

**ENSAYO PRELIMINAR PARA LA EVALUACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE
MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO DE ASEGURAMIENTO DE
CALIDAD EN PRODUCTOS NATURALES DE LA SABANA Y SUS MATRICES
SUBORDINADAS CONTROLADAS Y FILIALES**

WENDY VILLALBA GONZÁLEZ



**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA
2020**

**ENSAYO PRELIMINAR PARA LA EVALUACIÓN Y CONTROL DE CALIDAD DE
MEDIOS DE CULTIVO EN LABORATORIO DE ASEGURAMIENTO DE
CALIDAD EN PRODUCTOS NATURALES DE LA SABANA Y SUS MATRICES
SUBORDINADAS CONTROLADAS Y FILIALES**

**WENDY VILLALBA GONZALEZ
TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

**ASESOR ACADÉMICO
JOSE FELIX ORTIZ LEMUS PhD.**

ASESOR EXTERNO

**ALEXANDRA PINO
COORDINADORA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DE FRESKALECHE S.A.S.**

**IRINA SUÁREZ CHACÓN
ESPECIALISTA ASEGURAMIENTO DE CALIDAD DE FRESKALECHE S.A.S**

**UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MICROBIOLOGÍA
PAMPLONA**

2020

NOTA DE ACEPTACIÓN:

Firma Del Jurado

Firma Del Jurado

Pamplona, Diciembre 2020

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecerle a Dios por bendecir mi vida, guiarme a lo largo de mi existencia.

Gracias a mis padres, por ser los principales promotores de mis sueños. En especial a mi madre, quién ha sido mi apoyo incansable y fortaleza continúa en aquellos momentos de dificultad y debilidad, quien ha confiado y creído en mí, más que nadie.

Agradezco a mi hermana por acompañarme y apoyarme en este camino siempre, que aunque largo, hoy logró llegar a su materialización.

A la persona quien es hoy mi compañero en el camino de la vida, por alentarme y creer en mí bajo toda circunstancia.

A todos mis amigos, vecinos y futuros colegas que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

Finalmente, agradezco enormemente a los docentes del programa de Microbiología de la Universidad de Pamplona, por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión.

Y, por último pero no menos importante, de manera especial, a la persona que acompañó mi proceso durante la elaboración y materialización de este proyecto de investigación quien me guió con su paciencia y conocimiento.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. OBJETIVOS	3
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
2. JUSTIFICACIÓN	4
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	5
3.1 Área local	5
4. MARCO REFERENCIAL	6
4.1 Estado del arte (antecedentes)	6
4.2 Reseña histórica	6
■ 4.2.1 Misión de la empresa	7
4.3 Marco legal	7
4.4 Marco teórico	8
■ 4.4.1 Microorganismos de referencia	9
■ 4.4.2 Medios de Cultivo.	10
5. METODOLOGÍA.....	15
5.1 Estructura documental.	15
■ 5.1.1 Condiciones para el envío de los diferentes medios de cultivo	15
■ 5.1.2 Elaboración del formato para recepción de los medios de cultivo	15
■ 5.1.3 Condiciones para realizar los análisis	16
■ 5.1.4. Reporte de los resultados	16
■ 5.1.5 Resultados por fuera de parámetros	16
5.2 Activación de cepas de microbianas	17
5.3 Transferencia de cepas a viales de <i>CryoBank</i>	17
5.4 Prueba de evaluación de selectividad y diferencialidad de medios con cepas	17
5.5 Activación de crivial.	18
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	20
6.1 Estructura documental	20

■ 6.1.1 Elaboración del Formato para Recepción de muestras y Reportes de los resultados	20
■ 6.1.2 Elaboración del Formato para resultados por fuera de parámetros.....	20
6.2 Recuperación y propagación de cepas	21
6.3 Repique y preservación de cepas.....	22
6.4 Confirmación de cepas de microorganismos.....	23
■ 6.4.1 <i>Escherichia coli</i>	23
■ 6.4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
■ 6.4.3 <i>Bacillus cereus</i>	24
6.5 Control de medios de cultivo	25
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	36
ANEXO 1. Cronograma de actividades durante la pasantía empresarial.	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados.....	11
Tabla 2. Cronograma de actividades	19
Tabla 3. Formato de recepción de muestras y reporte de resultados	20
Tabla 4. Formato de resultados por fuera de parámetros.....	21
Tabla 5. Microorganismos de investigación	21
Tabla 6. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de septiembre de 2020.....	26
Tabla 7. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de octubre de 2020.....	27
Tabla 8. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de noviembre de 2020.....	28

ÍNDICE DE IMAGENES

Imagen 1. Visualización parcial instalaciones Freskaleche S.A.S.	5
Imagen 2. Crioviales de conservación de cepas de microorganismos (verde: <i>E. coli</i> , Rojo: <i>B. cereus</i> , amarillo: <i>P. aeruginosa</i>).	22
Imagen 3. A) Tinción Gram: Gram negativo, B) Prueba oxidasa: negativa, C) Software de identificación <i>BBL Crystal</i> , D) Sistema de identificación <i>BBL Crystal</i> correspondientes a <i>E. coli</i>	23
Imagen 4. A) Tinción Gram: Gram negativo, B) Prueba oxidasa: negativa, C) Software de identificación <i>BBL Crystal</i> , D) Sistema de identificación <i>BBL Crystal</i> correspondientes a <i>P. aeruginosa</i>	24
Imagen 5. A) Tinción Gram: Gram positivo, B) Software identificación <i>BBL Crystal</i> , C) Sistema de identificación <i>BBL Crystal</i> correspondientes a <i>B. cereus</i>	25
Imagen 6. Medios de cultivos selectivos y diferenciales: A) agar selectivo para <i>Bacillus cereus</i> , cepa <i>Bacillus cereus</i> , B) agar VRB, cepa <i>E. coli</i> , C) Agar <i>cetrimide</i> , cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
Imagen 7. Medios sin crecimiento: A) Agar <i>cetrimide</i> , cepa <i>E. coli</i> , B) agar <i>baird parker</i> , cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , C) agar YGC, cepa <i>B. cereus</i>	30

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Cronograma de actividades durante la pasantía empresarial	47
---	----

GLOSARIO

CEPA: Es una población de microorganismos de una sola especie descendientes de una única célula o que provienen de una determinada muestra en particular, la que usualmente es propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

CONSERVACIÓN: Es un método alternativo muy utilizado y que da altos porcentajes de viabilidad en diversos tipos de microorganismos, tanto hongos filamentosos como levaduras y algunas bacterias.

ESPECIFICIDAD: Es la demostración de la capacidad de un medio de cultivo que permite que los microorganismos no blancos, no muestran las mismas características del microorganismo blanco.

MEDIO DE CULTIVO: Un medio de cultivo es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas.

MEDIO DIFERENCIAL: Consiste en un medio de cultivo que es capaz de distinguir dos microorganismos por su crecimiento diferencial en el mismo, usando las propiedades metabólicas de ambos en presencia de un determinado nutriente y de un indicador que evidencia por ejemplo, un pH ácido en su entorno.

MEDIO SELECTIVO: Propiedad de un medio de cultivo de inhibir microorganismos no blanco, se utiliza una cepa de trabajo apropiada correspondiente a un microorganismo interferente o indeseados.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el crecimiento de la población mundial y la demanda de productos en el sector alimenticio, han impulsado a industrias como la láctea, a mejorar su proceso, hacerla más competitiva e innovar en nuevos productos (Quintero Gómez, 2011). En 1999, en el “Acuerdo de Competitividad de la Cadena Láctea”, manifestó que la producción de leche en Colombia, se había convertido en la actividad de amortiguamiento de la crisis económica, que se está presentando actualmente; adquiriendo gran importancia nacional, en la generación de empleos, oportunidades de progreso de pequeños y medianos productores entre otros (Quintero Gómez, 2011). Aportando el 3,18% de empleo nacional y un 13,92% en el sector agropecuario (Roldán, Tejada, Salazar, 2001).

Recientemente, Colombia se encuentra en el 10° puesto a nivel mundial con 5,3 millones de cabezas lecheras de ganado según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura (FAO) (Cámara de comercio de Medellín para Antioquia, 2017). La producción de leche a nivel nacional proviene de las razas bovinas en un 48% como cebú, pardo y normando. La asociación nacional de productores de leche (Analac), establece, dos factores que han determinado el crecimiento de la producción de leche fresca en la última década. Primero, la falta de rentabilidad de algunos sectores de la agricultura, que ha generado incrementos en el número de productores de leche; segundo, la violencia, que de alguna manera, ha convertido la ganadería de carne en sistemas de doble propósito (Analac, 2002) (Semana, 1990).

Todos los productos derivados de la leche como yogurt, mantequilla, quesos, leche en polvo entre otros, son productos que se comercializan a nivel nacional o son exportados a diferentes países. Esto debido a esta actividad, que la industria láctea, debe presentar una productividad efectiva y con alta calidad en sus productos, para la garantía de la preservación de la salud en todos sus consumidores.

Por otro lado la presencia de microorganismos como *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* son utilizados en los procesos fermentativos para la generación de productos, sin embargo, otros microorganismos patógenos, causan alteraciones negativas en la materia prima como a sus consumidores. Entre ellos, se encuentran *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros. Muchas de estas alteraciones, pueden ser la acidificación, putrefacción y formación de toxinas en la leche o derivados de ésta, a su vez, causan desequilibrios en la salud del consumidor, como infecciones gastrointestinales, intoxicaciones, incluso en algunas ocasiones pueden causar la muerte.

En la empresa “Productos Naturales de la Sabana” y sus matrices subordinadas controladas y filiales, es de vital importancia esta investigación, puesto que los análisis microbiológicos, usando diferentes medios de cultivo ayudan en la determinación de la calidad de los diferentes procesos y productos.

1. OBJETIVOS

1.1 Objetivo general

Realizar el control de calidad de los medios utilizados en el laboratorio de aseguramiento de calidad de la empresa “Productos Naturales de la Sabana”, sus matrices subordinadas, controladas y filiales.

1.2 Objetivos específicos

- Recuperar y propagar cepas de microorganismos de referencia ATCC en medio enriquecido BHI.
- Preservar cepas de microorganismos por congelación a temperatura de -4° Celsius en el laboratorio, para el uso en las diferentes locaciones de la empresa, distribuidas a nivel nacional.
- Identificar bioquímicamente usando la plataforma *BBL Crystal* cepas de microorganismos a utilizar.
- Realizar control de calidad de los medios utilizados en el laboratorio para los diferentes análisis microbiológicos realizados.
- Ejecutar las diferentes actividades necesarias para las rutinas diarias.

2. JUSTIFICACIÓN

Para comprobar los efectos de la selectividad y diferencialidad de los medios utilizados en el laboratorio de aseguramiento de calidad de la empresa “Productos Naturales de la Sabana” y sus matrices subordinadas controladas y filiales, se propone realizar un seguimiento, preservación y mantenimiento de control de calidad de los medios de cultivos implementados en los diferentes laboratorios de la empresa; utilizados para los diferentes análisis microbiológicos realizados en los laboratorios, cumpliendo con la Resolución 1619 de 2015, por la cual, se establece el “Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios” en los ejes estratégicos de vigilancia en salud pública y de gestión de calidad.

De esta manera se logrará un seguimiento de la calidad de los medios, que facilitará el trabajo del personal en los diferentes laboratorios de la empresa, a fin de tener datos confiables en los análisis realizados.

3. ÁREA DE ESTUDIO

3.1 Área local

Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología en la Planta de lácteos **Freskaleche S.A.S** regional Este, filial de **Productos Naturales de la Sabana S.A.S**.

Una compañía dedicada a ofrecer productos lácteos y alimentos procesados, que busca garantizar la satisfacción de las necesidades de todas sus partes interesadas, la protección del medio ambiente y la seguridad y salud de todos los colaboradores, contratistas y visitantes.



Imagen 1. Visualización parcial instalaciones Freskaleche S.A.S.

Fuente: www.freskaleche.com.co

4. MARCO REFERENCIAL

4.1 Estado del arte (antecedentes)

Las colecciones de microorganismos se desarrollaron a finales del siglo XIX, con el propósito de figurar como repositorios de los recursos biológicos para impulsar el desarrollo de las ciencias; la “Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos” (OCDE) reconoce a este tipo de iniciativas como fuentes sustentables para acceder a dichas fuentes biológicas (Janssens, et al., 2010).

Los ceparios son el sitio de depósito no solo de cepas de referencia, sino también de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras de origen humano, obtenidas de investigaciones realizadas en diferentes periodos de tiempo, habilitando así su categoría como cepas de referencia. La preservación de los microorganismos de la colección debe garantizar su viabilidad en estado inactivo, puro y homogéneo, bajo condiciones que aseguren la estabilidad microscópica, macroscópica, bioquímica, fisiológica y genética, es decir, sin variaciones fenotípicas ni mutaciones con respecto a las condiciones originales (Huertas, et al., 2006; Tedeschi, de Paoli, 2011).

Un laboratorio de microbiología debe poner en práctica una serie de acciones que le permitan asegurar una adecuada práctica en el aislamiento, identificación y caracterización de agentes etiológicos y su correspondiente prueba de susceptibilidad como una guía de la terapia. Esto significa que, deben ser controlados una serie de factores y eventos, tales como, el monitoreo de medios de cultivo, reactivos, instrumentos, procedimientos y que se debe poner especial énfasis en la capacitación permanente del personal. En 2005, Herrera M. y Campos M., trabajaron en un manual para llevar a cabo control de calidad en un laboratorio de microbiología. Allí se entablan pautas para llevar a cabo control de calidad desde las muestras, hasta los medios y reactivos utilizados en los análisis (Herrera y Campos, 2005).

4.2 Reseña histórica

FRESKALECHE, descende de COOPROLECHE LTDA, cooperativa de productores de leche de Santander y el Magdalena Medio que se fundó en 1982, nació como una inquietud de ganaderos del Sur del Cesar y Bolívar, Norte de Santander y Santander con el fin de conseguir mercado y mejores precios para la leche cruda. En 1991 la cooperativa se transforma en sociedad anónima hasta el año 2016, donde cambia su razón social a FRESKALECHE S.A.S.

El nombre deriva de una marca inglesa denominada *FRESH MILK* y fue idea de unos de los fundadores: el Dr. Humberto Polanía. Los colores institucionales, al igual que el tricolor patrio cada uno tiene su propio significado, el blanco, es el color de nuestra materia prima principal, la leche; el azul porque para efectos de mercadeo denota, significa frescura y el rojo por ser escogido por los clientes que más amamos, los niños. (Página web: Freskaleche S.A.S, 2020).

4.2.1 Misión de la empresa

Desarrollar, producir y comercializar productos lácteos y alimentos procesados que aporten bienestar y nutrición a nuestros consumidores cumpliendo con altos estándares de calidad y políticas organizacionales, con el fin de generar beneficios a la sociedad, nuestros proveedores, clientes, colaboradores y rentabilidad para los accionistas.

4.3 Marco legal

En el presente capítulo se tratan aspectos que ayudarán a cualquier persona interesada, a hacer uso de este trabajo y a realizar trabajos similares, bajo pautas legales, las cuales, fundamentan bajo la legislación colombiana, los distintos aspectos microbiológicos que se abordan en este trabajo.

✓ RESOLUCIÓN NÚMERO 1619 DE 2015

Por la cual, se establece el Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad.

Artículo 1. Objeto. La presente resolución tiene por objeto establecer el Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y Gestión de Calidad, que deben tener en cuenta para su funcionamiento los integrantes de dicha Red.

Artículo 2. Campo de aplicación. La presente resolución aplica a los laboratorios nacionales de referencia. los laboratorios de salud pública departamentales y del Distrito Capital y los laboratorios o instituciones que ofrezcan la realización de análisis o pruebas de laboratorio de eventos de interés en salud pública y de análisis o pruebas de laboratorio para la vigilancia y control sanitario, que se incorporen a la Red Nacional de Laboratorios.

✓ NORMA TECNICA NTC-ISO/IEC COLOMBIANA 17025 DE 2017

Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Objeto y Campo de aplicación. Este documento especifica los requisitos generales para la competencia, la imparcialidad y la operación coherente de los laboratorios.

Este documento es aplicable a todas las organizaciones que desarrollan actividades de laboratorio, independientemente de la cantidad de personal.

Los clientes de laboratorio, las autoridades reglamentarias, las organizaciones y los esquemas utilizados en la evaluación de pares, los organismos de acreditación y otros utilizan este documento para confirmar o reconocer la competencia de los laboratorios.

4.4 Marco teórico

La leche es un alimento nutritivo para los seres humanos, sin embargo, también sirve como un buen medio para el crecimiento de muchos microorganismos, especialmente patógenos bacterianos (Chyea et al. 2004; Pereda et al., 2007). La calidad de la leche se define como el cumplimiento de las características que norman en material de nutrición y carga microbianas; las características nutricionales, se definen como el porcentaje de los diferentes constituyentes químicos como: proteínas, grasa, lactosa, minerales, vitaminas, sólidos no grasos y sólidos totales entre otros. La calidad microbiológica se refiere a la concentración de la población microbiana de la leche, y presencia de microorganismos patógenos (Román et al. 2003).

Con el fin de optimizar y dejar veracidad de los resultados de los análisis realizados en el laboratorio de microbiología de la planta de lácteos Freskaleche, se implementó la creación de un cepario. Según Murray, et al. (2003), las colecciones microbianas, que en este caso particular, corresponde a bacterias, referidas también como “ceparios”, son centros de recursos genéticos que preservan a los microorganismos, garantizando la disponibilidad de dicho material biológico para actividades de docencia, investigación científica y comercial.

En la actualidad se encuentran disponibles diversos métodos de conservación, en este caso utilizamos *CRYOBANK*[™], el cual, se basa en un sistema de un criovial que contiene perlas químicamente tratadas suspendidas en una solución preservante criogénica especial. *CRYOBANK*[™] le ofrece un sistema confiable,

conveniente, y versátil para guardar y preservar bacterias fastidiosas por periodos prolongados. Ésto, es más económico que la liofilización, la obtención repetitiva de subcultivos o la compra de microorganismos de control; permite también el fácil establecimiento de banco de cepas para acreditación de laboratorios o propósitos de investigación. Ya que es un sistema de fácil manipulación que puede ser implementado en cualquier laboratorio de microbiología. La recuperación de cepas bacterianas es muy simple y le ofrece la posibilidad de obtener un cultivo nuevo cada vez que sea necesario, eliminando la variación, que a veces es común en la multiplicación repetida de subcultivos (Página web: Copan Innovation, 2020).

Para llevar a cabo el presente trabajo se tuvieron como cepas de interés, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, cepas de microorganismos de referencia y certificado ATCC, las cuales, fueron otorgadas por la empresa interesada en los resultados del mismo.

4.4.1 Microorganismos de referencia

Bacillus cereus es un microorganismo resistente a los procesos de cocción o pasteurización de los alimentos (Carlin et al. 2010). En 2010, el Instituto Nacional de Salud (INS), señaló que este microorganismo se encuentra en el ambiente de forma habitual y tiene el potencial de contaminar fácilmente los alimentos por prácticas de manufactura deficientes, lo cual, puede propiciar condiciones adecuadas para su proliferación y desencadenar la presentación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) al hombre (INS, 2010). Para la detección de *B. cereus* en leche, se recomienda el procedimiento estándar en placa, de la FDA (Centro de regulación de alimentos y bebidas de los Estados Unidos, 2003).

Los bacilos coliformes producen gas a partir de la lactosa mientras que determinadas especies de *Streptococcus*, *Alcaligenes* y *Enterobacter* son responsables de la viscosidad y *P. aeruginosa* y *Serratia marcescens* pueden conferir, respectivamente, color azul y rojo. Es muy difícil producir leche cruda libre de coliformes. No obstante, los altos recuentos son indicadores de malas prácticas de producción, transporte o almacenamiento. En la leche pasteurizada la presencia de bacterias coliformes es inaceptable porque la temperatura de procesamiento la destruye, así como a la fosfatasa. También la presencia de coliformes puede indicar contaminación post-pasteurización por los equipos sucios o defectuosos, los operarios o los envases mal desinfectados (Jay, 2005).

Por su parte, *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria oportunista con afinidad por el agua y posee alta resistencia al cloro, afectando individuos

inmunocomprometidos así como fábricas lácteas y elaboradoras de agua envasada. Se ha demostrado que, *Pseudomonas aeruginosa*, es capaz de sobrevivir y multiplicarse en aguas tratadas, esto, debido a una densa capa polisacárida, la cual, establece una barrera no solo física sino química, capaz de proteger a la bacteria de las moléculas e iones de cloro libre residual (Álvarez et al., 2016).

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es el cultivo o colonia. Para llevar a cabo los diferentes análisis microbiológicos realizados en el laboratorio de la planta de lácteos Freskaleche S.A.S., se utilizan diferentes medios de cultivos con capacidad selectiva y diferencial para mejor eficiencia de resultados.

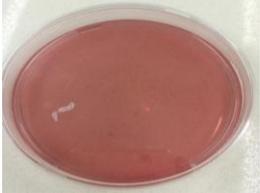
Por tal razón, los medios de cultivo a evaluar y de interés para este trabajo son, agar VRBD, agar selectivo para *B. cereus*, agar YGC, agar Rosa Bengala, agar base para *cetrimide*.

4.4.2 Medios de Cultivo.

El agar BHI, es un medio muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano. La infusión de cerebro de ternera, la infusión de corazón vacuno y la peptona, son la fuente de carbono, nitrógeno y vitaminas. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el fosfato disódico otorga capacidad de *buffer*. Puede ser suplementado con sangre ovina desfibrinada estéril o con sangre equina desfibrinada estéril, permitiendo así el desarrollo de hongos de difícil crecimiento. Con el agregado de 10% de sangre de caballo desfibrinada fue utilizado para el crecimiento de hongos patógenos.

Por tratarse de un medio que contiene glucosa, no es un agar sangre apropiado para la observación de reacciones de hemólisis (Britania, 2020). Aunque su interés para este trabajo, es que será el medio utilizado para la recuperación de las cepas de microorganismos usadas en el estudio.

Tabla 1. Medios de cultivos utilizados

NOMBRE	IMAGEN
VRBD (Agar Dextrosa Biliar Rojo Violeta) O VRBG (Agar Glucosa Biliar Rojo Violeta)	
Agar selectivo para <i>B. cereus</i> (según Mossel)	
YGC (Agar Glucosa Cloranfenicol)	
ROSA BENGALA	
AGAR BASE <i>CETRIMIDE</i>	
AGAR <i>BAIRD PARKER</i>	

Fuente: Autora.

El **agar dextrosa bilis rojo violeta (VRBD)**, es un medio selectivo granulado, recomendado para la detección y enumeración de enterobacterias, especialmente a las bacterias gram negativas tolerantes a la bilis, en productos no estériles y preparaciones farmacéuticas. Los gránulos aseguran una disolución rápida y uniforme en agua, evitan la aglutinación del medio y la inhalación del polvo en el aire. La digestión pancreática de gelatina y extracto de levadura proporciona compuestos nitrogenados y otros nutrientes esenciales para el metabolismo bacteriano. Este medio, es selectivo debido a la presencia de inhibidores, sales biliares y violeta cristal. El violeta de cristal inhibe los organismos gram positivos. El indicador rojo neutro ayuda a detectar la fermentación de dextrosa. Las cepas que fermentan dextrosa, producen colonias rojas con halos rojo rosado en presencia de rojo neutro. El cloruro de sodio mantiene el equilibrio osmótico en el medio (Merck, 2020).

El **Agar glucosa biliar rojo violeta (VRBG)**, la peptona de gelatina y el extracto de levadura aportan los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, las sales biliares y el cristal violeta inhiben el desarrollo de la flora acompañante Gram positiva, la glucosa es el hidrato de carbono fermentable y el rojo neutro es el indicador de pH. Todas las enterobacterias fermentan la glucosa, esto produce la acidificación del medio y el viraje del indicador de pH al calor rojo intenso. Debido a esto, se observan colonias de color rojo púrpura, de 1 a 2 mm de diámetro, rodeadas generalmente de una zona rojiza de bilis precipitada (Britania, 2020).

Agar selectivo para *B. cereus* según Mossel, contiene los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano. Es un medio de cultivo diferencial gracias al manitol; las bacterias fermentadoras del manitol, acidifican el medio produciendo el viraje del indicador de pH rojo de fenol del rojo al amarillo, mientras las bacterias que no lo fermentan producen colonias del color del medio. La adición de emulsión de yema de huevo mejora el aislamiento y la esporulación de esta bacteria, favoreciendo y facilitando su visualización ya que se produce un halo de precipitación de la lecitina hidrolizada alrededor de las colonias.

Puede lograrse el aislamiento selectivo de *Bacillus cereus*, inhibiendo el desarrollo de la flor acompañante presente en la muestra, por el agregado del suplemento para *Bacillus cereus* con el que se obtiene una concentración final de 100 U (unidades) de polimixina B por ml de medio (Britania, 2020).

Agar glucosa cloranfenicol (YGC) es recomendado por la “Federación Internacional de Lechería (FIL-IDF), Organización Internacional de Estandarización” (ISO) y *Deutsche Institute für Normung (DIN)* para el aislamiento selectivo y enumeración de levaduras y mohos en leche y productos lácteos. El método antibiótico para enumerar levaduras y hongos en productos lácteos es el método preferido de elección, ya que da como resultado una mejor recuperación de las células afectadas por hongos. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B, esencial para el crecimiento bacteriano. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía y el cloranfenicol es un antibiótico que ayuda a aislar los hongos patógenos del material altamente contaminado, ya que inhibe la mayoría de las bacterias contaminantes. Es un antibiótico recomendado para su uso con medios debido a su estabilidad térmica y amplio espectro bacteriano (Condalab, 2020).

El **agar rosa de bengala con cloranfenicol** se utiliza para el aislamiento selectivo y enumeración de levaduras y mohos a partir de alimentos en un entorno de laboratorio. El agar rosa de bengala con cloranfenicol no está destinado a ser utilizado en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos. El agar rosa de bengala con cloranfenicol es un medio selectivo para la enumeración de hongos. En 1944, Smith y Dawson utilizaron rosa de bengala para el aislamiento selectivo de hongos a partir de muestras de suelo. Esta fórmula fue preparada con un pH neutro, desviándose del medio acidificado usual. Varias investigaciones han encontrado que un pH neutro con la adición de un agente selectivo ha sido exitoso en apoyar el crecimiento de hongos y restringir el crecimiento bacteriano. El agar rosa de bengala suplementado con cloranfenicol es una modificación de la fórmula del agar rosa de bengala con clortetraciclina de Jarvis. El cloranfenicol se recomienda como agente selectivo en medios fúngicos con un pH neutro debido a su estabilidad térmica y amplio espectro antibacteriano. El agar rosa de bengala con cloranfenicol se recomienda en los métodos estándar para la enumeración de levaduras y mohos a partir de alimentos y agua (NEOGEN, 2020).

El **agar base cetrímide**, es un medio que permite el crecimiento selectivo de *P. aeruginosa* y estimula la formación de pigmentos. Es un medio en el cual la peptona de gelatina aporta los nutrientes para el desarrollo microbiano. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *P. aeruginosa*.

La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas* sp., (Britania, 2020).

Baird parker agar base, es un medio altamente nutritivo, en el cual la peptona de caseína y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos.

Permite el crecimiento selectivo de estafilococos ya que el telurito de potasio y el cloruro de litio inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitinasa de los microorganismos. Los estafilococos coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y tienen actividad lecitinásica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia (Britania, 2020).

El desarrollo adecuado de los microorganismos en un medio de cultivo se ve afectado por una serie de factores de gran importancia y que, en algunos casos, son ajenos por completo al propio medio. Entre esos están, la disponibilidad de nutrientes adecuados, consistencia adecuada del medio, presencia (o ausencia) de oxígeno y otros gases, condiciones adecuadas de humedad, luz ambiental, pH, temperatura, esterilidad del medio.

5. METODOLOGÍA

La evaluación a los medios se realizó cada vez que se iniciaba un nuevo recipiente de un medio de cultivo en el laboratorio.

Las cepas utilizadas para los procedimientos fueron *B. cereus* Lote 200-32**, *E. coli* Lote 483-865**, *P. aeruginosa* Lote 484-1128** de referencia ATCC; las cuales fueron suministradas por el laboratorio de aseguramiento de calidad de Freskaleche S.A.S, regional este-Bucaramanga, filial de Productos Naturales de la Sabana S.A.S.

5.1 Estructura documental.

En este ítem se hace referencia a toda la documentación que se debe implementar y llevar a cabo para la realización de este estudio.

5.1.1 Condiciones para el envío de los diferentes medios de cultivo

Los medios de cultivo se envían desde las diferentes sedes: Palmira, Medellín, Cajicá y Bucaramanga.

Para los medios preparados se deben enviar las 4 cajas de cada medio, sellados con cinta de parafina o de enmascarar debidamente refrigerados, en una cava y con gel refrigerante; diligenciando un formato con los siguientes datos (lote, fecha de vencimiento, etc), determinando qué tipo de medios llegan e informar por medio de correo fecha de envío.

Para el caso particular de medios sin preparar (polvo), se deben enviar los proporcional al pesaje de 4 cajas por 25 cm de diámetro en *Whirl-Pak* estériles; diligenciando un formato con los siguientes datos (lote, fecha de vencimiento, etc), determinando qué tipo de medios llegan e informar por medio de correo fecha de envío.

5.1.2 Elaboración del formato para recepción de los medios de cultivo

El formato debe recopilar información tal como, la fecha del análisis, nombre del medio del cultivo a analizar, fecha de vencimiento, lote, nombre de la cepa a utilizar,

lote de la cepa, resultados, concepto, analista de siembra y analista de lectura y nombre de quien revisó la información. Este formato está codificado y hace parte del sistema interno de aseguramiento de calidad de la empresa productos naturales de la sabana y sus matrices subordinadas controladas y filiales.

5.1.3 Condiciones para realizar los análisis

Una vez llegadas las cavas, se debe verificar el estado de los medios, si no se va a realizar el análisis el mismo día, debe realizarse máximo antes de las 36 horas luego de recibidas.

En caso de que estos medios lleguen condensados y se presente pérdida de frío, o la bolsa *Whirl-Pak* estéril con el medio de cultivo llegue abierta o con fisura, se informa por medio de correo electrónico que, no se van a realizar las verificaciones ya que no genera resultados confiables, y se reprograma la verificación y el envío de los nuevos medios de cultivo.

5.1.4. Reporte de los resultados

Los diferentes análisis se reportan presencia/ausencia en el formato diseñado, puesto que no se cuantifican los resultados ya que las cepas de referencia utilizadas son cualitativas. Este, se compartirá a cada uno de los coordinadores de aseguramiento de calidad de cada sede, con copia a la coordinadora regional donde se realiza el análisis y al coordinador nacional de laboratorios.

5.1.5 Resultados por fuera de parámetros

Se elabora un formato donde se reporte el aviso de los medios que presentaron resultados no favorables, que contenga fecha de generación de aviso, nombre del medio de cultivo, lote, fecha de vencimiento, resultado, acciones correctivas y resultados después de la acción implementada. Las primeras cinco (5) columnas del formato se bloquearan para protección de la información, y el mismo, se compartirá a cada uno de los coordinadores de aseguramiento de calidad de cada sede, con copia a la coordinadora de aseguramiento de calidad regional, donde se realiza el análisis y al coordinador nacional de laboratorios.

Por su parte, las acciones correctivas las llenará el coordinador de aseguramiento de calidad de cada sede o personal encargado del laboratorio.

5.2 Activación de cepas de microbianas

Para este caso, se dejó la bolsa de *KWIK-STIK™* a temperatura ambiente sin abrirla. Se procedió a su abertura rasgándose por la ranura y se sacó la unidad *KWIK-STIK™*.

Se aprieta (por única vez) la ampolla en la parte superior del *KWIK-STIK™*, justo por debajo del menisco del líquido de la ampolla, para liberar el líquido hidratante a medida que se sujeta verticalmente, se golpeó suavemente sobre una superficie dura para facilitar flujo del líquido a través del eje y hacia la parte inferior de la unidad que contiene el *pellet*. Presionando la parte inferior de la unidad, se aplastó el *pellet* en el líquido hasta que la suspensión estuvo homogénea.

Se empapó inmediatamente el bastoncillo en el material hidratado y se transfirió al medio de agar por un tercio de la placa y de esta manera, con un asa estéril, se formaron estrías longitudinales para facilitar el aislamiento de las colonias. Por último, se procedió a la incubación inmediata de la placa de cultivo a la temperatura y las condiciones apropiadas para el microorganismo (Microbiologics, 2016).

5.3 Transferencia de cepas a viales de *CryoBank*

Con un asa estéril, se tomó de la placa de cultivo fresca, una muestra concentrada y se disolvió en el medio que contiene el tubo del *CRYOBANK*. Posteriormente se agitó hasta incorporar completamente la muestra al medio invirtiendo el tubo, permitiendo así que las bacterias se adhirieran a las perlas. Por último, con una pipeta estéril, se removió del tubo el medio de cultivo del *CRYOBANK* y se llevó inmediatamente a almacenamiento a temperatura de congelación (Página web: *Copan Innovation*, 2020).

5.4 Prueba de evaluación de selectividad y diferencialidad de medios con cepas

Se tomó la placa de cultivo de enriquecimiento, en la cual, anteriormente se había puesto a cultivar el microorganismo, se retiró una muestra concentrada y se

procedió a realizar siembra masiva en agares selectivos (VRBD, Medio selectivo para *B. cereus*, YGC, Rosa Bengala) para posterior visualización de crecimiento.¹

5.5 Activación de criovial.

Se tomó el tubo del *CRYOBANK* del congelador y se removió una perla usando un asa recta para inoculación, luego se pasó la perla sobre la superficie de una placa de medio BHI; de inmediato, se regresó el *CRYOBANK* con las perlas sobrantes al congelador.

Se incubó la placa y se evaluaron los diferentes medios de cultivo.

¹ Ya que el estudio no se enfoca en medir la eficiencia de los medios, sino en evaluar que permitan el crecimiento selectivo de los microorganismos de interés en los análisis de este laboratorio, este ensayo se realiza mediante siembra masiva. Tampoco es de interés cuantificar puesto que las cepas utilizadas son cualitativas, más no cuantitativas, lo que nos observa el crecimiento o no del mismo, pero no podremos conocer las cantidades precisas de ufc de microorganismo en medio.

4. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Tabla 2. Cronograma de actividades

ACTIVIDAD	MES	AGO				SEP				OCT				NOV				DIC				ENE			
	SEM	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Revisión bibliográfica		x	x	X																					
Planteamiento del Proyecto					x	x	X																		
Recolección y procesamiento de datos							x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Diseño experimental y redacción de metodología						x	x	x	x																
Redacción del trabajo de grado								x	x	x	x														
Elaboración de los formatos						X	X											X	X						
Revisión del trabajo por parte de la Coordinadora de calidad																		x							
Entrega y sustentación																			x						
Ejecución de las diferentes actividades necesarias para las rutinas diarias		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Fuente: Autora

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

El control de los medios de cultivos es un aspecto vital para los laboratorios de microbiología, puesto que, su calidad constituirá la garantía de los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados.

6.1 Estructura documental

Para esto, se elaboró un documento, el cual, fue subido a la plataforma de intranet *in-process* y fue divulgado a nivel nacional mediante correo electrónico, para dar a conocer el proceso de las verificaciones realizadas, tales como, las condiciones al momento de enviar los medios de cultivos, la forma de presentar los resultados en caso de ser favorables o no favorables y demás información correspondiente, tal como Herrera y Campos en 2005, establecieron como registro para realizar control de calidad de los medios de cultivo.

6.1.1 Elaboración del Formato para Recepción de muestras y Reportes de los resultados

El formato a continuación, fue elaborado y avalado por la empresa “Productos Naturales de la Sabana” y sus matrices subordinadas, controladas y filiales, para llevarse a cabo en este proceso. Esta cuenta con: encabezado, código y versión propios, que no son mostradas en este trabajo.

Tabla 3. Formato de recepción de muestras y reporte de resultados

								Código: Versión:				
FECHA	MEDIO DE CULTIVO	FECHA DE VENCIMIENTO	LOTE MEDIO DE CULTIVO	CEPA	LOTE	PRESENCIA/ RECUENTO	AUSENCIA / RECUENTO	CONCEPTO	ANALISTA		OBSERVACIONES	REVISÓ
								ACEPTABLE / NO ACEPTABLE	SIEMBRA	LEE		

Fuente: Productos Naturales de la Sabana y sus matrices subordinadas controladas y filiales.

6.1.2 Elaboración del Formato para resultados por fuera de parámetros

El formato presentado a continuación, fue elaborado y avalado por la empresa “Productos Naturales de la Sabana” y sus matrices subordinadas, controladas y

filiales, para llevarse a cabo en este proceso. Éste cuenta con encabezado, código y versión propios, semejando a los desarrollados en la empresa.

Tabla 4. Formato de resultados por fuera de parámetros

							Código: Versión:
FECHA	NOMBRE DEL MEDIO DE CULTIVO	LOTE DEL MEDIO DE CULTIVO	FECHA DE VENCIMIENTO	RESULTADOS	ACCIONES TOMADAS	RESULTADOS DESPUÉS DE LAS ACCIONES	REVISÓ

Fuente: Productos Naturales de la Sabana y sus matrices subordinadas controladas y filiales.

6.2 Recuperación y propagación de cepas

Se logró la correcta recuperación y propagación en medio enriquecido (AGAR BHI) de las diferentes cepas ATCC a partir del *KWIK-STIK*TM utilizando método convencional; esto, debido a que como es divulgado por *Britania Lab* en su hoja de referencia, este agar, es un medio sólido apropiado para el cultivo de bacterias y hongos, incluyendo aquellos de difícil desarrollo; y que al ser rico en nutrientes proporciona un adecuado desarrollo microbiano.

A dichos crecimientos, se les realizó posterior identificación confirmativa mediante sistemas *BBL Crystal* y a partir de ahí se procedió a la realización de control de calidad de los medios de cultivos.

Tabla 5. Microorganismos de investigación

CEPA	IDENTIFICACIÓN
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 200-32
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 483-865
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 484-1128

6.3 Repique y preservación de cepas

Del *KWIK-STIK*[™], paso de referencia (*Passage from Reference*): 3, se pasó al agar BHI en siembra masiva y se incubó a 35°C (+/- 2°) por 24 - 48 horas, después del tiempo de incubación se pasó una asada al vial de *CRYOBANK* y se tomaron 4 cajas de agar para hacer las cepas de trabajo, cada semana o cada cambio de lote se tomó una caja y se realizaron los controles de aseguramiento de calidad de cada medio de cultivo.

Se logró de forma satisfactoria el repique y así mismo la conservación de las cepas mediante el uso de crioviales, en este caso *CRYOBANK*. Un método eficiente para la preservación de microorganismos en congelación a temperatura de 4° C +/- 2°. Se clasificó en 3 colores diferentes: rojo para *B. cereus*, verde para *E. coli* y amarillo para *P. aeruginosa*

De acuerdo a *copan diagnostics Inc.*, los viales *CRYOBANK* contienen un medio para mantener el cultivo bacteriano en suspensión y 25 esferas en cerámica para portarlos. El medio está compuesto por tripticasa de soya (*tryptone soy broth*) suplementado con glicerol y sacarosa, ayudando a que la congelación como método de conservación sea mejor, puesto que en 2003, Hernandez. A., expone en su libro que algunas sustancias como el glicerol, ayudan a proteger los microorganismos durante el proceso de congelación. Estas sustancias conocidas como crioprotectores tienen un bajo punto de congelación por lo que ayudan a reducir la velocidad de congelación de los componentes de la célula microbiana.



Imagen 2. Crioviales de conservación de cepas de microorganismos (verde: *E. coli*, Rojo: *B. cereus*, amarillo: *P. aeruginosa*).

6.4 Confirmación de cepas de microorganismos

Transcurrido el tiempo de aislamiento de los diferentes microorganismos, *E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, en el medio enriquecido (BHI), se realizó confirmación bioquímica mediante *BBL Crystal*, caracterización microscópica y los resultados fueron los siguientes:

6.4.1 *Escherichia coli*

En el proceso confirmatorio, se realizó tinción de Gram, en la cual, se observó bacilos Gram negativos; así mismo con la identificación bioquímica mediante sistemas de identificación *BBL Crystal*, por otro lado, se realizó prueba de oxidasa dando resultado negativo. Obteniendo satisfactoriamente el crecimiento del microorganismo correspondiente.



Imagen 3. A) Tinción Gram: Gram negativo, B) Prueba oxidasa: negativa, C) Software de identificación *BBL Crystal*, D) Sistema de identificación *BBL Crystal* correspondientes a *E. coli*.

6.4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

En el proceso confirmatorio, se realizó tinción de Gram, en la cual se observó bacilos Gram negativos; así como realización de identificación bioquímica mediante Sistemas de Identificación *BBL Crystal*, se realizó prueba de oxidasa, dando resultado positivo; obteniendo satisfactoriamente el crecimiento del microorganismo correspondiente.



Imagen 4. A) Tinción Gram: Gram negativo, B) Prueba oxidasa: negativa, C) Software de identificación *BBL Crystal*, D) Sistema de identificación *BBL Crystal* correspondientes a *P. aeruginosa*.

6.4.3 *Bacillus cereus*

En el proceso confirmatorio, se realizó mediante tinción de Gram, en la cual, se observó bacilos Gram negativos; así como realización de identificación bioquímica mediante sistemas de identificación *BBL Crystal*. Obteniendo el crecimiento del microorganismo correspondiente.

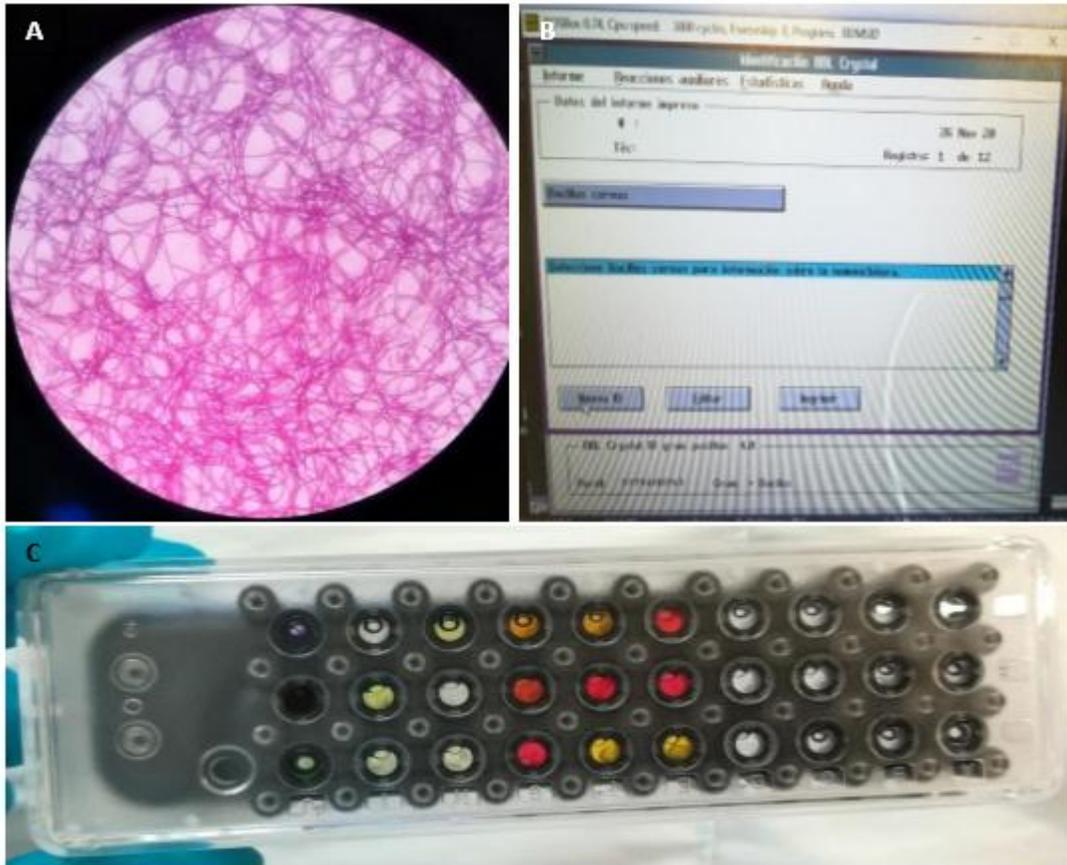


Imagen 5. A) Tinción Gram: Gram positivo, B) Software identificación *BBL Crystal*, C) Sistema de identificación *BBL Crystal* correspondientes a *B. cereus*.

6.5 Control de medios de cultivo

Al realizar los diferentes controles de los medios de cultivos, utilizados para evaluar la eficiencia de las operaciones de limpiezas y desinfección y la calidad microbiológica de los insumos y productos terminados elaborados en la planta Freskaleche - Aguachica, regional este, dan resultados confiables y veraces, ya que estos recuperan los microorganismos para la prueba de su selectividad.

Un medio de cultivo es un sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos; teniendo en cuenta que, los requerimientos de los medios son específicos de la muestra que se analiza, así como de los microorganismos que se quieren detectar.

Las tablas 6, 7 y 8, muestran los resultados favorables de crecimiento de las cepas en los diferentes medios, representados en ausencia/presencia. Esto, puesto que, en este ensayo, se utilizan cepas de referencia ATCC, que generalmente son de carácter cualitativo, ya que su principal uso es, ser utilizada por los laboratorios para

garantizar la calidad de sus actividades, en especial, para el control de medios de cultivo.

Se puede evidenciar que los resultados obtenidos a lo largo de los diferentes ensayos tienen un nivel de eficiencia favorable en los medios de cultivo utilizados, estos pueden variar según el fabricante, el lote, el almacenamiento y los procesos de preparación. También se debe tener en cuenta que la calidad del trabajo que produce un laboratorio no puede ser mejor que la calidad de las muestras que utiliza para los análisis. El laboratorio debe ser proactivo, al asegurarse de que las muestras que recibe, cumplen con todos los requisitos para producir unos resultados analíticos exactos (OMS, 2016).

De acuerdo con este ensayo y los resultados obtenidos en el mismo, los medios fueron aceptados, ya que se pudo verificar eficiencia en su actividad y especificidad. Esto es de gran importancia e impacto, puesto que, así los resultados obtenidos en los diversos análisis realizados en los diferentes laboratorios de la empresa “Productos Naturales de la Sabana” y sus matrices subordinadas, controladas y filiales tendrán voto de confianza y veracidad.

Se debe tener en cuenta, que los medios de cultivo también cuentan con una vida útil para su uso. Este aspecto es de suma importancia, puesto que, al llegarse a usar un medio de cultivo por fuera de este tiempo, puede ocurrir que se presenten errores en los resultados; lo cual sería comprometedor. También, al tratarse de medios de cultivo deshidratados, hay que tener en cuenta factores como, su preparación, esterilización, conservación de los medios recién preparados, recomendaciones generales que están bien descritas en el correspondiente certificado de cada medio.

Por esto, es de gran importancia la verificación en los laboratorios y así corroborar que la información plasmada en su documentación sea correcta y que los resultados obtenidos en los análisis realizados con el uso de dichos medios sean correctos, veraces y confiables. De allí que Monge A. en 2017, dice que cada laboratorio debe establecer sus propios criterios para la aceptación o el rechazo de los medios de cultivo a utilizar.

Tabla 6. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de septiembre de 2020.

FECHA	MEDIO DE CULTIVO	CEPA	PRESENCIA/ RECUENTO	AUSENCIA/ RECUENTO	CONCEPTO
					ACEPTABLE ² / NO ACEPTABLE
08/09/2020	VRBD	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

² Aceptable: El medio de cultivo es apto para el uso en análisis microbiológicos.

		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
08/09/2020	VRB	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
08/09/2020	Rosa Bengala	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
08/09/2020	YGC	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
08/09/2020	<i>Baird Parker</i>	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
08/09/2020	Agar Selectivo para <i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

Fuente: Autora.

Tabla 7. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de octubre de 2020.

FECHA	MEDIO DE CULTIVO	CEPA	PRESENCIA/ RECUENTO	AUSENCIA/ RECUENTO	CONCEPTO
					ACEPTABLE/ NO ACEPTABLE
13/10/2020	VRBD	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
13/10/2020	VRB	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
13/10/2020	Rosa Bengala	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
13/10/2020	YGC	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
13/10/2020	Baird Parker	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
13/10/2020	Agar Selectivo para <i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

Fuente: Autora

Tabla 8. Resultados de evaluación de medios de cultivo según crecimiento de microorganismos para el mes de noviembre de 2020.

FECHA	MEDIO DE CULTIVO	CEPA	PRESENCIA/ RECUENTO	AUSENCIA/ RECUENTO	CONCEPTO
					ACEPTABLE/ NO ACEPTABLE
10/11/2020	VRBG	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
10/11/2020	VRB	<i>E. coli</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

		<i>P. aeruginosa</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
10/11/2020	Rosa Bengala	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
10/11/2020	YGC	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
10/11/2020	Baird Parker	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
10/11/2020	Agar Selectivo para <i>Bacillus cereus</i>	<i>E. coli</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>P. aeruginosa</i>	-	AUSENCIA	ACEPTABLE
		<i>B. cereus</i>	PRESENCIA	-	ACEPTABLE

Fuente: Autora

En las imágenes 2 y 3 se muestra la efectividad de los medios de cultivo estudiados.

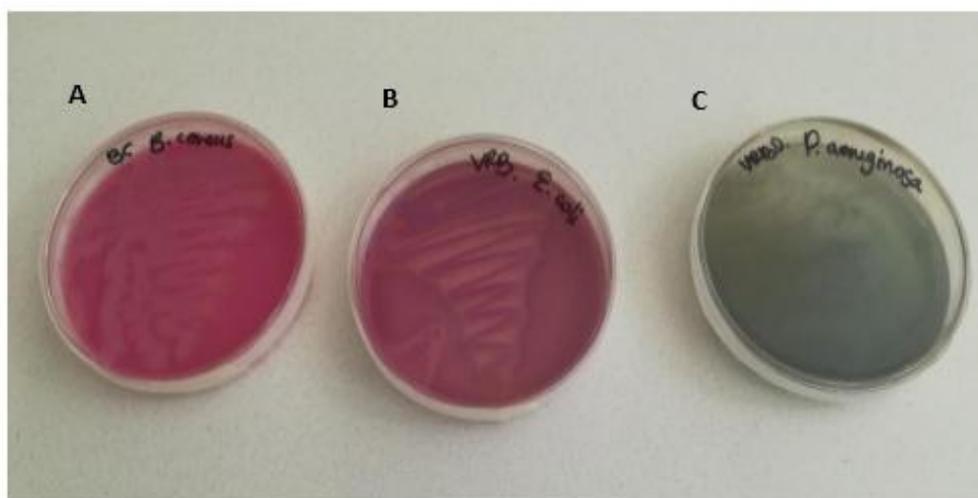


Imagen 6. Medios de cultivos selectivos y diferenciales: A) agar selectivo para *Bacillus cereus*, cepa *Bacillus cereus*, B) agar VRB, cepa *E. coli*, C) Agar cetrimide, cepa *Pseudomonas aeruginosa*.

En la imagen 6, se observa los crecimientos de los microorganismos A) agar selectivo para *Bacillus cereus*, cepa *Bacillus cereus*, B) agar VRB, cepa *E. coli*, C) agar *cetrimide*, cepa *Pseudomonas aeruginosa*. Evidenciando las características macroscópicas y las reacciones bioquímicas propias de cada medio: *Bacillus cereus* en Medio selectivo para *B. cereus*, esto debido a que el agar MYP (Manitol-Yema de huevo-Polimixina) se ha adaptado para satisfacer las necesidades nutricionales de *B. cereus*, y fue propuesto por Mossel et al. (1967) Para la enumeración, detección y aislamiento de *Bacillus cereus* en alimentos (Condalab, 2019); *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en agar VRBD/VRBG ya que estos medios selectivos contienen bilis y colorante rojo violeta para el aislamiento y enumeración de enterobacterias y está basado en medio MacConkey, que sirve para la detección de enterobacterias gram negativas tolerantes a la bilis en productos lácteos y alimentos (PanReac AppliChem, 2020).

Por otra parte, se pudo observar que al ser utilizado un medio no apropiado para el crecimiento y desarrollo de una cepa, este no favorecerá el crecimiento del microorganismo (imagen 7), como se evidencia en el agar base *cetrimide* inoculado con *Escherichia coli*, ya que con su adición de *cetrimide* inhibe totalmente el crecimiento de este microorganismo, pero permite el completo y total crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* (BD, 2003). *Baird parker* con *Pseudomonas aeruginosa*, ya que este es un medio parcialmente selectivo para estafilococos coagulasa positiva y que utiliza la capacidad de los estafilococos de reducir el telurito a telurio y detecta la lecitinasa a partir de la lecitina del huevo; inhibiendo así la flora acompañante gram negativa. Por otra parte, agar YGC con *Bacillus cereus*, ya que el cloranfenicol presente en este medio, es un verdadero antibiótico de amplio espectro. Que actúa sobre una amplia gama de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas e inactivo contra los hongos.

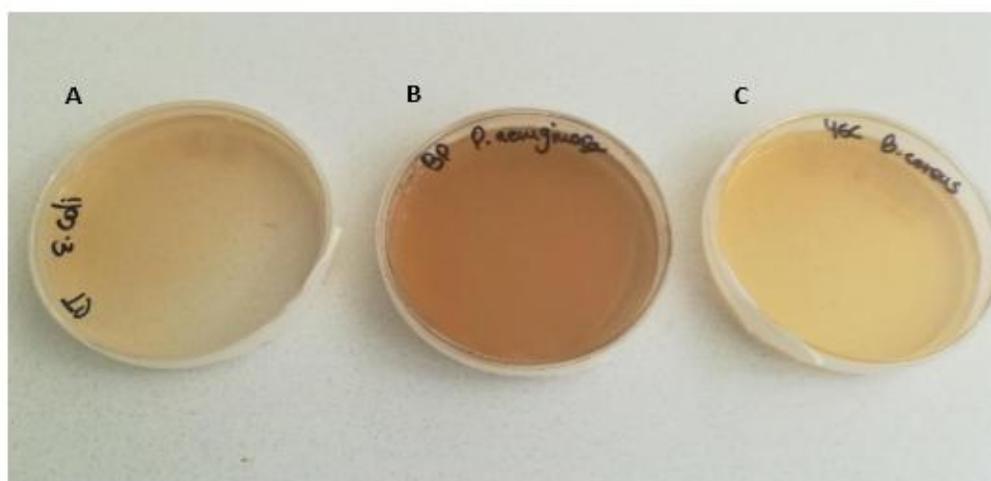


Imagen 7. Medios sin crecimiento: A) Agar *cetrimide*, cepa *E. coli*, B) agar *Baird Parker*, cepa *Pseudomonas aeruginosa*, C) agar YGC, cepa *B. cereus*.

CONCLUSIONES

Durante el desarrollo de este estudio, se logró el cumplimiento a cabalidad de los objetivos establecidos para el mismo, dando así el inicio del control de calidad de los medios de cultivo para la empresa “Productos Naturales de la Sabana”.

Se logró establecer el formato para la recepción de los medios de cultivos provenientes de las diferentes plantas, lo que conlleva a un mejor y riguroso control de la información.

Se elaboró el formato para el reporte de resultados del control de calidad de los diferentes medios de cultivo, lo que permitió tomar las medidas correctivas en los casos necesarios.

Se consiguió la recuperación y caracterización de las cepas mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas *BBL Crystal*, lo que dio lugar a la confirmación de los microorganismos.

Las pruebas de control de calidad de los diferentes medios de cultivos empleados en los análisis microbiológicos de los diferentes laboratorios de la empresa Productos Naturales de la Sabana, sus matrices subordinadas, controladas y sus filiales, garantizan la productividad de los medios soportando los análisis microbiológicos.

RECOMENDACIONES

- Se debe establecer en los laboratorios de aseguramiento de calidad de la empresa “Productos Naturales de la Sabana” como método estándar el test ecométrico para la evaluación de los medios en las diferentes dependencias de la empresa.
- Para asegurar un buen control de los medios es necesaria la realización de controles de diluyentes con menores frecuencias.
- Se recomienda la utilización de agar nutritivo para la recuperación de los microorganismos.
- Se recomienda realizar capacitaciones al personal que prepara los diferentes medios de cultivos con la resolución 1619/2015 y NTC 17025/2017.
- Se sugiere la implementación de la resolución 1619/2015 y NTC 17025/2017 para asegurar un correcto control de los medios a utilizar.
- Se recomienda la implementación de cronogramas de actividades, mencionando los medios de cultivo a utilizar, la cantidad de medio y el tiempo en que se desarrollará dicha actividad, con el fin de coordinar y facilitar cada una de las actividades, puesto que en los diferentes laboratorios pueden no llegar a utilizarse los mismos medios de cultivo en la misma línea de tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarez J, Gallo M, Elichiribehety E. (2016). Control de calidad microbiológica del agua para consumo. *Facultad de Ciencias Veterinarias. UNCPBA.*

Analac. (2002). Sector productor de leche. <https://analac.org/>

BRITANIA LAB. (2020). VRBG médium. www.britanialab.com

Cámara de comercio de Medellín para Antioquia. (9 de Octubre de 2017). *Cadenas lácteas en Antioquía*. Importancia de la cadena láctea en Antioquia. https://www.camamedellin.com.co/site/Portals/0/Documentos/2017/Publicaciones%20regionales/5%20Lacteos_Oct19.pdf

Carlin F, Brillard J, Broussolle V, Clavel T, Duport C, Jobin M, et al. Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwidedistributed foodborne pathogen, to a changing environment. (2010). *Food Res Int.* 43(7):1885-94.

CONDALAB. (2020). YGC medium. www.condalab.com

Copan Innovation. (2020). *CryoBank, conveniente sistema de perlas para almacenar y reactivar cultivos de bacteria.* www.copainnovation.com

Chyea F, Abdullah A, Ayobb M K, Chye FY, et al. (2004). *Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia.* Food Microbiology. 21:535–541.

FDA. (2003). *Bacteriological Analytical Manual.* Chapter 14: *Bacillus cereus.*

Freskaleche S.A.S, (2020). www.freskaleche.com.co

Herrera L, Campos M. (2005). *Control de calidad para un laboratorio de microbiología*. Revista Médica del Hospital Nacional de Niños.

Huertas SLP, Casas MMP, Morales MB, Moreno ZS, Castaño DM. (2006). *Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN)*. Nova. 4:39-49.

ICONTEC. NTC-ISO 17025. (2017). *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.

INS. (2010). *Boletín epidemiológico para protocolo de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos. Grupo de vigilancia y control de factores de riesgo ambiental*. Editor. Colombia: Instituto Nacional de Salud. p. 10 Hernández A. et al. Microbiología Industrial. Costa Rica. 2003

Janssens D, Arahal DR, Bizet C, Garay E. (2010). *The role of public biological resource centers in providing a basic infrastructure for microbial research*. Res Microbiol. 161:422-9.

Jay JM et al. (2005). *Modern Food Microbiology*. 7º ed. Springer, New York, p 149.

MERCK. (2020). *Baird parker medium*. www.merck.com

Microbiologics. (2016). PI194. Rev B. www.microbiologics.com

MINISTERIO DE SALUD Y PROTECCION SOCIAL (2015). Resolución 1619. *Sistema de Gestión de la Red Nacional de Laboratorios en los ejes estratégicos de Vigilancia en Salud Pública y de Gestión de Calidad*.

- Monge-Montero A. (2017). *Química Clínica de Costa Rica, Aseguramiento y control de calidad en la producción de medios de cultivo microbiológicos*. Revista Colegio de Microbiología. Vol 23.
- Murray PR, Jo Baron E, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (2003). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington, DC, USA: ASM Press.
- NEOGEN. (2020). Rosa de bengala medium. www.neogen.com
- Quintero Gómez, E. (2011). *Evolución y desarrollo del sector lácteo en Colombia desde la perspectiva del eslabón primario (producción)*. Corporación universitaria la Sallista.
- Roldán, D., Tejada, M., y Salazar, M. (2001). *La cadena láctea en Colombia*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. [https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Desarrollo%20Empresarial/La cteos.pdf](https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/Desarrollo%20Empresarial/La%20Cadena%20Lactea.pdf)
- Román S, Guerrero L, Pacheco L. (2003). *Evaluación de la calidad fisicoquímica, higiénica y sanitaria de la leche cruda almacenada en frío*. Revista Científica, FCV-LUZ. 8(2): 146-152.
- Semana. (1990). *Desempeño y retos futuros de la mayoría de subsectores agropecuarios durante los años 90*. <http://www.semana.com.co/documentos>.
- Tedeschi R, De Paoli P. (2011). *Collection and preservation of frozen microorganisms*. Methods Mol Biol. 675:313-26.

ANEXOS

ANEXO 1. Cronograma de actividades durante la pasantía empresarial.

HORA	DESCRIPCIÓN ACTIVIDADES	
	ANALISTA	PASANTE
7AM	DESINFECCIÓN DEL ÁREA	
8AM	VERIFICACIÓN DE EQUIPOS Y RUTINAS DE GARANTÍA DE CALIDAD, ALISTAMIENTO DE MEDIOS DE CULTIVOS	RONDA A PLANTA PARA TRAER MUESTRAS
9AM	ANÁLISIS DE AMBIENTES EN LAS PLANTAS, ANÁLISIS PUNTOS DE AIRE COMPRIMIDOS , ANÁLISIS DE HHRS ³ EN ACOPIOS Y RUTAS DE LECHE CALIENTE EN PLANTA., REUNIÓN GESTIÓN DE DESEMPEÑO, REGISTRAR LOS SEGUIMIENTOS PRODUCTO TERMINADO UHT, SEMBRARLOS TOMA DE PH Y ORGANOLÉPTICO 48 HORAS	REGISTRO Y SIEMBRA DE MUESTRA: VERIFICACIONES DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN, PRODUCTO TERMINADO LECHE EN POLVO, SIEMBRA DE MANIPULADORES, SIEMBRA SEGUIMIENTOS A PROCESOS, VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE UNIFORMES PVZ, SIEMBRAS DE INSUMOS Y EMPAQUES REUNIÓN GESTIÓN DE DESEMPEÑO.
10AM		
11AM	TOMA DE MUESTRAS Y ANÁLISIS DE PATÓGENOS, ANÁLISIS HHRS TANQUES ÁLISIS DE MUESTRAS ENVIADAS DE TANQUES, FROTIS Y MANIPULADORES DEL ACOPIO DE PAILITAS.	
12M	ALMUERZO	ALMUERZO
1PM	LECTURA: REPORTE DE RESULTADOS POR FUERA DEL ÁREA, DESCARTAR MATERIAL	RONDA A PLANTA PARA TRAER MUESTRAS
2 PM		REGISTRO Y SIEMBRA DE MUESTRA: VERIFICACIONES DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN, PRODUCTO TERMINADO LECHE EN POLVO, SIEMBRA DE MANIPULADORES, SIEMBRA SEGUIMIENTOS A PROCESOS, VERIFICACIÓN DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE UNIFORMES PVZ, SIEMBRAS DE INSUMOS Y EMPAQUES, TOMA DE MUESTRA SIEMBRA DE MUESTRAS DE ESPORAS EN LECHE
3PM	LIMPIEZAS DE INCUBADORAS, VERIFICACIÓN DE PIPETAS, ANÁLISIS DE AGUAS TRATADAS POR TÉCNICA FILTRACIÓN DE MEMBRANA EN LOS DIFERENTES PUNTOS EN PLANTA Y DE ACOPIO PAILITAS Y SAN ALBERTO, ANÁLISIS DE ALÉRGENOS, ANÁLISIS DE CUARENTENAS PRODUCTO TERMINADO	
4PM		

³ HHRS: endosporas altamente resistentes al calor.