 LABIOFAM Grupo Empresarial Empresa de Productos Inyectables	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO	PE 2-06-4
	PREPARACIÓN DE REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVOS Y DILUCIONES	Revisión:03
		Página 1 de 4

1. Objetivo:

Establecer la metodología para la preparación de medios de cultivos, diluciones y reactivos necesarios.

2. Alcance:

Es aplicable al laboratorio de la UEB Yogur.

3. Referencias:

3.1 NC ISO 6887-1:2002 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Preparación de muestra de ensayo, suspensión inicial y disoluciones decimales para pruebas microbiología. Parte 1: Reglas generales para preparación de suspensión inicial y disoluciones decimales.

3.2 NC 1004: 2016 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal- Guía general para la enumeración de levaduras y mohos-Técnica a 25 °C.

3.3 NC ISO 4831: 2010 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de coliformes. Técnica del número más probable

3.4 NC ISO 4832: 2010 Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía General para la enumeración de coliformes. Técnica de placa vertida.

3.5 NC –ISO/TS 11133-1:2012. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo. Parte 1: Guías Generales en el aseguramiento de la calidad para la preparación de medios de cultivo en el laboratorio.

3.6 PG 2-02-1. Elaboración y Control de los Documentos y Registros

4. Términos y definiciones:

4.1 Medio de cultivo: Es la preparación mediante la combinación de ciertos nutrientes que permiten el crecimiento específico de microorganismos.

4.2 Dilución: Suspensión, solución o emulsión obtenida después de que una cantidad pesada o medida, o de una muestra de ensayo del producto ha sido mezclada con nueve partes del diluyente, permitiendo la sedimentación de las partículas de mayor tamaño.

5. Responsabilidades:


5.1 Director de UEB Yogur.

- Controlar el cumplimiento de lo establecido en este procedimiento.
- Garantizar los medios y reactivos necesaria para el cumplimiento de este procedimiento.

5.2 Jefe de Laboratorio de Control de la Calidad

- Velar por el cumplimiento de lo que establece este procedimiento.

Aprobado por:	Nombre y Apellidos	Cargo	Firma	Fecha
	Anabel Meléndez Esquivel	Directora UEB Yogur		

 LABIOFAM Grupo Empresarial Empresa de Productos Inyectables	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO	PE 2-06-4
	PREPARACIÓN DE REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVOS Y DILUCIONES	Revisión:03
		Página 2 de 4

5.3 Técnicos del laboratorio (técnico microbiólogo y técnico del laboratorio químico-físico).

- Controlar la documentación relativa a este procedimiento.
- Realizar todo el trabajo relativo a la preparación de los reactivos, las diluciones y los medios de cultivos.

6. Desarrollo:

Las acciones recogidas en este procedimiento se ejecutarán a medida que sea necesario según los análisis a realizar. Serán preparados los reactivos, medios de cultivos y diluciones por parte de los técnicos del laboratorio. Cada vez que se prepare un medio de cultivo o solución se debe reflejar en el registro **R₁ 2-06-4** por parte del técnico de microbiología y el de análisis químico-físico según corresponda.

Preparación de medios de cultivos y reactivos.

6.1 Medios de cultivos:

- **Agar Rojo Violeta Bilis Lactosa:** Suspender 50 g en un litro de agua destilada o desionizada. Ajustar el pH a 7.4 +/- 0.2 a 25 °C. Posteriormente se mezcla bien calentando hasta su disolución completa. Esterilizar a las condiciones que establece proveedor del medio. Usar según proveedor una vez reconstituido.
- **Agar Triptona Soja:** Suspender 40 g en un litro de agua destilada o desionizada, mezclar bien hasta su disolución completa. Esterilizar a las condiciones que establece proveedor del medio.
- **Caldo Bilis Verde brillante:** Suspender 50 g en un litro de agua destilada o desionizada, mezclar hasta disolución completa. Esterilizar a las condiciones que establece proveedor del medio.
- **MRS Agar:** Suspender 62 g en un litro de agua destilada o desionizada, mezclar hasta disolución completa, el pH final debe ser 6.2 +/- 0.2. Esterilizar a 121°C por 12 min y distribuir en las placas.

• **Extracto de Levadura- Dextrosa-Cloranfenicol-Agar:**


Ingredientes:

Extracto de levadura.....5g
Dextrosa.....20g
Cloranfenicol.....0.1g*
Agar.....12-15g**
Agua destilada.....1000mL

*Para obtener una concentración final de 100 µg/mL de medio.

**Acorde a las instrucciones del fabricante.

Se disuelven los dos primeros ingredientes en el agua destilada, se ajusta el pH a 6.6, se disuelve el cloranfenicol en 3 mL de alcohol etílico, se añade el agar a los ingredientes disueltos en el agua destilada, se funde a la llama del mechero, se

 LABIOFAM Grupo Empresarial Empresa de Productos Inyectables	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO	PE 2-06-4
	PREPARACIÓN DE REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVOS Y DILUCIONES	Revisión:03
		Página 3 de 4

agrega la solución alcohólica de cloranfenicol, se distribuye el medio en recipientes adecuados y se esteriliza en autoclave durante 15 min a 121°C.

El ajuste de los pH para todos los medios se realizara con las soluciones descritas en el artículo 4.3.5 Medición y ajuste de pH de la norma NC –ISO/TS 11133-1:2012.

6.2 Diluciones para uso general (Microbiología)

Solución salina peptonada (Composición)

Digerido enzimático de caseína (Tryptona C) ----- 1.0 g
 Cloruro de Sodio-----8.5 g
 Agua destilada-----1000 mL

Preparación:

Disolver los componentes en el agua, por calentamiento si es necesario. Ajustar el pH hasta $7,0 \pm 0,2$ a 25 °C. Esterilizar en autoclave durante 15 minutos 121°C.

6.3 Preparación de reactivos:

- **Solución alcohólica de Fenolftaleína al 1% neutralizada.**

Se pesa 1g de Fenolftaleína y se disuelve en 100 mL de agua destilada.

- **Solución de anaranjado de metilo.**

Se pesa 1 g de anaranjado de metilo y se disuelve en 100 mL de agua destilada.

- **Solución de NaOH 0,1 mol/L.**

Se pesan 4,2 g de NaOH y se diluyen en 1000 mL de agua para análisis recientemente hervida y enfriada.

- **Solución de NaOH 0.25 N para la valoración de la concentración del ácido fosfórico que se utiliza en el CIP.**

1. Se pesan 162 g de NaOH en perlas y se disuelve en 50 mL de agua destilada.

2. La solución del paso 1 se filtra.


3. De la solución filtrada se miden 54,5 mL y se disuelve con agua destilada en un volumétrico de 1 L hasta llegar al enrase (NaOH 1N).

4. De la solución del paso 3 se miden 250 mL y se disuelve en un volumétrico de 1 L hasta llegar al enrase (solución NaOH 0.25 N).

- **Solución de ácido sulfúrico al 0.25 N para valorar concentración de la sosa que se utiliza en el CIP.**

1. Medir 30 mL de ácido sulfúrico puro y disolver con agua destilada en un volumétrico de 1 L hasta llegar al enrase.

2. Tomar de la solución del paso 1, 250 mL y disolver en un volumétrico de 1 L adicionando agua destilada hasta llegar al enrase.

 LABIOFAM Grupo Empresarial Empresa de Productos Inyectables	PROCEDIMIENTO ESPECÍFICO	PE 2-06-4
	PREPARACIÓN DE REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVOS Y DILUCIONES	Revisión:03
		Página 4 de 4

Valoración de la solución 0,1N de NaOH.

Transfiera 10 ó 25 mL de Biftalato de Potasio o de Ácido Oxálico 0,1N en un erlenmeyer y agregue 5 gotas de la solución de fenolftaleína al 1%. Valore con la solución de NaOH 0,1N hasta cambio de coloración (transparente rosado). Realice la valoración por triplicado y calcule la media de los valores obtenidos. Calcule la normalidad por la fórmula siguiente: $v \cdot n = v \cdot n$

Soluciones necesarias para valoración de la solución 0,1N de NaOH.

- **Solución de Biftalato de Potasio 0,1N.**

Se pesan 20,4223 g de Biftalato de Potasio previamente secado a 20°C por 2 h y se diluyen en 1000 mL de agua destilada.

- **Solución de Ácido Oxálico 0,1N.**

Se pesan 6,3034g de ácido oxálico y se diluyen en 1000 mL de agua para análisis.

Otras soluciones:

- **Solución de Azul de Metileno al 0.6%. (Microbiología).**

Se pesan 0.6g de azul de metileno y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Agite hasta completa dilución.

- **Mezcla Sulfocromica.**

Fórmula para 4 L

- Ácido sulfúrico concentrado 2 L
- Dicromato de potasio 51 g
- Agua destilada 2 L

Modo de preparación:

- Vierta el agua destilada en un recipiente de 5L.
- Añada el dicromato y agite hasta disolución.
- Incorpore el ácido sulfúrico lentamente.
- Deje enfriar.

7. Registros:

7.1 R₁ 2-06-4 Preparación de reactivos, medios de cultivos y diluciones.

El registro estará en archivo activo 1 año y luego se archivará por otro año en el archivo pasivo, transcurrido este tiempo se desechará.

8. Anexo:

8.1 Anexo 1 R₁ 2-06-4 Preparación de reactivos, medios de cultivos y diluciones.

