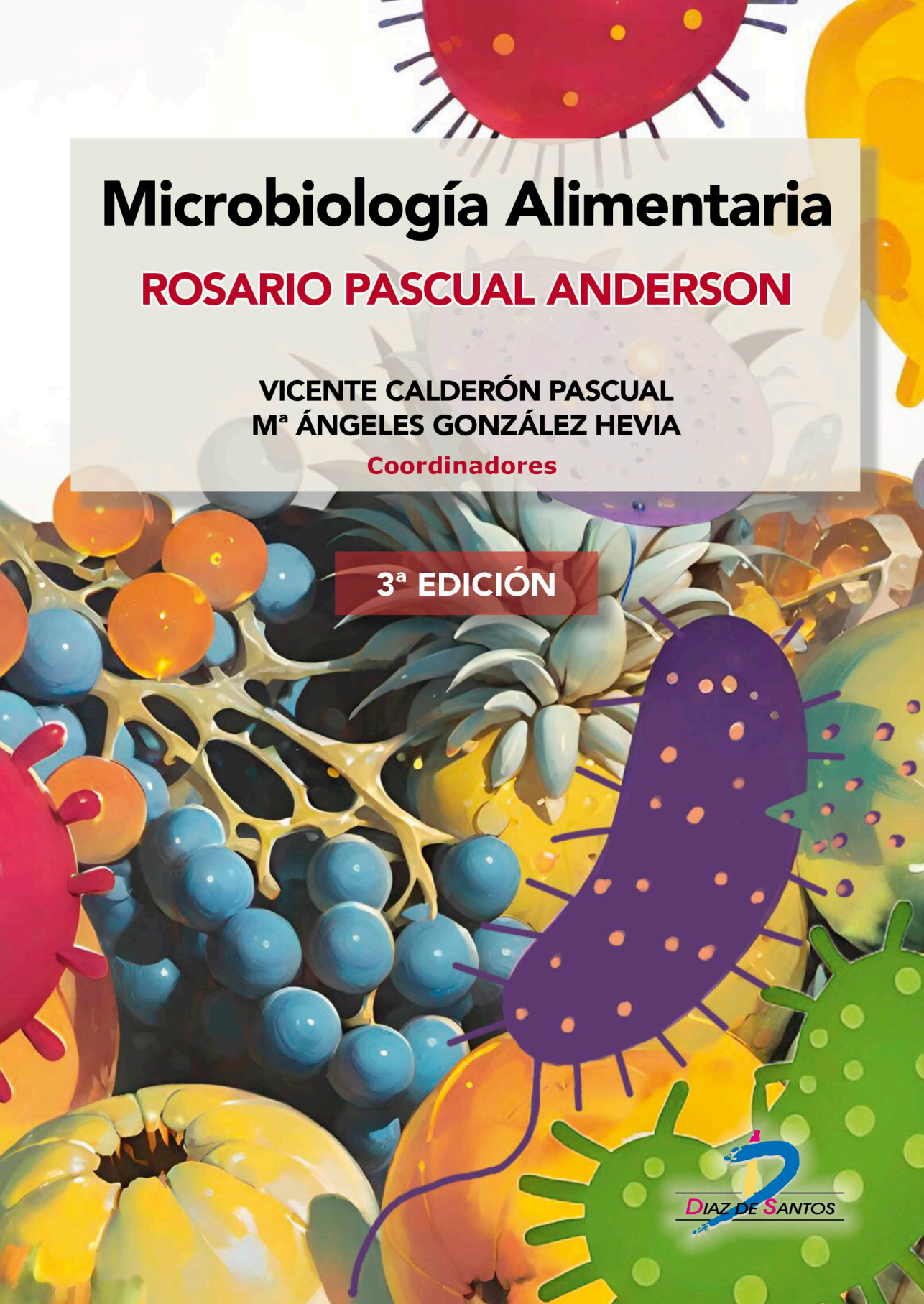
Microbiología Alimentaria

ROSARIO PASCUAL ANDERSON

VICENTE CALDERÓN PASCUAL
Mª ÁNGELES GONZÁLEZ HEVIA
Coordinadores

3ª EDICIÓN



DIAZ DE SANTOS

MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

ROSARIO PASCUAL ANDERSON

3ª edición

MICROBIOLOGÍA ALIMENTARIA

ROSARIO PASCUAL ANDERSON

3ª edición

Directores:

Vicente Calderón Pascual
María Ángeles González Hevia

Madrid • Buenos Aires • México • Bogotá

© Vicente Calderón Pascual, María Ángeles González Hevia (dir.), 2024

3ª edición (versión digital)

Reservados todos los derechos.

"No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, ni su tratamiento informático, ni la transmisión de ninguna forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico por fotocopia, por registro u otros métodos, sin el permiso previo y por escrito de los titulares del Copyright."

Ediciones Díaz de Santos
Internet: http//www.editdiazdesantos.com
E-mail: ediciones@editdiazdesantos.com

ISBN: 978-84-9052-534-0
e-ISBN: 978-84-9052-535-7

Fotocomposición y diseño de cubiertas: P55 Servicios Culturales

AGRADECIMIENTOS

A Elisa Parrilla Santos, por su contribución en la revisión de este libro en los días más calurosos del verano

ÍNDICE

Agradecimientos ..... **VII**
Autores ..... **XI**
Introducción ..... **XV**
Medios de cultivo ..... **XIX**

1. Muestreo 1
2. Preparación de la muestras para su análisis 7
3. Detección y recuento de microorganismos aerobios mesófilos 13
4. Recuento de microorganismos psicrotróficos 17
5. Detección y recuento de *enterobacterias* totales 21
6. Detección y recuento de *enterobacteriae* lactosa-positivas (coliformes) 31
7. Detección y recuento de *Escherichia coli* 37
8. Detección de *Salmonella* 51
9. Detección de *Cronobacter* spp (antes *Enterobacter Sakazakii*) 85
10. Detección de *Shigella* 93
11. Detección de *Aeromonas hydrophila* 103
12. Detección y recuento de clostridios sulfito reductores 113
13. Detección y recuento de *Clostridium perfringens* 117
14. Detección y recuento de *Bacillus cereus* 131
15. Detección y recuento de *Staphylococcus aureus* 145
16. Detección y recuento de *Campylobacter* 167
17. Detección y recuento de *Listeria monocytogenes* 181
18. Detección y recuento de *Vibrios* patógenos 219
19. Detección y recuento de enterococos intestinales 237
20. Detección de *Yersinia enterocolitica* 245
21. Técnicas rápidas no moleculares aplicadas al análisis microbiológico de alimentos 259
22. Técnicas moleculares aplicadas al análisis microbiológico de los alimentos 275
23. Calidad en los laboratorios de microbiología 291
24. Criterios microbiológicos en alimentos. Legislación 307
25. Nuevos alimentos. Límites y criterios microbiológicos 323

AUTORES

■ DIRECTORES-COORDINADORES

Vicente Calderón Pascual

Licenciado en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid (España, 1986), tras la presentación de su tesina de grado sobre determinación de residuos de tetraciclinas en carne en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, dispone de una beca de la Fundación Universidad-Empresa en dicho Departamento. En 1990 inicia su actividad profesional en el Servicio de Microbiología del Centro Nacional de Alimentación del Instituto de Salud Carlos III en Majadahonda (Madrid).

Realiza su tesis doctoral titulada Control sanitario de residuos de antibióticos en carnes por métodos microbiológicos (2001) bajo la dirección del doctor Joaquín Berenguer Soler, del Servicio de Microbiología del Centro Nacional de Alimentación, y la profesora doctora Maria del Carmen de la Rosa Jorge, del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Como responsable de la Unidad de Residuos de Antibióticos del Centro Nacional de Alimentación- Laboratorio Nacional de Referencia de Residuos de Antibióticos en alimentos, entre 1990 y 2005 participó en el desarrollo de métodos microbiológicos de detección de residuos de antibióticos y en actividades de referencia tales como la elaboración de boletines técnicos informativos para los laboratorios de control, la organización de ejercicios de intercomparación para técnicas microbiológicas de control de residuos de antibióticos en alimentos o la organización de Jornadas técnicas para laboratorios de control oficial de las Comunidades Autónomas. Responsable Técnico de la Unidad de Antibióticos del Centro Nacional de Alimentación para la acreditación conforme a la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 de cuatro técnicas de ensayo ante la Entidad Nacional de Acreditación.

En 2006 se incorpora a la Subdirección General de Coordinación Científica de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), realizando tareas de apoyo al Comité Científico de la AESAN y diversas actividades en dicha Subdirección incluyendo la coordinación de la elaboración del material didáctico del Programa Perseo de promoción de la alimentación y la actividad física saludables en el ámbito escolar.

Desde 2008 ejerce como Jefe de Área de Evaluación de Riesgos de la AESAN y desde 2011 es Secretario del Comité Científico de la AESAN. Ha pertenecido a las redes científicas de nuevos alimentos y de riesgos emergentes de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y ha participado como docente en diversos programas formativos de Universidades españolas.

María Ángeles González Hevia

Licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Oviedo (España, 1972), inicia su actividad profesional en el ámbito de la docencia impartiendo formación en Biología en el Instituto de Llodio (Álava, País Vasco) durante un periodo de dos años.

A continuación comienza su actividad en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Hospital san Agustín de Avilés (Asturias, España) donde permanece trabajando durante 14 años. Durante este período laboral inicia una colaboración con el Laboratorio de Microbiología del Hospital General de Asturias dirigido por el doctor Amalio Telenti. Fruto de la misma realiza una estancia en el Laboratorio de Microbiología de la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, EE UU) con el fin de implantar diversos protocolos microbiológicos en su centro de procedencia.

Inicia la realización de su tesis doctoral bajo la dirección de la profesora doctora Carmen Mendoza del Departamento de Microbiología de la Universidad de Oviedo basada en la investigación de marcadores epidemiológicos moleculares en bacterias intestinales patógenas.

Doctorada en Ciencias Biológicas con la máxima cualificación (*Cum Laude*, 1993), mantiene su colaboración universitaria como colaboradora de Honor, abriendo una línea de investigación en marcadores moleculares en *Salmonella* liderada por la Doctora Mendoza, que dio origen a diversas tesis doctorales y trabajos en revisas internacionales con alto índice de impacto, firmando en mas de 30 de dichos artículos. Ha participado en diversos proyectos de Investigación financiados por el Fondo de Investigaciones Sanitarias del Gobierno de España (FIS) y de la Fundación para el Fomento en Asturias de la Investigación Científica Aplicada y la Tecnología (Ficyt) del Principado de Asturias, todos ellos bajo concurrencia competitiva.

En 1990 se incorpora al área de Microbiología de los Alimentos del Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias por concurso oposición, sección que acabaría liderando. Durante todo este quehacer profesional mantuvo una estrecha vinculación con el Área de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de Madrid.

Interesada en la docencia, ha participado como docente en diversos programas formativos de las Administraciones Públicas y entidades privadas.

En el ámbito de la acreditación de laboratorios agroalimentarios ha sido auditora técnica de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) durante ocho años. Asimismo, ha participado en el desarrollo e implantación de normas técnicas en la Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR).

Miembro de diversas Sociedades Científicas relacionadas con su ámbito de trabajo.

■ AUTORES

Calderón Pascual, Vicente
Jefa de Área de Evaluación de Riesgos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

González Hevia, María Ángeles
Jefa de la Sección de Microbiología (retirada). Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias.

Guerra Román, Beatriz
Lead Expert Molecular Epidemiology. European Food Safety Authority (EFSA).

Ocerin Cañón, Cristina
Jefa de Servicio de Legislación Veterinaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).

Soto González, Sara María
Associate Research Professor. Directora del Programa de Infecciones Víricas y Bacterianas del Instituto de Salud Global de Barcelona (ISGlobal)

López Rodríguez, Ricardo
Jefe de Servicio de Evaluación de Riesgos. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN)

Valencia González, María Jesús
Jefa de la Sección de Análisis Ambiental y Garantía de Calidad. Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias

INTRODUCCIÓN

Presentamos la tercera edición de la obra *Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas* de Rosario Pascual Anderson(✞). Este libro ha sido un referente para todos los profesionales que se han adentrado en el estudio de la microbiología de alimentos en una época en la que prácticamente no existían este tipo de recursos.

El paso del tiempo y el crecimiento del conocimiento han hecho surgir nuevos avances tecnológicos, lo que hace necesaria la actualización de esta *biblia* de la microbiología de los alimentos. Encaramos esta tarea como un homenaje y reconocimiento a la labor de doña Rosario Pascual, con nuestro agradecimiento personal por su liderazgo sostenido durante décadas en este campo imprescindible de la microbiología de alimentos.

Entre las diferencias fundamentales con las anteriores ediciones se encuentran los cambios legislativos relativos a los alimentos suprimidos por un desarrollo normativo creciente. Por ello la situación legislativa actual se concentra en un capítulo actualizado.

Se ha mantenido la primera parte referida a los métodos de cultivo clásicos en los alimentos, actualizada y completada con la introducción del cultivo de microorganismos emergentes.

Actualmente, la bacteriología de alimentos también se ha beneficiado de la aparición de nuevos medios de cultivo, los denominados medios fluorogénicos y cromogénicos.

La introducción de estos medios ha supuesto un impacto significativo en la reducción del número de pruebas necesarias en la confirmación de las colonias sospechosas, lo que ha traído consigo una aminoración considerable de costes que incluye el material necesario y tiempos de trabajo. A pesar del amplio uso de sustratos fluorogénicos y cromogénicos en Bioquímica, no fue hasta la década de los años ochenta del pasado siglo cuando comienza su uso en Microbiología con el desarrollo de un método de cribado para detectar *E. coli* fecal en las aguas. Actualmente están comercializados un gran número de estos medios. Su aplicación, así como el estudio de nuevos patógenos, como *Campylobacter, Cronobacter* spp (*Enterobacter sakazakii*), *E. coli* verotoxigénicos etc., serán objeto de especial dedicación en el presente libro.

La aplicación de las técnicas de biología molecular ha supuesto un salto cualitativo en el análisis de alimentos. El carácter estable de las características genotípicas de los organismos diana de los alimentos (bacterias, virus, mohos, levaduras y parásitos) ha facilitado el desarrollo de un número elevado de procedimientos sencillos, rápidos y específicos para su detección. El método más utilizado es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), capaz de amplificar las

secuencias de ADN de los microorganismos. Tal es así que muchos laboratorios ya utilizan este sistema para la detección de patógenos en los alimentos. Otros métodos moleculares recurren al empleo de sondas (oligonucleótidos) que hibridan con secuencias específicas del ADN o ARN de los microorganismos. El marcaje de estas sondas permite observar el desarrollo de la reacción (detección en tiempo real) e incluso cuantificar la cantidad de ácidos nucleicos presentes inicialmente en la muestra. Aunque actualmente no está al alcance de todos los laboratorios, en un futuro la tecnología de los microarrays, biochips o chips de ADN permitirá la detección e identificación de un número elevado de microorganismos en una sola hibridación.

Ha de tenerse presente que los controles microbiológicos llevan su tiempo, lo que puede suponer que con frecuencia los resultados se obtengan cuando el alimento ya ha sido consumido. En estos procesos el uso de biosensores es de gran utilidad. Un campo de aplicación de los mismos es la detección de toxinas de origen bacteriano, patógenos como *E. Coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, etc., para lo cual es preciso incorporar enzimas (catalasa y otras), anticuerpos o moléculas de ADN agrupadas. De la misma forma, también puede analizarse la actividad microbiana a través de la detección de ATP, el oxígeno, el hidrógeno u otros metabolitos. Esto incluye también los cambios en el pH, la conductancia, la impedancia o la microcalorimetría. Asimismo, cabe mencionar que el futuro de los biosensores estará principalmente en las líneas de procesado de los alimentos, ejerciendo su función dentro de los programas de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP). Se han convertido, por tanto, en una opción analítica que presenta una gran variedad de características entre las que cabe mencionar su sensibilidad, especificidad, amplio espectro, mínimo pretratamiento, necesidad de muestras pequeñas, fácil manejo, portátil y automatizables, por citar algunas de ellas.

En los últimos años las autoridades han acometido una profunda renovación de las disposiciones normativas. Así, la Norma Europea EN ISO/IEC 17025 recoge los requisitos que han de cumplir los laboratorios de ensayo y calibración, entre los cuales se incluyen los agroalimentarios. Dicha disposición establece que los laboratorios han de disponer de un sistema de gestión, sean técnicamente competentes y capaces de generar resultados técnicamente válidos. En España, la acreditación de laboratorios es competencia de la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), proceso que en algunos casos se hace ineludible, tanto para los laboratorios de control como para los industriales.

ENAC establece los distintos tipos de métodos que pueden ser utilizados en Microbiología y cómo los mismos han de estar validados y sometidos a un control periódico de calidad, tanto interno como externo. Las normas internacionales ISO ayudan en el proceso de acreditación, tal como se verá en el presente libro.

El Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, establece los criterios microbiológicos para determinados microorganismos y las normas de aplicación que deben cumplir los explotadores de empresas alimentarias.

Este Reglamento supone la armonización de los criterios microbiológicos a nivel de la Unión Europea. Mediante el Real Decreto 135/2010 de 12 de febrero se derogan disposiciones existentes relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios, por lo cual, la segunda parte de este libro en su tercera edición se sustituye por el capítulo de "Criterios microbiológicos y legislación", adaptado a las nuevas disposiciones del Reglamento Comunitario.

Por último, se añade un capítulo relativo a los límites y criterios microbiológicos de los "nuevos alimentos". Estos alimentos corresponden a productos muy variados procedentes de nuevas fuentes o tecnologías: insectos, microalgas, extractos, aceites, etc. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la encargada de realizar las evaluaciones de riesgo para garantizar que estos productos sean seguros.

El libro *Microbiología alimentaria*, de Rosario Pascual Anderson, va dirigido a aquellos profesionales que quieran disponer de los métodos de la microbiología clásica de alimentos, para poder realizar los cultivos de microorganismos, y a los profesores de Microbiología, que podrán utilizarlos en sus prácticas. Los capítulos dedicados a técnicas rápidas y biología molecular proporcionan una visión general de los fundamentos de estas técnicas. Ha de tenerse presente que sus métodos están en continuo cambio y las casas comerciales que las suministran son las indicadas para dar información a los profesionales que las requieran. El último capítulo incluye información actualizada sobre la legislación.

Al final de cada capítulo se incluyen las normas internacionales de utilidad para los laboratorios que pretendan iniciar su proceso de acreditación. Asimismo, se dedicará un capítulo al Control de Calidad en los Laboratorios de Microbiología de los alimentos. En el mismo se detallarán los requisitos imprescindibles para conseguirlo.

Finalmente, diremos que el objetivo central de este texto es proporcionar las herramientas necesarias para que todos los profesionales puedan disponer de los fundamentos teóricos y prácticos que les permita afrontar su tarea con plenas garantías de éxito.

MEDIOS DE CULTIVO

Acetato agar (Trabulsi y Edwards) (Cap. 10)
Agar con capa de sangre de caballo (Cap. 17)
Ampicilina de Ryan agar (AAR) (Cap. 11)
Ampicilina dextrina agar (AD) (Cap. 11)
Bacara agar cromogénico (Cap. 14)
Bacillus cereus movilidad agar (Cap. 14)
Baird Parker agar (BP) (cap 15)
Barnes agar (Cap. 19)
Bilis-esculina agar (Cap. 20)
Bolton caldo (*Bolton Broth*. BP) (Cap. 16)
Brucella caldo (*Brucella Broth*) (Cap. 16)
Campylobacter medio de congelación (MCGP) (Cap. 16)
Carbón cefoperazona deoxicolato modificado agar, (*Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar,* mCCDA) (Cap.16)
Cefsulodina-irgasan-novobiocina agar (CIN) (Cap. 20)
Celobiosa-polimixina B-colistina agar (CPC) (Cap. 18)
Celobiosa-polimixina B-colistina agar modificado (mCPC) (BAM-FDA) (Cap. 18)
Cerebro corazón caldo (*Brain Heart Infusión*. BHI) (Cap. 15)
Cianuro potásico caldo (KCN) (Cap. 8)
Citrato de Simmons agar (Cap. 7)
Citrato-movilidad agar (Cap. 13)
Columbia CNA agar (Cap. 17)
Cronobacter agar cromogénico (Cap. 9)
Cronobacter caldo de enriquecimiento (*Cronobacter Screening Broth*. CBS) (Cap. 9)
Desoxirribonucleasa (DNasa) agar (Cap. 15)
DNasa azul de toluidina agar (Cap. 15)
EE de Mossel caldo doble fuerza (Cap. 11)
EE de Mossel caldo simple (Cap. 5)
Esculina-bilis agar (Cap. 19)
Fenilalanina deaminasa agar (Cap. 20)
Fermentación de carbohidratos caldo base (Cap. 17)

FRASER caldo concentración normal (Cap. 17)
FRASER caldo media concentración (Cap. 17)
Giolitti Cantoni caldo enriquecimiento (Cap. 15)
Glucosa sal con Teepol caldo doble fuerza (*Glucosa Salt Teepol Broth*, GSTB) (Cap. 18)
Glucosa sal con Teepol caldo simple (*Glucosa Salt Teepol Broth*, GSTB) (Cap. 18)
Glucosado agar (Cap. 14)
GN medio (Cap. 11)
Gramnegativo caldo (GN) (Cap. 10)
GSP agar (selectivo para *Pseudomonas y Aeromonas)* (Cap. 4)
Hektoen agar (*Hektoen Enteric*, HE) (Cap. 8)
Hierro-triple azúcar agar (*Triple Sugar Iron Agar*, TSI) (Cap. 8)
Inositol-bilis-verde brillante agar (*Inositol Bile Brilliant Green*, IBB) (Cap. 11)
Irgasan™-ticarcilina-clorato potásico caldo (ITC) (Cap. 20)
Kanamicina-aesculina-azida agar (KAA) (Cap. 19)
Kanamicina-aesculina-azida caldo (KAA) (Cap. 19)
King FG agar (Cap. 4)
Kligler Iron agar (KIA) (Cap. 5)
Lactosa bilis verde brillante caldo (*Brilliant Green Bile Lactose,* BGBL) (Cap. 6)
Lactosa gelatina caldo (Cap. 13)
Lactosa sulfito caldo (LS) (Cap. 13)
Lactosa-leche-yema de huevo (LYL) (Cap. 13)
Lauril sulfato caldo (MUG) (Cap. 7)
Lauril sulfato triptona modificado con vancomicina caldo (mLST) (Cap. 9)
Levine agar (Cap. 7)
Lisina decarboxilasa con 3% de cloruro sódico caldo (Cap. 18)
Lisina hierro agar (*Lysine Iron Agar*, LIA) (Cap. 8)
Lisina-decarboxilasa caldo (Cap. 8)
Listeria caldo base de enriquecimiento selectivo (formulación UVM: University of Vermont) (*Listeria Enrichment Broth,* LEB) (Cap. 17)
Listeria caldo de enriquecimiento selectivo (*Enrichment Broth*, EB) (Cap. 17)
Listeria caldo de enriquecimiento selectivo (*Enrichment Broth*, LEB1/ UVM1) (Cap. 17)
Listeria caldo de enriquecimiento selectivo (*Enrichment Broth*, LEB2/ UVM2) (Cap. 17)
Litsky caldo (Cap. 19)
LPM agar (Cap. 17)
MacBride agar selectivo modificado (MMA) (Cap. 17)
MacConkey agar (Cap. 10)
Manitol lisina cristal violeta verde brillante agar (*Manitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green*, MLCB) (Cap. 8)

Manitol yema de huevo agar (*Mannitol-Egg Yolk Agar*, MYA) (Cap. 14)
Manitol yema de huevo polimixina agar (*Mannitol-Egg Yolk-Polymixin Agar,* MYPA) (Cap. 14)
Medio para comprobar la tolerancia a la sal (Cap. 18)
Möeller caldo para decarboxilasas (Cap. 20)
Movilidad (Cap. 10)
Mucato caldo (Cap. 10)
Mueller Hinton sangre agar (*Mueller Hinton Blood Agar*) (Cap. 16)
Mueller-Hinton agar (Cap. 18)
Müller-Kauffmann caldo de enriquecimiento selectivo (tetrationato-bilis-verde brillante) (Cap. 8)
Nitrato caldo (Cap. 14)
Nitratos reducción caldo base (Cap. 17)
Nutritivo agar con cloruro sódico (Cap. 18)
Nutritivo agar de recuento (*Plate Count Agar*, PCA) (Cap. 3)
Ottaviani y Agosti agar cromogénico (Cap. 17)
OXFORD agar base (Cap. 17)
PALCAM agar Van Netten (*Polymyxin-Acriflavin-Lithium Chloride Ceftazidi-meAesculin-Manitol-Egg Yolk*) (Cap. 17)
PALCAMY caldo enriquecimiento doble fuerza (*Polymyxin-Acriflavin-Lithium Chloride CeftazidimeAesculin-Manitol-Egg Yolk*) (Cap. 17)
Peptona sorbitol bilis caldo (*Peptone Sorbitol Bile Broth*, PSBB) BAM (Cap. 20)
Peptona tamponada (*Buffer Peptone Water*, BPW) (Cap. 8)
Peptona tamponada salina (ASPW) (Cap. 18)
Pirazinamidasa agar (Cap. 20)
Polimixina-acriflavina-cloruro de litio-ceftacidina-esculina-manitol agar (*Polimyxin Acriflavin Litium Chloridre Ceftazidime Aesculin Manitol*. PALCAM), según van Netten (Cap. 17)
Preston caldo (Preston Broth. PB) (Cap. 16)
Ramnosa agar (Cap. 17)
Rappaport-Vassiliadis medio semisólido modificado (MRVS) (Cap. 8)
Rappaport-Vassiliadis-peptona de soja caldo (RVS) (Cap. 8)
Rojo fenol dulcitol caldo (Cap. 8)
Rojo fenol lactosa caldo (Cap. 8)
Rojo fenol sacarosa caldo (Cap. 8)
Rojo neutro-cristal violeta biliado agar (*Violet Red Bile Agar,* VRBA) (Cap. 6)
Rojo violeta glucosa biliado agar (*Violet Red Bile Glucose*, VRBG) (Cap. 5)
Rothe caldo simple (Cap. 19)
Sal colistina caldo doble fuerza (*Salt Colistine Broth*, SCB) (Cap. 18)
Sal colistina caldo simple (*Salt Colistine Broth*, SCB) (Cap. 18)
Sal-polimixina caldo doble fuerza de enriquecimiento selectivo (CSP) (Cap. 18)

Sal-polimixina caldo simple de enriquecimiento selectivo (CSP) (Cap. 18)
Salicina agar (Cap. 11)
Sangre de cordero agar (Cap. 13)
Sangre de cordero agar para prueba CAMP (Cap. 17)
SDS agar (Cap. 18)
Selenito cistina caldo de enriquecimiento selectivo (Cap. 8)
Shigella caldo (Cap. 10)
SIM agar movilidad (Cap.17)
SIM agar sulfuro-indol-movilidad (Cap. 11)
Solución de Ringer ¼ (Cap. 2)
Sulfito bismuto agar (Cap. 8)
Sulfito-polimixina-sulfadiazina agar (SPS) (Cap.12)
Sven gard agar (Cap. 8)
Tioglicolato caldo (Cap. 13)
Tiosulfato citrato sales biliares sacarosa agar (*Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose*, TCBS) (Cap. 18)
Trifenil tetrazolio agar (Cap.19)
Triple azúcar-hierro agar (Triple Sugar Iron. TSI) con 3 por 100 de cloruro sódico (Cap. 18)
Tripticasa-soja-polimixina caldo de concentración doble (Cap. 14)
Tripticasa-soja-polimixina caldo de concentración simple (Cap. 14)
Triptona agua (*Tryptone Water*, TW) (Cap. 2)
Triptona cloruro sódico agua (*Tryptone Water*, TW) (Cap. 18)
Triptona soja agar (*Triptic Soy Agar.* TSA) (Cap. 9)
Triptona soja caldo (*Tryptic Soy Broth,* TSB) (Cap. 2)
Triptona soja tetrazolio agar (TSAT) (Cap. 18)
Triptona soja-extracto de levadura (TSAYE) (Cap.17)
Triptona soja-extracto de levadura caldo (TSBYE) (Cap. 17)
Triptona sulfito neomicina agar (*Tryptone Sulphite Neomicin*, TSN) (Cap.13)
Triptosa-sulfito-cicloserina agar (TSC) (Cap.13)
Urea caldo (Cap. 8)
Urea de Christensen agar inclinado (Cap.17)
Verde brillante-rojo fenol agar (*Brilliant Green Agar*, BGA) (Cap. 8)
Voges Proskauer agar semisólido (Cap. 18)
Voges Proskauer/Clark y Lubs caldo (MR-VP) (Cap. 7)
Wagatsuma agar (Cap. 18)
Xilosa agar (Cap.17)
Xilosa-lisina-desoxicolato agar (*Xylose Lysine Desoxycholate*, XLD) (Cap. 8)
Yema de Huevo agar base (*Anaerobic Egg Yolk*) (Cap. 20)
Yersinia medio de congelación (Cap. 20)
Yersinia movilidad agar (Cap. 20)

1

MUESTREO

Rosario Parcual Anderson

El *muestreo* de alimentos destinados al análisis microbiológico es la operación que consiste en separar un número determinado de muestras de un lote, remesa, partida, etc., con el fin de obtener unos resultados analíticos fiables. Se pretende con ello obtener una muestra representativa del total.

La necesidad de un *muestreo* adecuado se hace patente cuando cabe la posibilidad de que existan gérmenes patógenos o sus toxinas, distribuidos de forma escasa irregular en un alimento o conjunto de alimentos del mismo origen. Es igualmente necesario para saber si una remesa de productos alimentarios cumple o no las normas microbiológicas legales establecidas para dichos productos.

■ NÚMERO DE MUESTRAS

Para que el *muestreo* tenga utilidad estadística, se debe realizar sobre un número apreciable de unidades de un lote o cualquier otra porción.

El *número de muestras* destinadas a un análisis microbiológico está en relación con la precisión que se desee obtener en los resultados. Este número se suele fijar cuando se dispone de muchas unidades, sobre todo en forma de lote.

Se suele sugerir que el *número de muestras* se corresponda con la raíz cuadrada del número total de unidades constituyentes del lote. También que, teniendo en cuenta el volumen del lote, se tome el 1 por 100 del total cuando el lote es grande y el 10 por 100 cuando el lote es pequeño.

Estos sistemas citados son aplicables a lotes procedentes de industrias cuyo control se desconoce. Si se trata de productos sometidos a un control regular, es suficiente analizar 5-10 muestras de cada lote.

El *número de muestras* recogidas en el *muestreo* constituye la "muestra de campo o población".

■ MÉTODO DE MUESTREO ALEATORIO

Este método consiste en separar del lote un número de muestras calculado previamente, utilizando la tabla de números al azar. Dicha tabla está integrada por columnas y filas de dígitos obtenidas mediante cálculos estadísticos.

Tablas de números al azar

Columnas

	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

Una vez establecido el número de muestras que se deben tomar del lote (véase apartado anterior), se numeran ordenadamente cada uno de los paquetes, contenedores o unidades del producto por muestrear.

Si, por ejemplo, el lote está integrado por 200 unidades, su numeración se marcará del 1 al 200, correlativamente. Con un lápiz se señala un lugar cualquiera en la tabla de números al azar, coincidiendo con un dígito o su proximidad. Este dígito sirve de punto de partida para la separación del número de muestras destinadas al análisis.

Supongamos que se ha punteado con el lápiz un lugar que corresponde a la fila 15 y a la columna 10. Este número es el 1 y los que le siguen en las columnas 11 y 12 son el 4 y el 6. En este caso, la unidad que se tiene que separar del lote es la marcada con el número 146. A continuación, se pasa a la fila 16 y a las mismas columnas 10, 11 y 12, a las que corresponde el número 078, una nueva unidad que se separa del lote. Pasando a la fila 17, columnas 10, 11 y 12, figura el número 152, que será también separado del lote. Se procede de la misma forma hasta obtener el número de muestras señalado previamente.

■ NORMAS GENERALES PARA EL MUESTREO

Como la finalidad del *muestreo* en Microbiología Alimentaria es, principalmente, obtener una muestra representativa del alimento para su análisis inmediato y conseguir resultados fiables sobre su estado higiénico sanitario, es necesario que el producto, en el momento de su análisis, reúna las mismas condiciones microbiológicas que tenía al ser maestreado. Por esta razón, son necesarias unas pautas para conseguir la muestra idónea.

Material utilizado en el muestreo

Envases para la toma de muestras

Los *envases* estarán perfectamente limpios, secos y estériles. Su tamaño guardará relación con la muestra que se vaya a tomar. Serán herméticos e inaccesibles a cualquier contaminación posterior a su esterilización. Se pueden utilizar:

- Envases de vidrio de boca ancha.
- Envases de plástico estériles.
- Bolsas de plástico estériles.
- Envases metálicos.

Instrumentos para la apertura de envases

- Tijeras estériles.
- Pinzas estériles.
- Cuchillos estériles.
- Sondas estériles.
- Taladros estériles.
- Cucharas estériles.
- Espátulas estériles.
- Sierras y otros.

Etiquetas y material para marcar

- Etiquetas de cartulina.
- Etiquetas adhesivas de papel.
- Lápiz graso.
- Rotuladores.
- Bolígrafos.

Equipo de esterilización

- Autoclave.
- Horno.

- Mechero, quemador de gas o estufa eléctrica.

Refrigeración

- Neveras portátiles.
- Cajas de plástico aislantes para muestras refrigeradas y congeladas.
- Congelador portátil.

Líquido desinfectante

- Alcohol etílico al 70 por 100.
- Algodón hidrófilo.

Control de temperatura

- Termómetro que marque entre -20 ˚C y +100 ˚C.

Esterilización

El material de toma de muestras para el análisis microbiológico debe ser estéril; es necesario que se haya sometido previamente a los métodos habituales de esterilización por calor seco (horno) o calor húmedo (autoclave).

■ CONDICIONES PARA EL MUESTREO

Para obtener la muestra representativa que se va a analizar posteriormente en el laboratorio, se deben cumplir ciertas condiciones:

- La persona destinada a hacer el muestreo debe conocer perfectamente su finalidad e importancia, por lo que estará bien entrenada para actuar como corresponda en cada caso. Dicha persona deberá estar debidamente autorizada para ejercer su labor.
- Una práctica de toma de muestras correcta influirá muy positivamente en la valoración objetiva de los resultados de los análisis.
- A ser posible, las unidades de muestra se tomarán en sus envases originales, en los que se enviarán al laboratorio.
- En ocasiones, las muestras que se deben recoger son únicas, circunstancia frecuente cuando se trata de alimentos sospechosos de toxiinfección alimentaria.
- El *muestreo* sobre lotes, partidas, remesas, etc., se puede hacer siguiendo la técnica del muestreo aleatorio, aplicando la tabla de números al azar, sobre un número de muestras preestablecido.
- Si se trata de cajas grandes que contienen paquetes pequeños, se escogen al azar dichas cajas y, por el mismo procedimiento, se separan los paquetes pequeños.

- Cuando los envases son muy grandes y difíciles de transportar, se toman, asépticamente, muestras representativas y se pasan a envases estériles más pequeños.
- Los alimentos a granel se muestrean tomando porciones de distintas zonas con material estéril y pasándolas, asépticamente, a envases estériles.
- Si el producto por muestrear tiene salida por un conducto, se desechan las primeras porciones antes de tomar la muestra.

Si son productos líquidos, se agitarán en su envase y se pasarán, asépticamente, a recipientes estériles.

Si la toma es de agua de un grifo, se desinfecta este con alcohol. Luego se abre y se desecha el agua que sale en las primeras porciones. Se cierra de nuevo el grifo y se flamea la gota que queda pendiente hasta que emita vapores. A continuación, se vuelve a abrir el grifo, dejando fluir el agua durante 1-2 minutos antes de recogerla en el recipiente estéril de la toma de muestras. Este será cerrado convenientemente en condiciones asépticas.

- Para productos sólidos (queso, jamón cocido, productos congelados y similares) se tomarán las muestras en varias zonas con sacabocados, taladros, sierras, etc., estériles. Las muestras se introducirán, asépticamente, en recipientes estériles.
- Es conveniente anotar la temperatura de almacenamiento del producto e incluso su propia temperatura. Estos datos serán remitidos al laboratorio.

■ PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA SU ENVÍO AL LABORATORIO

Una vez tomadas las muestras, se empaquetan de forma adecuada, según su naturaleza, para evitar su rotura o deterioro. Los paquetes se etiquetarán y marcarán correctamente, cuidando de que la etiqueta quede bien fijada para evitar que se pierda. La etiqueta irá numerada y adecuadamente identificada para que concuerde con el informe del *muestreo* que debe acompañar siempre a la muestra representativa. Este informe se identificará con los datos del envase y recopilará todos los datos que puedan ser interesantes para el microbiólogo:

- Nombre y dirección de la persona que ha tomado las muestras.
- Nombre y dirección de la persona, empresa, etc., donde se han tomado las muestras.
- Fecha, lugar y hora en que se han tomado las muestras.
- Clase de alimentos que integran las muestras.
- Nombre del fabricante, importador, vendedor, comprador, etc.
- Razón por la cual se ha procedido al muestreo.

- Número, tamaño y marca de las unidades que forman el lote.
- Forma de transporte. Punto de origen y lugar de destino.
- Fecha de embarque y llegada del lote.
- Método de muestreo utilizado.
- Temperatura del producto en el momento del muestreo.
- Temperatura ambiental de almacenamiento.
- Forma de transporte y condiciones del envío de las muestras al laboratorio.

Todos estos datos son una ayuda extraordinaria para el microbiólogo, que contribuirán a obtener unos resultados analíticos correctos y coherentes en el menor tiempo posible.

Cuando las muestras sean restos de alimentos sospechosos de toxiinfección alimentaria, es imprescindible remitir, junto con ellas, un protocolo debidamente cumplimentado donde se incluyan los datos más precisos sobre la sintomatología de la enfermedad y otros detalles, así como el estudio epidemiológico del caso.

Las muestras, debidamente preparadas, etiquetadas e informadas, se precintarán, de tal forma que, para abrirlas, sea preciso romper el precinto.

■ TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El espacio de tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el comienzo del análisis en el laboratorio debe ser lo más corto posible, para que en los resultados de los análisis quede reflejada, con la mayor fidelidad, la flora que, cualitativa y cuantitativamente, estaba presente en el alimento en el momento del muestreo.

Respecto al transporte, además de rápido, deberá mantener temperaturas de refrigeración o congelación para los productos que lo requieran.

2

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS

Rosario Pascual Anderson

Llegadas las muestras al laboratorio, es necesario seguir unos pasos, dentro de la sistemática analítica, que serán establecidos por el microbiólogo teniendo en cuenta la clase de alimento, procedencia y fines del análisis. Estos pasos conducirán a unos resultados que deberán ser interpretados adecuadamente por el microbiólogo experto.

La operación de preparación de muestras para el análisis microbiológico exige unas reglas de manipulación aséptica muy estrictas, así como la utilización de material y diluyentes estériles, para evitar la contaminación exterior del alimento.

Actualmente se utilizan cámaras de flujo laminar adecuadas para la toma de muestras, que suponen una gran ayuda para evitar el riesgo de cualquier contaminación exterior.

■ TRITURACIÓN Y HOMOGENEIZACIÓN DE ALIMENTOS

Cuando se trata de alimentos sólidos, es necesario someterlos previamente a una suspensión, utilizando un diluyente estéril.

Toma de muestras para el análisis

La fracción de alimento destinada al análisis microbiológico debe ser representativa de la totalidad de la muestra. En general, la muestra analítica debe estar constituida, aproximadamente, por 200 g de la misma. Para la puesta en marcha de las distintas determinaciones se utilizan 100 g; el resto sirve de reserva, por si es necesario repetir el análisis.

Siempre que sea posible, y para lograr una mayor representatividad, el tamaño de la muestra que se prepara para el análisis será todo lo voluminosa que permita una buena trituración y homogeneización.

Si el alimento está integrado por distintos componentes, se tomarán fracciones representativas de cada uno de ellos en superficie y profundidad.

La toma de la muestra se hará en condiciones asépticas muy estrictas y con material estéril, utilizando, a ser posible, cámaras de flujo laminar y, siempre, en las proximidades de la llama de un mechero o instrumento similar.

El material utilizado en la apertura de envases y en la toma de muestras estará de acuerdo con la naturaleza del producto: abridores, pinzas, bisturíes, tijeras, espátulas, etc.

Pesada de la muestra

Como no resulta fácil pesar la muestra con exactitud sin que se pueda evitar una excesiva manipulación, la técnica más sencilla consiste en:

- Tarar el recipiente estéril que se vaya a utilizar para la trituración.
- Introducir, asépticamente, una porción de un volumen adecuado en dicho recipiente.
- Pesar de nuevo para determinar el peso neto del alimento.
- Con probeta graduada estéril, se añadirá la cantidad de diluyente estéril para obtener la dilución deseada.

Por ejemplo, si la *suspensión madre* debe tener un título de 1:10, la cifra de pesada obtenido del alimento se multiplica por 9 y el resultado de la multiplicación será el número de mililitros de diluyente que hay que incorporar a la muestra para obtener dicha dilución.

Si la *suspensión madre* debe tener un título de 1:5, la cifra de pesada del alimento se multiplica por 4 y el resultado de la multiplicación será el número de mililitros de diluyente que hay que añadir a la muestra para obtener dicha dilución.

Actualmente existen equipos en el mercado (deltadiluidores) para realizar estas funciones de manera simple y eficaz.

Diluyentes

La característica principal de un buen diluyente es que no produzca modificaciones cualitativas ni cuantitativas en la flora de los alimentos que van a ser analizados, es decir, que mantenga lo más fielmente posible la flora de la muestra, sin suprimirla ni favorecer su desarrollo.

En Microbiología Alimentaria se utilizan varios diluyentes, habitualmente los siguientes:

- Agua de triptona con sal (*Tryptone Water*, TW).
- Solución de Ringer ¼.
- Caldo de soja (*Triptic Soy Broth*, TSB).
- Agua de peptona tamponada.

Este último diluyente se emplea normalmente en técnicas para la investigación de *Salmonella.*

El diluyente utilizado para la preparación de la suspensión madre se suele emplear, posteriormente, para efectuar las diluciones decimales.

Triturado de la muestra

Se trata de una operación importante dentro de la preparación de la muestra para su análisis. En el triturado hay que evitar la destrucción de los gérmenes por rotura de su membrana o por un calentamiento excesivo.

Además de una perfecta trituración de los alimentos, es necesario obtener una mezcla homogénea para lograr la distribución equilibrada de los gérmenes y sus toxinas.

Existen varios tipos de trituradores:

- *Jarra,* que consiste en un envase de vidrio o acero provisto de una *hélice* que funciona cuando se adapta a un motor.
- *Vástago* provisto de una *hélice* en su extremo, que se introduce en la mezcla que se va a triturar. Funciona eléctricamente y necesita un envase de vidrio o acero que se adapte especialmente al vástago.
- *Triturador de paletas (Stomacher),* que actúa golpeando rítmicamente la mezcla de alimento y diluyente que ha sido introducida previamente en una bolsa de plástico estéril. Los choques producidos por las paletas dislaceran el alimento y ponen a las bacterias en suspensión.
- *Pulsifier,* que crea ondas de choque que fuerzan a las bacterias a desprenderse del alimento y pasar al diluyente.

Los dos últimos procedimientos son los más utilizados en los laboratorios de Microbiología Alimentaria por su sencillez de uso.

■ PREPARACIÓN DE DILUCIONES DECIMALES

La *preparación de diluciones decimales* a partir de una muestra tiene por objeto efectuar diluciones progresivas de dicha muestra, para poder realizar recuentos microbianos posteriores.

■ MATERIALES Y EQUIPOS

- Triturador homogeneizador.
- Matraces, tubos de ensayo y gradillas.
- Pipetas de vidrio o automáticas estériles.
- Agitador excéntrico.

■ DILUYENTES

Agua de triptona. *Tryptone Water* (TW)

Composición:

Trptona	10 g
Cloruro sódico	5 g
Agua destilada	1.000 ml

Mezclar y disolver los ingredientes en el agua. Ajustar el pH a 7,2. Distribuir en tubos de ensayo de 16 x 160 mm, a razón de 9 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ˚C durante 15 minutos.

Solución de Ringer ¼

Composición:

Cloruro sódico	9 g
Cloruro cálcico anhidro	0,42 g
Hidrógeno carbonato sódico	0,20 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver los ingredientes en el agua y, para su uso, diluir una parte de esta solución con tres partes de agua destilada, para obtener la solución de Ringer 1/4. Distribuir en tubos a razón de 9 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ˚C durante 15 minutos.

Caldo triptona-soja (*Tryptone Soy Broth*, TSB)

Composición:

Triptona	17 g
Soja	3 g
Dextrosa	2,5 g
Cloruro sódico	5 g
Fosfato dipotásico	2,5 g
Agua destilada	1.000 ml

Disolver por calentamiento. Ajustar el pH a 7,3. Distribuir en matraces de 100 ml a razón de 9 ml. Esterilizar en autoclave a 121 ˚C durante 15 minutos.

■ TÉCNICA

Pesar, asépticamente, una porción representativa de la muestra analítica. La cifra de pesada obtenida se multiplica por 9 y el resultado dará el volumen en mililitros de diluyente adecuado para el microorganismo que se desea cultivar (véase apartado anterior) que es necesario añadir para obtener la dilución 1:10.

Esta mezcla, ya homogeneizada y/o triturada, constituye la *suspensión madre y* primera dilución de la serie (1:10).

A un tubo que contenga 9 ml de agua de la dilución adecuada se transfiere 1 ml de la *suspensión madre.* Mezclar 30 segundos en agitador excéntrico. Así se obtiene la dilución 1:100. Desechar la pipeta usada. De la mezcla anterior, y con nueva pipeta estéril, se incorpora 1 ml a otro tubo que contenga 9 ml de agua del mismo diluyente que el utilizado en la dilución madre. Mezclar 30 segundos en agitador excéntrico. Así se obtiene la dilución 1:1.000. Desechar la pipeta usada y repetir la operación en varios tubos, hasta lograr las diluciones deseadas.

De esta forma se obtiene la "serie de diluciones decimales" (10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}; etc.), que servirá para iniciar las determinaciones en las que sea necesario obtener recuentos.

Los tubos de la serie se mantendrán en frigorífico hasta el comienzo del análisis, el cual, aún en condiciones de refrigeración, no deberá demorarse más de dos horas a partir del momento en que se haya preparado la "serie de diluciones decimales".

3

DETECCIÓN Y RECUENTO DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Rosario Pascual Anderson

En el *recuento de microorganismos aerobios mesófilos* se estima la flora total, pero sin especificar tipos de gérmenes.

Esta determinación refleja la calidad sanitaria de los productos analizados indicando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados durante su elaboración.

Tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas. Un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un alimento esté exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de flora patógena.

Excepto en productos que se elaboran por fermentación, altos recuentos microbianos se consideran poco aconsejables para la mayor parte de los alimentos. Su significado es diverso:

- Materia prima excesivamente contaminada.
- Deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos.
- La posibilidad, por tratarse de microorganismos mesófilos, de que entre ellos pueda haber patógenos, dado que esta flora suele ser mesófila.
- Altos recuentos suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores a 10^6-10^7 microorganismos por gramo suelen ser ya inicio de descomposición.

En general, el recuento de la flora aerobia mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos.