

IL-40.23: Recuento de aerobios totales a 36 °C**1. DEFINICIONES y FUNDAMENTO**

Se siembra, por mezclado con un medio de cultivo específico en placas Petri, volúmenes medidos de una muestra o sus diluciones. Se incuban una serie de placas a 36 °C durante 48 h.

2. CONTENIDO**2.1 EQUIPO NECESARIO**

- Equipo para esterilización con calor húmedo (autoclave)
- Estufa de incubación para mantener 36 °C
- Placas Petri de plástico con diámetro de 90 mm.
- Baño de agua
- Agitatorios.
- Pipetas estériles de 1,5 ml.
- Magnetoagitador para disolver el medio de cultivo.

2.2 REACTIVOS

- Agua destilada para preparar el medio, en un equipo de vidrio al nivel de calidad 3 de la Norma ISO 3696, que este libre de sustancias que puedan inhibir el crecimiento en las condiciones de ensayo.
- Agua peptonada

Cloruro sódico	5,0 g/l
Peptona de caseína	10,0 g/l
- PCA (recuento en placa Agar)

Triptona (Peptona de caseína)	5,0 g.
Extracto deshidratado de levadura	2,5 g.
Agar	9,0 g.
Dextrosa	1,0 g.

Se añade el medio completo deshidratado al agua y se disuelve calentando en el magnetoagitador, llevando hasta el punto de ebullición.

Una vez disuelto, se esteriliza en autoclave a 121 ± 3 °C durante 15 ± 1 min.

Para su empleo, se deja enfriar y se mantiene a 45 ± 1 °C en el baño de agua. Es recomendable no mantener el medio durante más de 4 h. a 45 °C. Transcurrido ese tiempo el medio debe desecharse.

2.3 PROCEDIMIENTO

- Preparación y siembra

Se realizan dos diluciones de cada muestra recogida (10^{-2} y 10^{-3}), y se preparan dos ensayos para cada dilución.

Se utiliza el método de siembra en profundidad en placa (ISO 8199). Se pone un volumen de la muestra de ensayo de 1 ml. en la placa Petri, se añaden de 15 a 20 ml. de medio fundido y se mezcla cuidadosamente mediante una suave rotación. Se deja solidificar el medio. El tiempo transcurrido entre la adición de la muestra y la adición del medio no debe superar los 15 min.

- Incubación y examen

Se invierten las placas y se incuban a 36 °C durante 48 h. Se examinan las placas tan pronto como se sacan de las estufas de calefacción Si no es posible realizar el examen de inmediato, se conservan a 5 ± 3 °C y se examinan en las 48 h. siguientes. Debe rechazarse toda placa que presente un crecimiento confluyente.

- Recuento de colonias

Siguiendo el procedimiento descrito en la Norma ISO 8199, se cuentan las colonias que se observan en cada placa y se calcula el número estimado de unidades formadoras de colonias presentes en 1 ml.

2.4 PRESENTACION DEL RESULTADO

Los resultados se expresan como el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml) de muestra para cada temperatura de incubación.

Si no hay colonias en las placas sembradas con los volúmenes de ensayo de la muestra sin diluir, los resultados se expresan como: no detectado en 1 ml.

Si hay más de 300 colonias en las placas sembradas con las mayores diluciones utilizadas, los resultados se expresan como: > 300 o solamente como valores aproximados.

3. REGISTROS

Como consecuencia de la aplicación de este procedimiento se generan los siguientes registros:

- Copia para archivar en la carpeta de laboratorio (red informática).
- Informe de análisis con el resultado obtenido en la carpeta de cliente (red informática).

La presente instrucción de trabajo esta basada en la **Norma UNE- EN ISO 6222: Recuento de colonias por siembra en medio de cultivo de agar nutritivo.** Todos los puntos del procedimiento hacen referencia al mismo.