



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Manual de prácticas de laboratorio

Microbiología de los Alimentos

Arely Prado Barragán

Gabriela Rodríguez Serrano

Ivonne Figueroa González

Keiko Shirai Matsumoto



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. Javier Velázquez Moctezuma
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dr. Rubén Román Ramos
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dr. Octavio Loera Corral
Jefe del Departamento de Biotecnología

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Prólogo

En la preparación de este manual se mantuvieron los criterios que imperaron en el programa de la EUA de Microbiología de Alimentos y su integración en el plan de estudios de la licenciatura de Ingeniería de los Alimentos.

Se estableció un manual de prácticas que incluyera la información teórica básica y las instrucciones claras y precisas que permitan al estudiante, aprender las técnicas fundamentales de la microbiología vigente.

Este manual contiene algunas técnicas habituales complementadas con el material bibliográfico actual. En cada práctica se incluyen figuras ilustrativas y esquemas de observación que facilitan la guía del profesor y la comprensión por parte de los alumnos.

Agradecimiento

Las autoras agradecen a Ángel Eduardo Márquez Ortega su invaluable apoyo en la elaboración de los esquemas.

Índice

Medidas de seguridad en el laboratorio de Microbiología de Alimentos	7
Práctica 1. Cuenta total estándar de microorganismos mesófilos aerobios en alimentos y método del número más probable para el análisis de coliformes fecales en alimentos.	11
Práctica 2. Detección de Salmonella y Shigella en alimentos.	17
Práctica 3. Determinación de Staphylococcus y Streptococcus en alimentos.	23
Práctica 4. Efecto de los conservadores químicos en los microorganismos que contaminan a los alimentos.	39
Práctica 5. Determinación del tiempo de destrucción térmica (TDT) y del punto de muerte térmica (PMT) en microorganismos	35
Práctica 6. Determinación del coeficiente fenólico	41
Referencias	47
Anexo I. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.	49
Anexo II. Tabla para el cálculo del Número Más Probable (NMP)	51
Anexo III. Formulación de medios de cultivo	53
Anexo IV. Preparación de reactivos y soluciones	73
Anexo V. Tinción de Gram	79

Medidas de seguridad en el laboratorio de Microbiología de Alimentos

El objetivo de esta sección es dar a conocer las reglas básicas de higiene y seguridad a seguir en un laboratorio de microbiología.

El trabajo en un laboratorio de Microbiología de Alimentos implica la exposición a microorganismos y algunos pueden ser potencialmente patógenos. La aplicación correcta de las reglas de seguridad e higiene determina la seguridad de las personas que se encuentren en el laboratorio.

Las normas de seguridad y contención microbiológica describen los requisitos indispensables para los laboratorios en donde se manipulan microorganismos.

La siguiente clasificación de riesgos se basa en la patogenicidad del microorganismo, el modo de transmisión y la gama de huéspedes, la disponibilidad de medidas preventivas y la disponibilidad del tratamiento eficaz.

Grupo de riesgo 1: Riesgos individuales y de bajo riesgo para la comunidad. Microorganismos que son poco probable que causen daño a la población humana, vegetal o animal. Como ejemplo de microorganismos de este grupo se tienen: *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Saccharomyces*.

Grupo de riesgo 2: Riesgo individual moderado, riesgo comunitario limitado. Microorganismos que son poco probable que sean un riesgo significativo para el personal de laboratorio, la comunidad, la ganadería o el medio ambiente, las exposiciones de laboratorio pueden causar la infección. El tratamiento es eficaz y las medidas preventivas se encuentran disponibles. El riesgo de propagación es limitada. Dentro de este grupo se encuentran: *Actinomyces bovis*, *Bacillus anthracis*, *Bordetella*, *Clostridium perfringens*, *Legionella*, *Vibrio cholerae*, *Blastomyces*, *Trichoderma*.

Grupo de riesgo 3: Riesgo individual alto, riesgo a la comunidad moderado. Microorganismos que provocan generalmente una enfermedad en humanos o animales grave y puede representar un riesgo significativo para los trabajadores de laboratorio. Se podría presentar un número limitado de riesgo moderado si se propaga en la comunidad o el medio ambiente, pero hay medidas de prevención general o tratamientos eficaces. Dentro de este grupo se considera a *Brucella*, *Francisella*, *Mycobacterium bovis*, *Pseudomonas mallei*, *Salmonella paratyphi A*, *Salmonella typhi*, *Yersinia pestis*, *Coccidioides immitis*, *Epidermophyton*, entre otros.

Grupo de riesgo 4: Alto riesgo individual y comunitario. Microorganismos que normalmente producen enfermedad a humanos o animales y ponen en peligro la vida, representa un riesgo significativo para los trabajadores de laboratorio y puede ser fácilmente transmisible de un individuo a otro. El tratamiento eficaz y las medidas preventivas no están generalmente disponibles. En este grupo generalmente se consideran los virus como *Arenaviridae* virus de Lassa, Junín y Machupo, Sabia, Guanarito; *Bunyaviridae* género *Nairovirus* Crimean-Congo hemorrhagic fever *Filoviridae*: virus de Marburg; virus de Ebola; *Flaviviridae*: complejode la encefalitis Tick-borne; incluyendo –encefalitis rusa, de primavera - verano; virus del bosque de Kyasanur; virus de la fiebre hemorrágica de Omsk; *Herpesviridae*; *Alphaherpesvirinae*; género *Simplexvirus*: Herpes B virus (virus del mono) *Poxviridae* género *Orthopoxvirinae* *Variola Monkeypox*.

El conocimiento de las medidas de seguridad y precaución son pre-requisitos indispensables de trabajo en el laboratorio de microbiología. Las medidas de seguridad que a continuación se describen coadyuvan a reducir los peligros inherentes en el uso de material que, hasta cierto nivel, se puede considerar como potencialmente peligroso. Se espera que todos los alumnos y profesores observen las medidas de seguridad al estar trabajando en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Recomendaciones generales:

1. Es importantes que antes de la primera sesión práctica en laboratorio se ubiquen las regaderas de seguridad, extinguidores, lavaojos, botiquín así como familiarizarse con el uso adecuado de los mismos.
2. Se debe utilizar bata de algodón perfectamente abotonada y limpia. La bata debe llegar a la rodilla, no se permitirá el uso de filipinas debido a que éstas no ofrecen la protección requerida. Asimismo, se sugiere que la bata sea de color blanco para facilitar la identificación de posibles derrames.
3. Se recomienda el uso de calzado cerrado y suela antiderrapante. El uso de sandalias con calcetines no es apropiado para trabajar en el laboratorio.
4. El uso de pantalones cortos o falda no está permitido dentro del laboratorio.
5. El cabello largo debe ser recogido en la parte de atrás de la cabeza para evitar contacto con soluciones, mecheros o cultivos microbianos.
6. Comer, beber, fumar, aplicar cosméticos y la manipulación de lentes de contacto no está permitido dentro del laboratorio. Papel, lápices, dedos y cualquier otro objeto deben mantenerse alejados de la boca y ojos.
7. Esta prohibido pipetear o tocar cualquier tipo de material con la boca. Se deben utilizar bulbos de seguridad o pro-pipetas adecuadas al volumen de trabajo. Cuando se utilicen pipetas automáticas, asegurarse de desechar las puntas en los contenedores apropiados dispuestos por la coordinación de laboratorios.
8. Cualquier tipo de herida o abrasión debe ser cubierta para prevenir infecciones.
9. Se deben utilizar guantes durante la manipulación de material tóxico o corrosivo y se deben desechar adecuadamente antes de tocar materiales comunes como tapones, tubos, manijas, etc.
10. Cuadernos, chamarras, suéteres, bolsas, mochilas, etc. no deben ponerse sobre la superficie de las mesas de trabajo. Utilizar los espacios designados para ello.
11. Se deben utilizar los desinfectantes indicados por el profesor.
 - a) Es necesario lavarse las manos con jabón y utilizar gel sanitizante al inicio y al final de la sesión de laboratorio; así como al terminar de manipular cualquier tipo de cultivo o material que pueda estar contaminado.
 - b) La superficie de trabajo debe ser desinfectada (ej. fenol 5%; benzal 5%, cloro 5%) al inicio y al término de la sesión de trabajo, así como en caso de algún derrame de material infeccioso.
12. Las asas de inoculación utilizadas para transferir cultivos deben ser esterilizadas por flameado al rojo vivo antes y después de cada uso. Se debe flamear el asa de manera vertical. Si el alambre se encuentra cubierto con material viscoso, es necesario secar al lado de la flama antes de esterilizar para evitar la formación de aerosoles que puedan contaminar a quien este manipulando el material y a los compañeros que se encuentren cerca. Los mecheros deben permanecer apagados cuando no estén en uso.
13. Para evitar derrames o salpicaduras con cultivos, los tubos y matraces deben mantenerse de manera vertical. Los tubos no deben ser tomados por las tapas y no deben ser agitados violentamente. En caso de utilizar el vórtex, sostener el tubo y la tapa simultáneamente.

14. TODOS los accidentes como cortadas, quemadas, ruptura de material, derrames, etc., deben ser reportados inmediatamente al profesor responsable a la brevedad. En caso de derrames de cultivos bacterianos, se debe proceder como sigue:

- Informar al profesor responsable
- Ponerse guantes de neopreno
- Adicionar un volumen de cloro o de desinfectante de superficies, igual al del derrame
- Esperar 5 minutos para que las soluciones se mezclen
- Limpiar el derrame con toallas absorbentes, procurando el mínimo contacto con la solución contaminada
- Desechar el material dentro de una bolsa o contenedor esterilizable
- Desechar los guantes y lavarse las manos con abundante agua y jabón y posteriormente utilizar gel desinfectante

15. Todos los desechos sólidos y líquidos contaminados como cajas de petri, diluciones, caldos de cultivo y puntas de pipeta deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados en los contenedores dispuestos por la coordinación de laboratorios. Es importante desechar el material biológico siguiendo las indicaciones del profesor para evitar que el personal que manipula los desechos se contamine.

16. En caso de que se rompa algún material de vidrio, notificar al profesor y desechar en los contenedores adecuados para evitar la posibilidad de accidentes por cortaduras o astillamientos.

17. Antes de salir del laboratorio, asegúrate de los siguientes puntos:

¿Todos los cultivos y material contaminante fueron esterilizados en autoclave y desechados apropiadamente?

¿Se removieron todas las etiquetas de los tubos y matraces utilizados?

¿Todo el material que quedó en las estufas, refrigeradores y gavetas está rotulado correctamente?

¿Se cerraron las llaves del gas y agua correctamente y se apagó la luz?

¿Se limpió adecuadamente el microscopio (en caso de que se haya utilizado) antes de ser entregado?

¿Se limpió y secó cualquier derrame de agua o manchas de la mesa de trabajo, piso y tarjas?

¿Se desinfectó la mesa y superficies de trabajo?

¿Te lavaste y desinfectaste las manos?

Quien suscribe reconoce el haber leído y entendido el reglamento de seguridad del Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Nombre: _____

Grupo: _____

Área: _____

La lectura y seguimiento de las medidas de seguridad de trabajo en el laboratorio de Microbiología de Alimentos es responsabilidad de todos los participantes.

Los experimentos que se realizan en el laboratorio de Microbiología de Alimentos consideran la manipulación de microorganismos patógenos. La manipulación y desecho incorrecto de los materiales puede conllevar a riesgos de infección, heridas o enfermedades. Por la seguridad de todos, se requiere el entendimiento y seguimiento de los procedimientos señalados por los participantes en las sesiones de laboratorio.

Tu firma en el presente manual indica que has leído y entendido apropiadamente los procedimientos y que estás de acuerdo en acatarlos.

Firma del alumno

Fecha

Práctica 1

Cuenta total estándar de microorganismos mesófilos aerobios en alimentos y método del número más probable para el análisis de coliformes fecales en alimentos

Objetivo

Que el alumno cuantifique la microflora mesófila aerobia e identifique la contaminación de origen fecal en alimentos utilizando las técnicas más comunes.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

La cuenta en placa es la técnica comúnmente utilizada cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables en un alimento (NOM-092-SSA1-1994).

La cuenta en placa inicia con una dilución primaria con el objeto de distribuir lo más uniformemente posible los microorganismos contenidos en la muestra destinada para el análisis. Posteriormente se preparan diluciones decimales adicionales para reducir el número de microorganismos por unidad de volumen y permitir la adecuada distribución y conteo de microorganismos en placa después de la incubación (NOM-110-SSA1-1994).

Otra técnica comúnmente empleada para determinar el número de microorganismos es la técnica del número más probable. Esta también se conoce como técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado (NOM-112-SSA1-1994).

En esta práctica, además de aprender las técnicas oficiales para la determinación de mesófilos aerobios se determinarán bacterias coliformes. Este grupo es el más utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de la realización de prácticas higiénicas inadecuadas (NOM-113-SSA1-1994). *Escherichia coli*, es patógeno potencial para el hombre, es un bacilo aislado del tubo intestinal de los animales de sangre caliente y es considerado por esta razón como indicador de contaminación fecal.

Dentro del grupo de coliformes, *E. coli* es el único productor de indol, además produce gas y ácidos orgánicos (láctico, acético, succínico), es menos acidificante que las bacterias lácticas debido a que es inhibido a valores de pH entre 5 y 5.2 (Frazier y Westhoff, 2003).

Material equipo

Por equipo	Por grupo
1 Espátula	1 Probeta 100 ml
1 Frasco de dilución de 100 ml con tapón de rosca	1 Probeta de 500 ml
5 Pipetas de 1ml con graduación de 0.1 ml	1 Matraz Erlenmeyer de 2000 ml
1 Pipeta 10 ml	2 Matraces Erlenmeyer de 500 ml
1 Cilindro para esterilizar pipetas	3 Vasos de precipitado 1000 ml
16 Cajas petri de vidrio o desechables (estériles) de 100x15 mm	1 Vaso de precipitado 500 ml
20 Tubos de cultivo con tapón de rosca de 16x150 mm	3 Vasos de precipitado 250 ml
9 Tubos de cultivo de 13x150 mm	8 Barras de agitación magnética
15 Tubos (campanas) de Durham.	3 Parrillas de calentamiento y agitación
1 Piceta con agua destilada	2 Balanzas granatarias
1 Piceta con etanol	1 Balanza analítica
1 Asa microbiológica	2 Autoclaves con base, canastilla y válvula
2 Varillas de vidrio en ángulo	1 Incubadora
Portaobjetos y cubreobjetos	1 Refrigerador
1 Propipeta para volúmenes de 1 a 5 ml	2 Pares de guantes de asbesto
1 Propipeta para volúmenes de 5 a 10 ml	Escobillones, fibra, detergente y toallas de papel secante
1 Vidrio de reloj	Papel estraza, algodón y gasa
2 Gradillas	
2 Mecheros Fisher	
1 Motor de licuadora	
1 Mini vaso para licuadora con capacidad de 250 ml	
1 Conexión T de vidrio con manguera de latex	
1 Microscopio óptico	
1 Cuenta-colonias	
1 Plumón rotulador indeleble	
1 Tijeras	
Cinta adhesiva protectora (Masking tape)	

Medios de cultivo y reactivos

Agar de cuenta estándar (ACE)	Agar rojo neutro-cristal-violeta bilis (RVB)	Agua destilada
Caldo <i>Escherichia coli</i> (CEC)	Caldo lauril sulfato (CLS)	Aceite de inmersión
Agar citrato de Simmons (ACS)	Caldo rojo de metilo-Vogues Proskauer (RM-VP)	Etanol
Agar eosina azul de metileno (EMB)	Rojo de metilo	Fenol
Agar triple azúcar hierro (TSI)	Reactivo de Kovac's	α -naftol
Agarsulfuroindol (ASI)movilidad (SIM)	NaCl	KOH

Procedimiento

Cuenta total estándar de microorganismos mesófilos aerobios

1. Preparación de la muestra: Diluciones.

- 1.1 *Dilución primaria*: Pesar 10 g del alimento en condiciones asépticas. Transferir a un vaso de licuadora previamente lavado y desinfectado con alcohol, agregar 90 ml de solución salina estéril (0.9 % p/v) y licuar por un minuto. Si el alimento no necesita licuarse pesar 10 g de producto o 10 ml directamente en un frasco de dilución con 90 ml de solución salina estéril y agitar vigorosamente para homogenizar la muestra. Esta dilución corresponderá a 10^{-1} .
- 1.2 *Diluciones decimales*: Se tomará 0.1 ml de la dilución 10^{-1} y se transferirán a un tubo que contiene 9.0 ml de solución salina estéril (10^{-2}). Esta operación se repetirá para preparar tantas diluciones decimales como sea necesario (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).

2. Inoculación por la técnica de extensión superficial en placa

- 2.1 Inocular 0.1 ml de cada dilución en placas de agar de cuenta estándar, extendiendo homogéneamente sobre la superficie con una varilla de vidrio en ángulo previamente esterilizada (perfectamente limpia, desinfectada con alcohol, flameada y enfriada) (Esquema 1).
- 2.2 Invertir las cajas e Incubar a 35°C por 24 a 48 h.

3. Interpretación de los resultados de la cuenta total estándar

- 3.1 Completada la incubación seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias.
- 3.2 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento. Determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml o g de acuerdo a la ecuación 1

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N \times ID}{V} \quad (1)$$

Donde N es el promedio de número de colonias, ID es el inverso de la dilución y V es el volumen de muestra inoculado

- 3.3 Redondear la cantidad a dos cifras. Considerar las reglas de cuenta de colonias (Anexo I).

Prueba presuntiva para coliformes

4. Inoculación de los tubos con las diluciones decimales

- 4.1 Inocular una serie de tres tubos conteniendo 10 ml de caldo lauril sulfato y campana de Durham, con 1 ml de dilución 10^{-1} . Proceder de igual manera con las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} . En total deberán ser nueve tubos por muestra (Esquema 1).
- 4.2 Incubar los tubos por 48 h a 35°C . Revisarlos a las 24 h, si la producción de gas es positiva, realizar la prueba confirmativa o refrigerar, sino volver a incubar.

Interpretación de los resultados del número más probable

5. Anotar la combinación de tubos positivos (con gas) y confrontarlo con la tabla del número más probable (Anexo II).
 - 5.1 Reportar el número de coliformes fecales por gramo o ml.

Prueba confirmativa de coliformes fecales.

6. Inoculación de los tubos
 - 6.1 De los tubos positivos (producción de gas) transferir asépticamente una asada de los cultivos a tubos con 10 ml de caldo EC con campanas de Durham, repetir la operación tres veces (Esquema 1).
 - 6.2 Incubar por 48 h a 37° C.

Determinación de *E. coli*.

7. Inoculación de las cajas por estría cruzada
 - 7.1 Sembrar dos placas de medio EMB y RVB a partir de tubos positivos con caldo EC (Esquema 1).
 - 7.2 Incubar 24 h a 35° C.

Identificación Bioquímica

8. Inoculación de los tubos
 - 8.1 De las placas, seleccionar colonias aisladas características de coliformes que son negras con brillo metálico en el medio de EMB y rojas en el medio RVB (Esquema 1). A partir de las colonias seleccionadas, inocular por asada los siguientes medios:

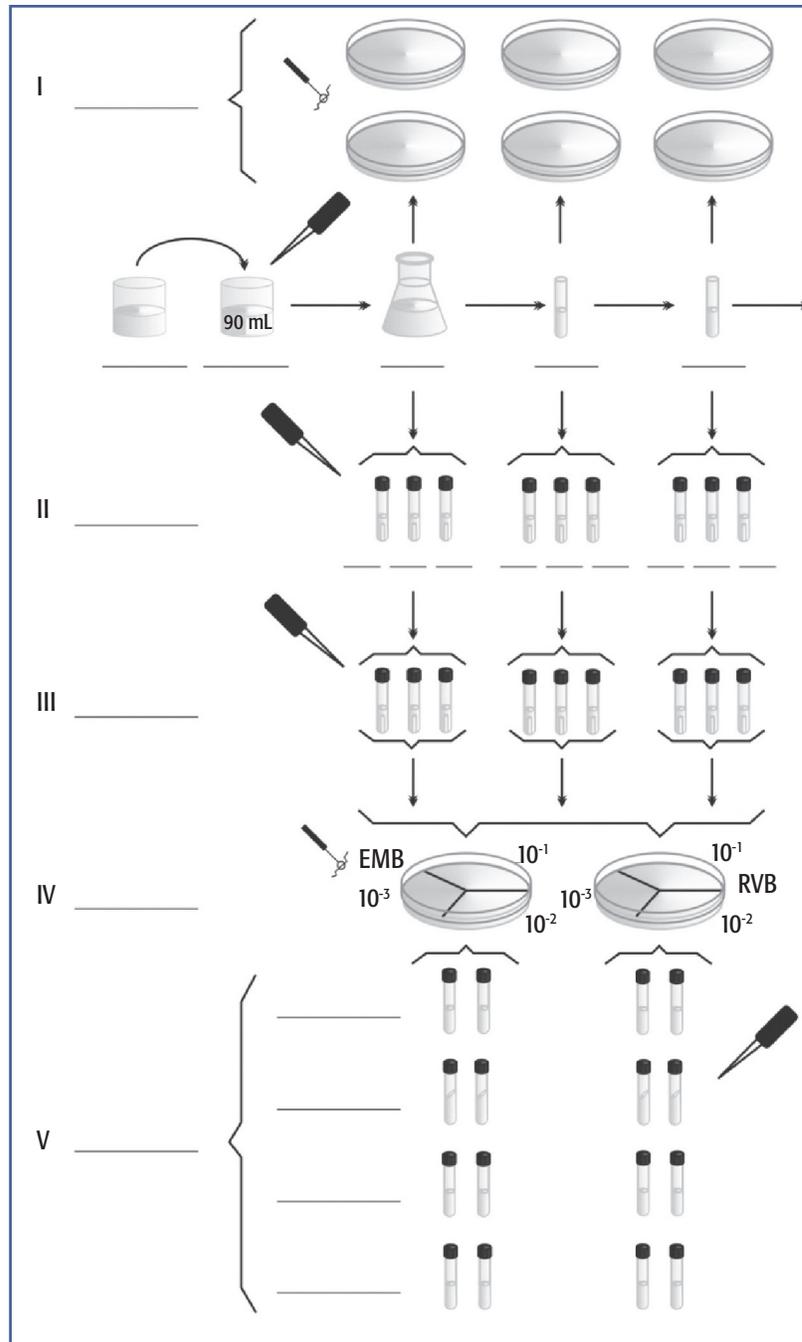
Agar SIM Incubar 24 h a 35°C
 Producción de H₂S
Prueba positiva: ennegrecimiento del medio.
Prueba negativa: no hay ennegrecimiento.
 Movilidad
Prueba positiva: hay una turbidez difusa del medio.
Prueba negativa: sólo hay crecimiento a lo largo de la punción.
 Producción de indol
Prueba positiva: aparición de color rojo cuando se agrega el reactivo de Kovacs.
Prueba negativa: no hay aparición de color.

Agar citrato de Simmons Incubar 48 h a 35°C.
 Asimilación de citrato como fuente de carbono
Prueba positiva: viraje del medio a azul.
Prueba negativa: sin cambio

Caldo RM-VP Incubar 24 h a 35°C
 Realizar la prueba de Voges-Proskauer: Añadir 0.6 ml de α-naftol y 0.2 ml KOH (Anexo IV).
 Oxidación de acetoína a diacetilo
Prueba positiva: desarrollo de coloración rosa o rojo.
Prueba negativa: sin cambio
 Acidificación del medio o producción de acetoína y diacetilo
 Incubar 72 h a 35°C
 Realizar la prueba de Rojo de Metilo
Prueba positiva: medio se torna rojo.
Prueba negativa: sin cambio

9. Interpretación de resultados.

9.1 Basándose en las pruebas bioquímicas realizadas, se puede determinar la presencia de *E. coli* utilizando una tabla de identificación bioquímica (Anexo III).



Esquema 1. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis por el método cuenta en placa, aislamiento e identificación de coliformes y técnica del número más probable (NMP). Rellene los espacios indicando la etapa correspondiente, tipo de dilución realizada y medios de cultivo empleados.

Cuestionario

1. ¿Por qué se cuentan entre 30 y 300 colonias en el método de cuenta total estándar y que otro método de cuantificación en placa de microorganismos existe?
2. Explique si las colonias observadas provienen de grupos de bacterias o de una sola célula ¿Qué significa el término de *Unidad Formadora de Colonia* (UFC)?
3. ¿Por qué las pipetas deben de cambiarse entre cada dilución?
4. ¿Cuáles son las características generales de los coliformes y cuál es su importancia como indicadores sanitarios?
5. ¿Cuál es el fundamento bioquímicos de los diferentes medios empleados en la práctica y cómo es el desarrollo típico de los coliformes en cada uno de ellos?
6. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método del número más probable frente al método de cuenta total estándar?
7. ¿Cuáles son los posibles errores que se podrían cometer en los métodos de cuenta estándar y en el método del número más probable que podrían afectar su precisión?
8. ¿Cuál es el límite permitido para mesófilos aerobios reportados en las NOM para el producto analizado?
9. ¿Se puede utilizar el método de cuenta total estándar de mesófilos aerobios para predecir la vida de anaquel del producto?

Práctica 2

Detección de *Salmonella* y *Shigella* en alimentos

Objetivo

Que el alumno conozca los métodos para determinar *Salmonella* y *Shigella* en alimentos utilizando medios selectivos y diferenciales así como pruebas de identificación bioquímica.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Como el nombre lo indica, *Enterobacteriaceae* comprende bacterias que proliferan en el intestino; varios géneros de esta familia contienen especies patógenas. Además de *Salmonella*, se incluyen especies patógenas transmitidas por los alimentos de los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Yersinia* (Yousef y Carlstrom, 2006).

Salmonella es una bacteria gram-negativa en forma de bacilo que posee flagelos. Las bacterias del género *Salmonella* son microorganismos anaerobios facultativos. Son oxidasa negativa, fermentan la glucosa y producen ácido y gas. Una de las características de este género es que la mayoría de los miembros no fermenta la lactosa ni la sacarosa (Méndes y col., 2006).

Shigella es un bacilo gram negativo perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, que se encuentra estrechamente relacionada con el género *Escherichia*, por sus propiedades bioquímicas, serológicas y por similitudes genéticas. Se caracteriza por no fermentar la lactosa, ser inmóvil, no produce lisina decarboxilasa y raramente produce gas a partir de hidratos de carbono. Su identificación se basa en características bioquímicas y antigénicas (Perilla y col., 2004).

Salmonella es una bacteria invasora que causa infecciones humanas, conocidas como salmonelosis. Puesto que el intestino es el hábitat natural de algunas variedades de *Salmonella*, los alimentos sin procesar de una fuente animal ocasionalmente albergan al patógeno. Por consiguiente, *Salmonella* se encuentra en productos derivados de aves de corral, incluidos pollo, huevo y pavo. De igual manera, mariscos, leche y ensaladas han estado implicados en brotes de salmonelosis. Sólo algunas especies de *Salmonella* son patógenas para los seres humanos, pero todas las salmonelas son inaceptables en alimentos listos para comer. Por tanto, el alimento se analiza para determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* (Centro de Control y Enfermedades, CDC).

Las distintas especies de *Shigella* constituyen la principal causa de disentería, diarrea caracterizada por eliminación frecuente de heces con pus, sangre y/o mucus. El ser humano es el único reservorio conocido de este agente. La mayoría de los casos ocurren en niños, en general transmitidos por contacto directo. Los brotes a gran escala, vinculados a alimentos, son más raros. A pesar de ello, constituye un importante problema de salud pública mundial, debido fundamentalmente a su elevada transmisibilidad, la emergencia de cepas resistentes a antimicrobianos y la falta de vacunas efectivas (Neglia y col., 2006).

Los métodos convencionales de detección de *Salmonella* y *Shigella* dependen de las características del cultivo. Estos métodos implican el preenriquecimiento y el enriquecimiento selectivo, seguidos de los pasos de aislamiento y las pruebas de identificación. Los pasos de enriquecimiento y aislamiento son técnicas principalmente de cultivo, en tanto que la identificación se basa en el análisis bioquímico (Yousef y Carlstrom, 2006, NOM-114-SSA1-1994).

Material y equipo

Por equipo	Por grupo
10 Pipetas de 1 ml	2 Balanzas granatarias
2 Pipetas de 10 ml	2 Balanzas analíticas
1 Probeta de 100 ml	2 Autoclaves con base, canastilla y válvula
15 Tubos de ensaye de 16x150 mm con tapón de baquelita	1 Incubadora
10 Cajas de Petri estériles desechables (100x15 mm)	1 Refrigerador
1 Cilindro para esterilizar pipetas	1 par de guantes de asbesto
1 Espátula	
1 Asa microbiológica	
1 Piceta con agua destilada	
1 Piceta con etanol	
2 Varillas de vidrio en ángulo	
1 Propipeta para volúmenes de 0.1 – 2.0 ml	
1 Propipeta para volúmenes de 5.0 – 10.0 ml	
1 Gradilla	
2 Mecheros Fisher	
1 Conexión T de vidrio con manguera de látex	
1 Parrilla de calentamiento con agitación magnética	
2 Agitadores magnéticos	
1 Motor para licuadora	
1 Mini vaso para licuadora con capacidad de 250 ml	
1 Cuenta-colonias	
1 Plumón rotulador indeleble (punto extra fino)	
1 Matraz de 500 ml	
1 Tijeras	
Cinta adhesiva (Masking tape)	

Medios de cultivo y reactivos

Peptona	Agar triple azúcar hierro (TSI)	Agar lisina descarboxilasa (LIA)
NaCl	Agar entérico de Hektoen (HE)	Agar sulfuro indol movilidad (SIM)
Agar verde brillante (BGA)	Agar citrato de Simmons (CS)	Agar sulfito de bismuto (SB)
Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)	Caldo Rapaport Vassiliadis (CRV)	Agar desoxicolato citrato (ADC)
Agar Salmonella-Shigella (ASS)	Agar hierro Kligler (AHK)	Agar Mac Conkey (AMC)
Agar lisina hierro (ALH)		

Procedimiento

Preenriquecimiento

- 1 Transferir asépticamente 25 ml o 25 g de la muestra a un matraz con 225 ml de agua peptonada. Licuar durante un minuto en caso necesario.
 - 1.1 Incubar a 35°C durante 24 h (Esquema 2).

Enriquecimiento

- 2 Transferir 0.1 ml del cultivo anterior a un tubo con 9.9 ml de caldo Rapaport Vassiliadis (sembrar 2 tubos).
 - 2.1 Incubar 24 h a 35°C.

Aislamiento

3. *Salmonella* y *Shigella*

3.3 Sembrar por estría simple 2 placas de:

- | | |
|----------|--|
| Agar BGA | Color del medio: rojo brillante.
<i>Para el aislamiento de Salmonella</i>
Incubar 24h a 35°C. |
| Agar ASS | Seleccionar colonias rosa a blanco y opacas.
Color del medio: rosa-anaranjado.
<i>Para el aislamiento de Salmonella</i>
Incubar 24h a 35°C.
Seleccionar colonias incoloras con centro negro.
<i>Para el aislamiento de Shigella</i>
Incubar 24 h a 35°C. |
| Agar XLD | Seleccionar colonias incoloras.
Color del medio: rojo.
<i>Para el aislamiento de Salmonella</i>
Incubar 24h a 35°C.
Seleccionar colonias rojas con centro negro.
<i>Para el aislamiento de Shigella</i>
Incubar 24 h a 35°C. |
| Agar AMC | Seleccionar colonias rojas o incoloras.
Color del medio: rojo-café.
<i>Para el aislamiento de Shigella</i>
Incubar 24h a 35°C.
Seleccionar colonias incoloras. |

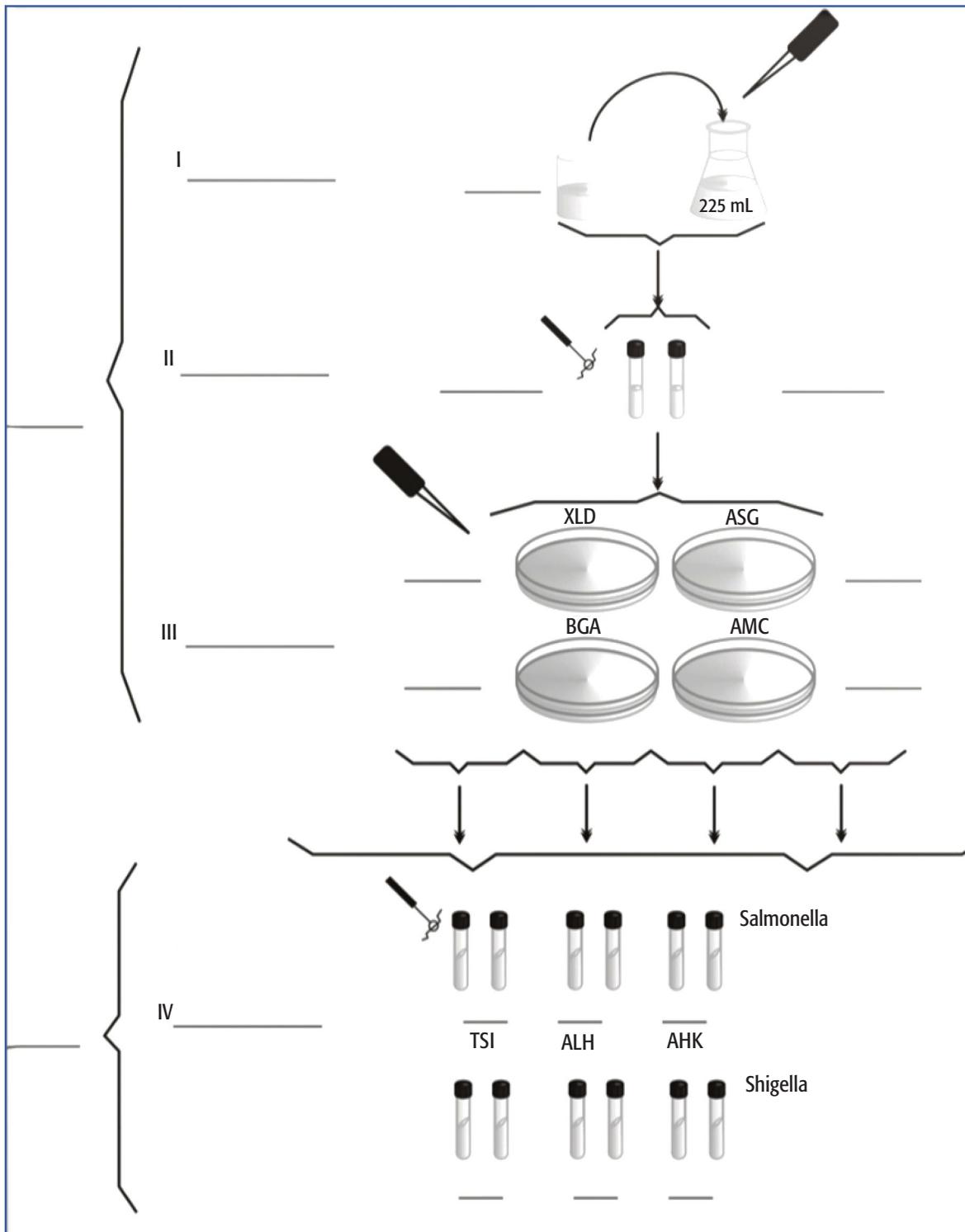
Salmonella

- 3 Sembrar por estría simple 2 placas de agar XLD y 2 placas de BGA.
 - 3.1 Invertir las cajas e incubar 24 h a 35°C.
 - 3.2 A partir del crecimiento en los medios anteriores, identificar una colonia característica de *Salmonella* (Anexo III)
Shigella
- 5 Sembrar por estría simple 2 placas de agar ASS, 2 placas de agar AMC y 2 placas de agar AHK.
- 6 Invertir las cajas e incubar 24 h a 35°C.
 - 6.1 A partir del crecimiento en los medios anteriores, identificar una colonia característica de *Shigella* (AnexoIV).

Identificación bioquímica

1. Seleccionar al menos dos colonias típicas sospechosas que se encuentren bien aisladas en cada placa.
 - 1.1 Transferir con el asa una porción de las colonias seleccionadas a la siguiente serie de tubos que contiene los diferentes medios (Yousef y Carlstrom, 2006; Perilla y col., 2003):

Agar TSI	Incubar 24 h a 35°C Para la identificación de <i>Salmonella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio roja, fondo del medio amarillo. Prueba negativa: no hay cambio de color en el medio. Para la identificación de <i>Shigella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio roja, fondo del medio amarillo. Prueba negativa: no hay cambio en el color del medio.
Agar ALH	Incubar 24 h a 35°C Para la identificación de <i>Salmonella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio púrpura, fondo del medio púrpura. Para la identificación de <i>Shigella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio púrpura, fondo del medio amarillo. Prueba negativa: no hay cambio de color en el medio.
AGAR AHK	Incubar 24 h a 35°C Para la identificación de <i>Salmonella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio roja, fondo del medio amarillo. Prueba negativa: no hay cambio de color en el medio. Para la identificación de <i>Shigella</i> Sembrar por picadura en el fondo y por estría en la superficie. Prueba positiva: superficie del medio roja, fondo del medio amarillo. Prueba negativa: no hay cambio de color en el medio.



Esquema 2. Preparación y dilución de muestras de alimentos para la detección de *Salmonella* y *Shigella*. Rellene los espacios indicando la etapa correspondiente.

Cuestionario

- 1 ¿Cuál es el fundamento bioquímico de los diferentes medios empleados en la práctica? Indique cómo es el desarrollo típico de *Salmonella* y *Shigella* en cada uno de ellos.
- 2 ¿Porqué es importante detectar la presencia de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp. en los alimentos?
- 3 Indique las características generales de *Salmonella* y *Shigella*.
- 4 ¿Qué condiciones promueven el crecimiento de *Salmonella* y *Shigella* en alimentos y cómo se puede retardar su crecimiento?
- 5 Mencione 3 ejemplos diferentes de enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados por Enterobacterias.

Practica 3

Determinación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* en alimentos

Objetivo

Que el alumno conozca las técnicas más comunes de identificación y cuantificación de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* presentes en los alimentos.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

El género *Staphylococcus* se describe como Gram (+) que crece aisladamente, en parejas, en tétradas o agrupaciones irregulares parecidas a racimos de uvas. Los *Staphylococcus* se encuentran en las fosas nasales, la piel y en lesiones de humanos y otros mamíferos. Su determinación se utiliza como componente de los criterios microbiológicos para alimentos cocidos, para productos que son sometidos a manipulación excesiva durante su preparación o después del proceso térmico. Cuando los alimentos se someten al proceso térmico y muestran altos recuentos de *Staphylococcus* generalmente se debe a que la contaminación proviene de la posterior manipulación, contacto con equipo o aire contaminado y/o conservación inadecuada del mismo. Este género comprende varias especies dentro de las cuales están *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*. Un número elevado de estos microorganismos puede indicar la presencia de toxinas termoestables, no obstante, un recuento bajo no significa ausencia de las mismas ya que una población numerosa pudo haberse reducido a un número más pequeño debido a una etapa del proceso, por ejemplo, calentamiento o fermentación. El crecimiento de *S. aureus* en alimentos tiene gran importancia por tratarse de un microorganismo capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa severas intoxicaciones alimentarias.

El género *Streptococcus* comprende una gran variedad de especies con hábitats muy diferentes, cuyas actividades tienen considerable importancia práctica para la especie humana. Son cocos Gram (+), anaerobios facultativos, asociados en parejas o cadenas, que no producen catalasa y fermentan la glucosa con producción de ácido láctico. Los *Streptococcus* se pueden clasificar en grupos de Lancefield mediante letras mayúsculas (A, B, C, etc.) sin embargo los que tienen importancia en los alimentos se incluyen en cuatro grupos: piógeno, viridans, láctico y el grupo enterococo (Frazier y Westhoff, 2003).

El recuento de *Staphylococcus* y *Streptococcus* en los alimentos se realiza con medios selectivos (NOM-115-SSA1-1994).

Material y equipo

Por equipo	Por grupo
10 Pipetas de 1 mL	2 Balanzas granatarias
2 Pipetas de 10 mL	2 Balanzas analíticas
13 Tubos de ensaye con tapón de baquelita (16x150 mm)	2 Autoclaves con base, canastilla y válvula
4 Tubos de ensaye con tapón de baquelita (10x100 mm)	1 Incubadora
12 Cajas petri de vidrio o desechables estériles de 100x15 mm	1 Refrigerador
1 Cilindro para esterilizar pipetas	2 Matraces Erlenmeyer de 1000 ml
1 Espátula	2 Matraces Erlenmeyer de 500 ml
1 Asa microbiológica	1 Separador de Yemas
1 Piceta con agua destilada	2 Probetas de 500 ml
1 Piceta con etanol	1 Probeta de 25 ml
2 Varillas de vidrio en ángulo	
10 Portaobjetos	
10 Cubreobjetos	
1 Vidrio de reloj	
1 Propipeta para volúmenes de 0.1 – 2.0 ml	
1 Propipeta para volúmenes de 5.0 – 10.0 ml	
1 Gradilla	
2 Mecheros Fisher	
1 Conexión T de vidrio con manguera de látex	
1 Parrilla de calentamiento con agitación magnética	
2 Agitadores magnéticos	
1 Motor para licuadora	
1 Mini vaso para licuadora con capacidad de 250 ml	
1 Microscopio óptico	
1 Cuenta-colonias	
1 Plumón rotulador indeleble (punto extra fino)	
1 Tijeras	
Cinta adhesiva (Masking tape)	

Medios de cultivo y reactivos

Agar KF para enterococos (AKF)	Etanol
Agar Baird Parker (ABP)	NaOH
Caldo de microinoculación (CMI)	Reactivos Gram (Anexo IV)
Plasma de conejo liofilizado	Aceite de inmersión
2 Huevos frescos de gallina	Agua destilada
Peróxido de hidrogeno al 30%	NaCl
2, 3, 5 cloruro de trifetil tetrazolium (TTC)	Xileno
Telurito de potasio	

Procedimiento

1 Preparación de la muestra: Diluciones

- 1.1 Seguir el procedimiento descrito en la práctica No. 1 (Esquema 1).

Cuenta total de *Staphylococcus*

2 Inoculación por la técnica de extensión superficial en placa

- 2.1 Inocular 0.1 ml de las diluciones seleccionadas en placas de agar Baird Parker, extendiendo homogéneamente sobre la superficie con la varilla de vidrio en ángulo recto previamente esterilizada (desinfectar con alcohol, flamear y enfriar)
- 2.2 Incubar a 37°C de 24 a 48 h hasta obtener un número de colonias aisladas entre 150 y 300.

Interpretación de los resultados

- 3 Completado el tiempo de incubación, seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias aisladas (NOM-115-SSA1-1994)
 - 3.1 Contar y marcar las colonias típicas: centro negro circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 a 2 mm y muestran una zona opaca y un halo claro alrededor de la colonia sospechosas de ser *Staphylococcus coagulasa* positiva (Anexo III).
 - 3.2 Considerando las colonias sospechosas de pertenecer al género *Staphylococcus*, determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml o g siguiendo la metodología descrita en la práctica No.1.

Pruebas confirmativas para determinar la presencia de *Staphylococcus*

Tinción Gram

- 4 A partir de 2-3 colonias sospechosas, preparar frotis y realizar tinción de Gram (Anexo V).
 - 4.1 Observar al microscopio para confirmar morfología y Gram característicos de *Staphylococcus*.

Prueba de Coagulasa

- 5 En un tubo de ensaye previamente esterilizado, colocar 0.5 ml de plasma rehidratado e inocular por asada a partir de la colonia con características de morfología colonial y al microscopio típicas del genero de *Staphylococcus*.
 - 5.1 Incubar a 37°C durante 24 h
 - 5.2 Observar si hay coagulación a las tres horas de iniciada la prueba.
 - 5.3 Interpretación de resultados
 - 5.4 Al finalizar el tiempo de incubación (24 h) reportar si se observa formación de coágulo
Ensayo Negativo: No hay coagulación en la muestra.
Ensayo Positivo: Existe coagulación

Cuenta total de *Streptococcus*

- 8 Inocular 0.1 ml de cada dilución en placas de agar KF, extendiendo homogéneamente sobre la superficie con la varilla de vidrio angulada previamente esterilizada (desinfectar con alcohol, flamear y enfriar) (Esquema 3).
 - 8.1 Incubar a 37°C de 24 a 48 h.
 - 8.2 Interpretación de los resultados
 - 8.3 Completado el tiempo de incubación, seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias aisladas.
 - 8.4 Contar y marcar todas aquellas que presenten coloración roja (sospechosas de ser *Streptococcus*) (Anexo IV).
 - 8.5 Considerando las colonias sospechosas de pertenecer al género *Streptococcus*, determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml o g siguiendo la metodología descrita en el Anexo I

Pruebas confirmativas para determinar la presencia de *Streptococcus*

- 9 A partir de una colonia marcada como sospechosa, preparar un frotis y realizar tinción de Gram
 - 9.1 Observar al microscopio para confirmar morfología al microscopio y Gram característicos

Prueba de Catalasa

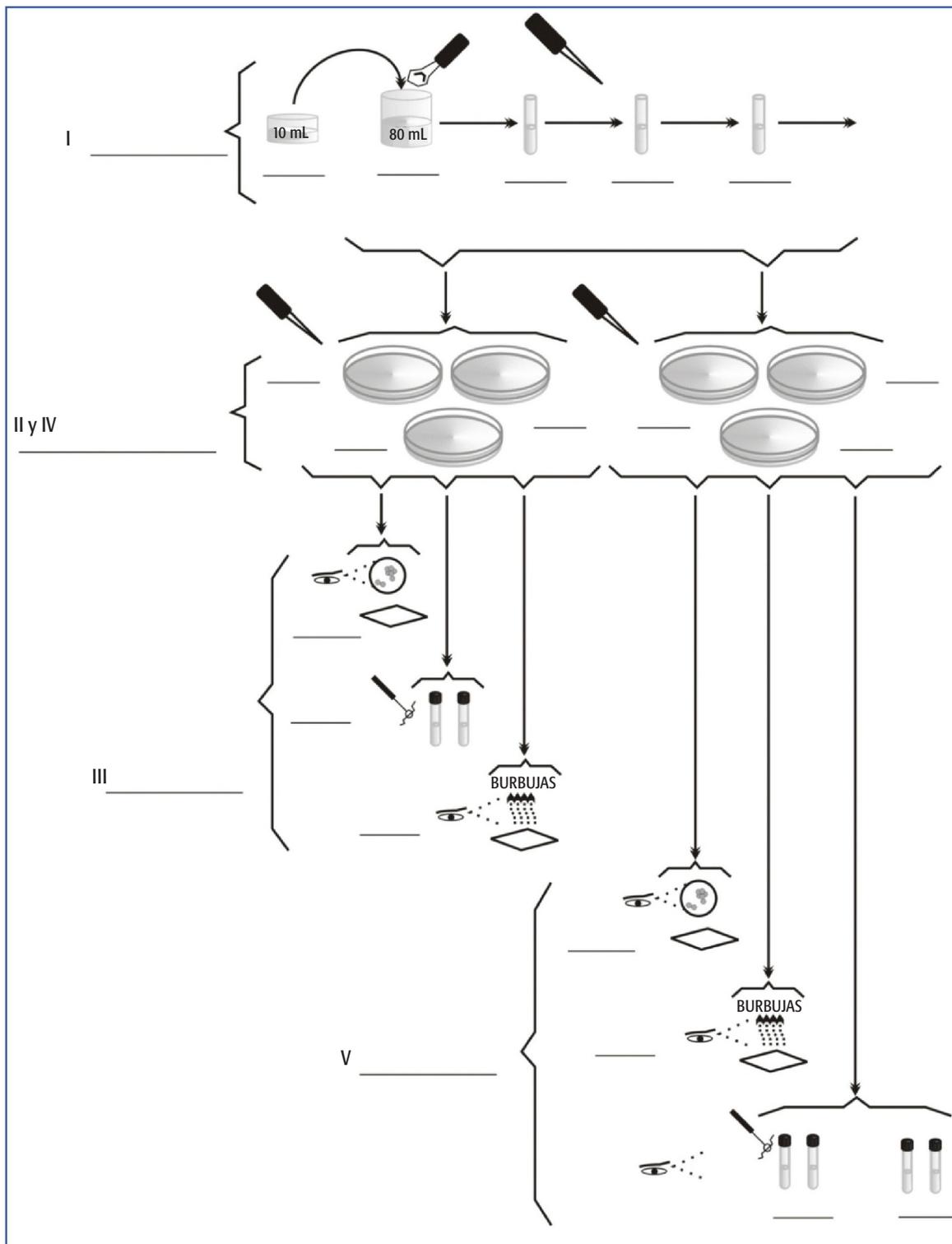
- 10 A partir de una colonia con características de morfología colonial y al microscopio. Tomar una asada y suspenderla en un portaobjetos con una gota de agua estéril.
 - 10.1 Poner unas gotas de la solución de agua oxigenada al 30% sobre la muestra.
 - 10.2 Interpretación de resultados
 - Prueba positiva: Formación de burbuja
 - Prueba negativa: No hay formación de burbujas

Crecimiento en medio con NaCl al 6.5%

- 11 De la misma colonia seleccionada para la prueba de catalasa, inocular por asada un tubo de ensayo que contenga 10 mL del CMI adicionado con 6.5% de NaCl.
 - 11.1 Incubar a 37°C durante 72 h
 - 11.2 Interpretación de resultados
 - Prueba positiva: Si hay desarrollo
 - Prueba negativa: No hay desarrollo

Crecimiento en medio a pH de 9.6.

- 12 De la misma colonia seleccionada para la prueba de catalasa, inocular por asada un tubo de ensayo que contenga 10 ml del CMI a pH de 9.6.
 - 12.1 Incubar a 45°C por 48 h
 - 12.2 Interpretación de resultados
 - Prueba positiva: Si hay desarrollo
 - Prueba negativa: No hay desarrollo



Esquema 3. Preparación y dilución de muestra para la determinación de *Staphylococcus* y *Streptococcus* en alimentos. Rellene los espacios indicando las etapas correspondientes.

Cuestionario

- 1 ¿Qué tipo de alimentos son altamente sospechosos de contener cuentas altas de *Staphylococcus* y *Streptococcus*?
- 2 ¿Cuáles son los principales riesgos sanitarios de la contaminación por *Staphylococcus* y *Streptococcus* en alimentos?
- 3 ¿Cuáles son las medidas preventivas y de control para evitar la presencia *Staphylococcus* y *Streptococcus* de en alimentos?
- 4 Proponga una metodología alterna para la detección de *Staphylococcus* y *Streptococcus* en alimentos.

Práctica 4

Efecto de los conservadores químicos en los microorganismos que contaminan a los alimentos

Objetivo

Que el alumno evalúe el efecto inhibitor de los conservadores en determinados grupos microbianos.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

Un aditivo es una sustancia pura o en mezcla distinta a la materia prima básica del alimento. Los aditivos que se añaden para evitar que se alteren o contaminen se denominan conservadores químicos. Los conservadores pueden inhibir a los microorganismos al dañar su membrana celular o por obstaculizar la actividad enzimática o mecanismos genéticos. Se emplean otros conservadores como antioxidantes, estabilizadores, para dar consistencia, así como recubrimientos para evitar que pierdan agua, impidan reacciones microbianas, enzimáticas y químicas indeseables (Frazier 2003). Si bien se ha descrito un gran número de compuestos químicos que son capaces de actuar como conservadores, en los alimentos sólo está permitido un número relativamente bajo de los mismos debido a las estrictas normas de seguridad por organismos como la Food and Drug Administration de los EUA (FDA). Ejemplos de conservadores considerados inocuos (GRAS) son ácido propiónico/propionatos, ácido sórbico/sorbatos, ácido benzoico/benzoatos, parabenos, sulfitos/dióxido de azufre, óxidos de etileno/propileno, diacetato sódico, nisina, ácido dehidroacético, nitrito de sodio, ácido caprílico, formiato de etilo (Jay, 2002).

Los factores que influyen en la eficacia de los conservadores químicos son: i) la concentración de la sustancia química, ii) especie, número y edad del cultivo, iii) antecedentes de los microorganismos, iv) temperatura, v) propiedades químicas y físicas del sustrato (humedad, pH, tipo y concentración de solutos, tensión superficial, existencia de coloides y presencia de sustancias protectoras) (Frazier, 2003).

Material y equipo

Por equipo	Por grupo
2 Espátulas	3 Parrillas de calentamiento y agitación.
1 Probeta 100 ml	2 Balanzas granataria
2 Agitadores magnéticos	1 Balanza analítica
2 Matracas Erlenmeyer de 250 ml.	2 Autoclaves con base, canastilla y válvula
1 Vaso de precipitados 50 ml.	1 Incubadora
4 Pipetas de 1ml con graduación de 0.1 ml.	1 Refrigerador
1 Pipeta 10 ml	2 Pares de guantes de asbesto
1 Cilindro para esterilizar pipetas	Escobillones, fibra, detergente y toallas de papel
12 Cajas petri de vidrio de 100x15 mm o desechables	Papel de seda, papel estraza, algodón y gasa
5 Tubos de cultivo con tapón de rosca de 16x150 mm	
1 Piceta con agua destilada	
1 Asa de siembra	
Portaobjetos y cubreobjetos	
1 Propipeta	
1 Vidrio de reloj	
1 Gradilla	
2 Mecheros Fisher	
1 Microscopio de disección	
1 Microscopio óptico	
1 Cuenta-colonias	
1 Plumón rotulador indeleble	
1 Tijeras	
Cinta adhesiva protectora (Masking tape)	

Medios de cultivo y reactivos

Agar papa dextrosa	Nitrito de sodio
Agar de infusión cerebro-corazón	Sorbato de potasio
Agar dextrosa Sabouraud	Sulfito de potasio
Agar APT (All Purpose Tween 80)	Aceite de inmersión
Cloruro de sodio	Agua destilada
Benzoato de sodio	Etanol
Ácido tartárico	

Procedimiento.

- 1 Preparación de la muestra: El profesor proporcionará cultivos puros de microorganismos. A cada equipo le corresponderá trabajar con un cultivo puro. Todos los tubos y cajas deberán etiquetarse e inocularse con un cultivo puro de acuerdo a las instrucciones que se presentan en la tabla 1.
 - 1.1 *Dilución primaria*: Tomar muestras de cada uno de los microorganismos puros y transferirlos asépticamente a tubos que contengan 10 ml de solución salina estéril (0.9 % p/v) y agitar vigorosamente para homogenizar la muestra. Esta dilución corresponderá a 10^{-1}
 - 1.2 *Diluciones decimales*: Se prepararán diluciones decimales 10^{-3} y 10^{-4} (siguiendo el procedimiento explicado en la Práctica No. 1 (Esquema No. 3))
- 2 Inocular 0.1 ml de cada dilución en placas con el agar correspondiente que se presenta en la tabla 1, extendiendo sobre la superficie con una varilla doblada estéril (perfectamente limpia, desinfectada con alcohol y flameada; dejar enfriar). Se inocularán 6 placas con agar con conservador (tratamiento). Se inocularán también 6 placas de los medios de cultivo sin conservadores (control) con las mismas diluciones (Esquema 6).
 - 2.1 Incubar a 30°C por 24 a 48 h y hasta 120 h.

Nota: No debe eliminarse el ácido tartárico en la preparación de los medios de microinoculación y de papa dextrosa. El ácido tartárico y el sulfito deben esterilizarse por filtración y adicionar a los medios de cultivo previamente esterilizados.

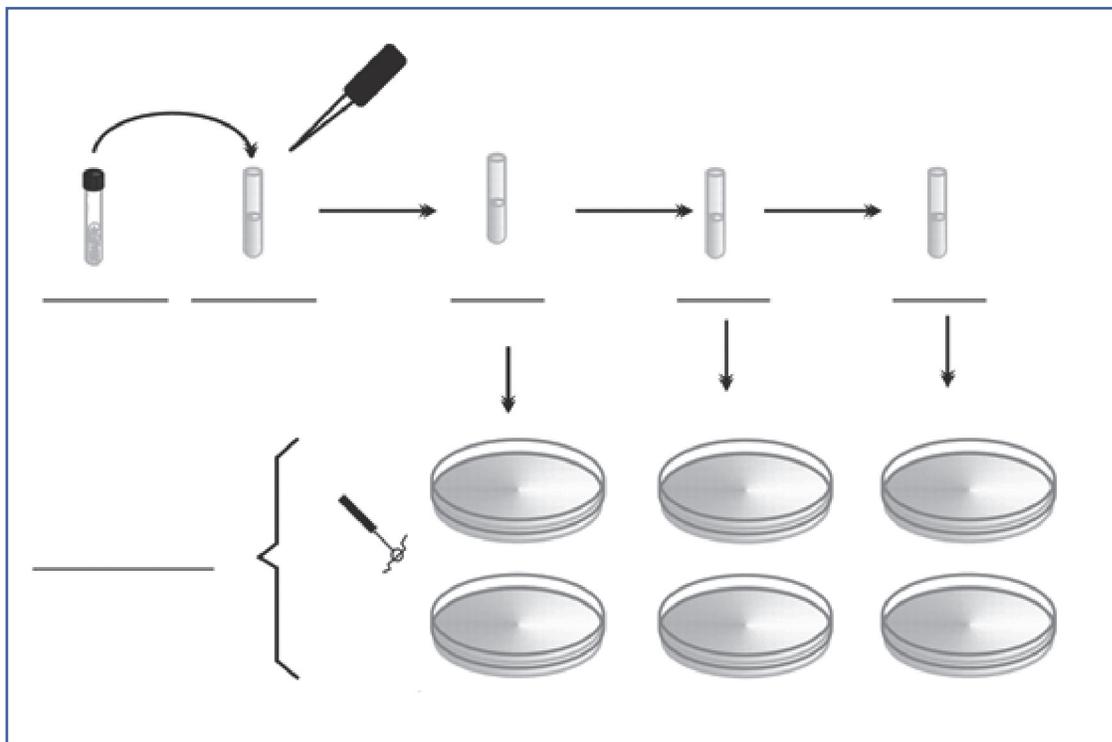
- 3 Interpretación de los resultados
 - 3.1 Completada la incubación seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias.
 - 3.2 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas. Determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml siguiendo la metodología descrita en la Práctica No. 1.
 - 3.3 Redondear la cantidad a dos cifras. Considerar las reglas de cuenta de colonias (Anexo I).
 - 3.4 Comparar las cuentas microbianas de las placas con y sin conservadores y se calcula el % de inhibición de acuerdo a la ecuación 1, considerando a las cuentas en los medios sin conservador como el 100% para cada microorganismo.

$$\% I = \frac{C - T}{C} \times 100 \quad (1)$$

Donde C y T son unidades formadoras de colonia (UFC) por ml en el control y en el medio con conservadores, respectivamente.

Tabla 1. Distribución de medios de cultivo, conservadores y cultivos puros por equipo

Equipo	Medios de cultivo	Microorganismo
1	Agar APT con 0.3% (p/v) de benzoato de potasio 0.14% (p/v) de sulfito de sodio.	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
2	Agar infusión cerebro-corazón, con 0.14% (p/v) de ácido tartárico	<i>Bacillus subtilis</i>
3	Agar dextrosa-Sabouraud, con 0.02% (p/v) de sulfito de sodio.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
4	Agar infusión cerebro-corazón con 0.02% (p/v) de nitrito de sodio y 3% (p/v) de cloruro de sodio.	<i>Bacillus subtilis</i>
5	Agar papa dextrosa, con 0.14% (p/v) de ácido tartárico y 0.3% (p/v) de benzoato de potasio	<i>Aspergillus niger</i>



Esquema 6. Preparación y dilución de cultivos puros en medios de cultivo con conservadores para determinar el porcentaje de inhibición. Rellene los espacios indicando la etapa correspondiente y tipo de dilución realizada.

Cuestionario

- 1 ¿Qué es un conservador?
- 2 ¿Qué características deben presentar los conservadores utilizados en alimentos?
- 3 Presentar una tabla en donde incluya los principales conservadores, los microorganismos que afectan y en qué alimentos es común su uso, así como su concentración máxima permitida.
- 4 Explicar el efecto de los siguientes conservadores en el alimento: cloruro de sodio, nitrito de sodio, benzoato de sodio, sorbato de sodio o de potasio azúcares, ácido láctico.

Practica 5

Determinación del Tiempo de Destrucción Térmica (TDT) y del Punto de Muerte Térmica (PMT) en microorganismos

Objetivo

Que el alumno aplique un método que le permita conocer el tiempo y la temperatura mínimos necesarios para eliminar a los microorganismos presentes en una suspensión.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

Los microorganismos pueden ser eliminados parcial o totalmente por tratamiento térmico; el tiempo y la temperatura aplicados para obtener el resultado deseado, son dependientes del tipo y número de microorganismos.

El tiempo de destrucción térmica (TDT) es el tiempo necesario para destruir un número dado de microorganismos a una temperatura determinada. Mediante este método, la temperatura se mantiene constante y se determina el tiempo necesario para destruir todas las células microbianas. El punto de muerte térmica (PMT), es la temperatura necesaria para destruir un número dado de microorganismos en un tiempo determinado, generalmente 10 minutos.

En general, la termorresistencia de los microorganismos está relacionada con su temperatura óptima de crecimiento. Los microorganismos psicrófilos son los más termosensibles. Las bacterias esporógenas son las más termorresistentes. Respecto a la reacción de Gram, las bacterias gram (+) tienden a ser más resistentes, especialmente los cocos. Las levaduras y los mohos tienden a ser medianamente sensibles al calor.

Existen diversos factores que influyen en la termorresistencia de los microorganismos:

- 1 Agua. La termorresistencia de las células microbianas aumenta al disminuir el contenido de agua o la humedad de un alimento.
- 2 Grasa. En presencia de grasa hay un aumento general de la termorresistencia de algunos microorganismos.
- 3 Sales. La influencia de las sales en la termorresistencia de los microorganismos es variable y depende de la clase de sal así como de la concentración empleada, entre otros factores.
- 4 Carbohidratos. La presencia de azúcares en el alimento con el que se realiza la suspensión origina un aumento en la termorresistencia de los microorganismos.
- 5 pH. Los microorganismos son más resistentes al calor a su pH óptimo de crecimiento.
- 6 Proteínas y otras sustancias. Durante el calentamiento del alimento las proteínas del mismo tienen un efecto protector de los microorganismos.
- 7 Número de microorganismos. A mayor es el número de microorganismos, mayor es el grado de termorresistencia.

- 8 Edad de los microorganismos. Las células bacterianas tienden a ser más resistentes al calor mientras se encuentran en la fase estacionaria de crecimiento y menos resistentes durante la fase logarítmica.
- 9 Sustancias inhibitorias. Cuando el calentamiento tiene lugar en presencia de antibióticos, de SO₂ y de otros inhibidores microbianos, la termorresistencia de la mayoría de los microorganismos disminuye.

Material y equipo

Por equipo	Por grupo
44 Tubos con tapón de rosca de 16x150 mm	1 Probeta de 1 l
2 Mecheros Fisher	1 Mechero Fisher
8 Pipetas de 1 ml	1 Recipiente para hervir agua
8 Cajas petri de vidrio o desechables (estériles) de 100x15 mm	1 Soporte universal
1 Asa microbiológica	3 Baños con temperatura controlada
Cinta adhesiva (Masking tape)	Agua destilada
2 Gradillas	2 Vasos de precipitados de 1 l
1 Cilindro para esterilizar pipetas	2 Agitadores magnéticos
1 Piceta con agua destilada	1 Espátula
1 Piceta con etanol	Tela de asbesto
1 Propipeta para volúmenes de 0.1 – 2.0 ml	3 Termómetros
1 Propipeta para volúmenes de 5.0 – 10.0 ml	2 Matraces Erlenmeyer 1l
1 Conexión T de vidrio con manguera de latex	
1 Plumón rotulador indeleble	
1 Tijeras	
Cronometro	

Medios de cultivo y reactivos

Agar nutritivo (AN)	<i>Pseudomonas fragi</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Caldo nutritivo (CN)	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>

Procedimiento

Punto de Muerte Térmica (PMT)

Preparación de los microorganismos

1. Partir del cultivo inicial de 24 h en caldo nutritivo de *P. fragi*, *E.coli*, *B. subtilis* y *L. bulgaricus*.
 - 1.3 Preparar 5 tubos estériles con 5 ml de caldo nutritivo para cada uno de los microorganismos (20 tubos en total).
 - 1.4 Colocar 0.1 ml de uno de los cultivos en cada uno de los 5 tubos rotulados y previamente precalentados a la temperatura a la cual se hará la prueba con el caldo nutritivo a cada temperatura a evaluar.
 - 1.5 Reservar los cultivos iniciales en refrigeración hasta su uso como control de los tratamientos. Repetir el procedimiento 1.4 para los otros tres microorganismos. Utilizar una pipeta estéril para cada cultivo.

2 Determinación del punto de muerte térmica

- 2.1 Dejar cada tubo de la suspensión de cada cultivo en baño maría con las temperaturas establecidas durante 15 min: 55°, 65°, 75°C y ebullición.
- 2.2 Someter un tubo de cada del cultivo a esterilización en autoclave a 121 lb/in² durante 15 min.
- 2.3 Una vez transcurrido el tiempo de cada tratamiento, colocar los tubos en agua fría con hielo.

3 Determinación de sobrevivencia

- 3.1 Tomar una placa y dividirla en 6 partes iguales con la ayuda de un marcador indeleble: una para el cultivo testigo y 5 para las temperaturas probadas. Con la ayuda de un asa, aplicar la muestra por estría simple. Inocular la primera sección con el cultivo original, reservado en el refrigerador. Cada uno de los cultivos restantes será inoculado sobre la sección correspondiente de la placa, en condiciones estériles.
- 3.2 Repetir el procedimiento para cada cultivo.
- 3.3 Incubar las placas invertidas a 37°C por 24 h
- 3.4 Transcurrido el tiempo de incubación, examinar las secciones de la placa y compararla con el testigo.
- 3.5 Observar y anotar cuidadosamente los resultados para poder establecer en que temperaturas se ubica el PMT para cada uno de los microorganismos probados.

Tabla 1. Resultados del experimento del Punto de Muerte Térmica (PMT)

Cepas	Testigo*	55°C	65°C	75°C	ebullición	Esterilización**
<i>E. coli</i>						
<i>L. bulgáricus</i>						
<i>B. subtilis</i>						
<i>P. fragi</i>						

*Cultivo sin tratamiento. ** Calentamiento en autoclave por 15 min.

Tiempo de Destrucción Térmica (TDT)

4 Preparación de los microorganismos

- 4.1 Partir de un cultivo en caldo nutritivo de los diferentes microorganismos con 24 h de incubación incubados a su temperatura óptima de crecimiento.
- 4.2 Preparar 4 tubos estériles con 5 ml de caldo nutritivo para cada uno de los cultivos (16 tubos en total) y colocarlos 5 min. a 75°C.
- 4.3 Colocar 0.1 ml de uno de los cultivos en cada uno de los cuatro tubos con el caldo nutritivo, etiquetados con los tiempos de incubación: 0, 10, 20, 30 min. Reservar cultivos en refrigeración hasta su uso en el control de los tratamientos. Repetir el procedimiento para los otros tres microorganismos. Utilizar una pipeta estéril para cada cultivo.

5 Determinación del punto de muerte térmica

- 5.1 Dejar los tubos en baño maría a 75°C durante cada uno de los tiempos estipulados.
- 5.2 Una vez transcurrido el tiempo, sacar los tubos y colocarlos en agua fría (con hielo).

6 Determinación de sobrevivencia

- 6.1 Probar la sobrevivencia de las bacterias sobre placas de agar nutritivo. Para ello tomar una placa y dividirla en 4 partes iguales, con la ayuda de un marcador indeleble: una para el testigo y 3 para los tiempos probadas. Con la ayuda de un asa, aplicar la muestra por estría simple.
- 6.2 La primera sección se inocula con el cultivo original, el cual no ha sido expuesto a elevadas temperaturas. Cada uno de los cultivos restantes serán inoculados sobre la sección correspondiente de la placa en condiciones estériles.
- 6.3 Repetir el procedimiento para cada cultivo.

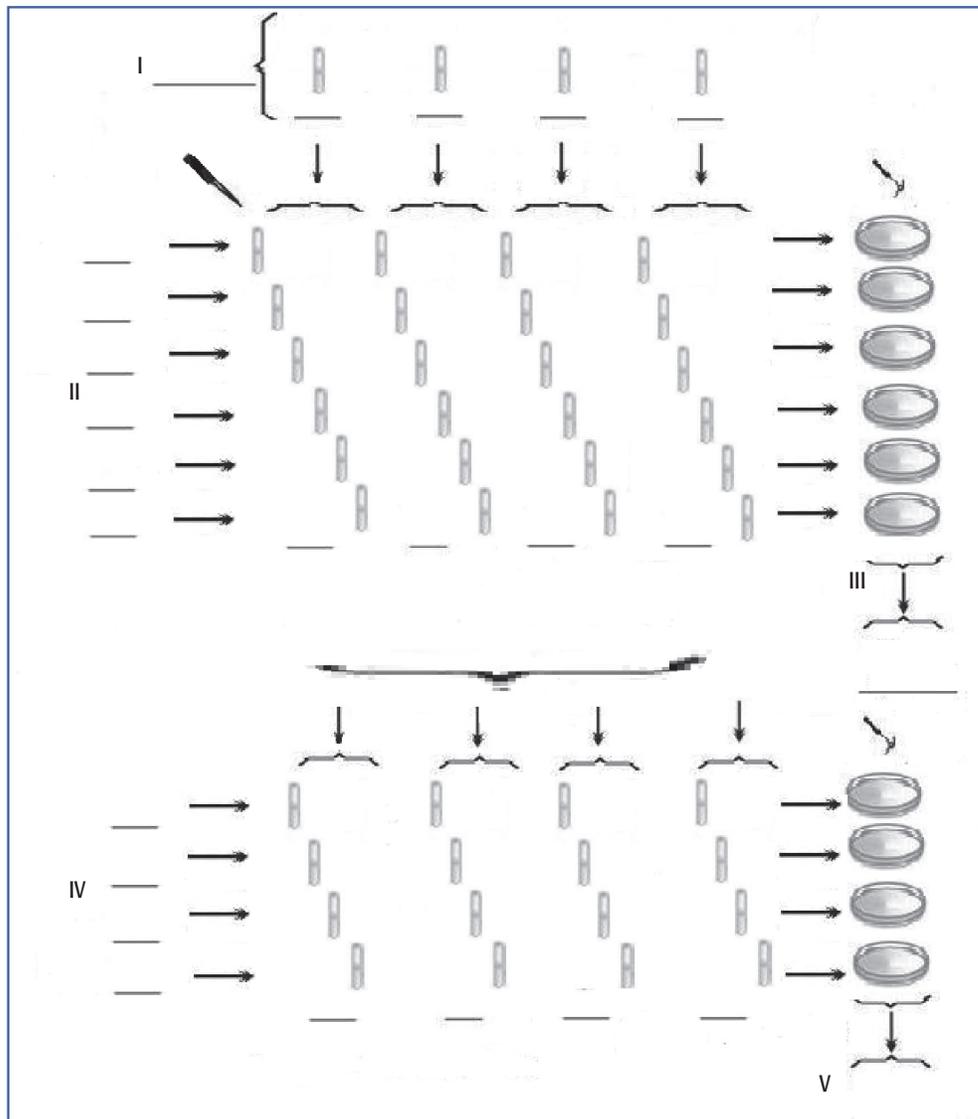
6.4 Incubar las placas invertidas a 37°C por 24 h

6.5 Una vez transcurrido el tiempo de incubación, examinar las placas. Las bacterias presentes en la placa indican la sobrevivencia comparadas al control no expuesto. Observar cuidadosamente los resultados para poder establecer en qué tiempo se ubica el TDT para cada uno de los microorganismos probados.

Tabla 2. Resultados del experimento del Tiempo de Destrucción Térmica (TDT)

Cepas	Testigo*	10 min	20 min	30 min
<i>E. coli</i>				
<i>L. bulgáricus</i>				
<i>B. subtilis</i>				
<i>P. fragi</i>				

*Cultivo sin tratamiento`



Esquema 7. Preparación de los tubos con los microorganismos para la determinación de Punto de Muerte Térmica (PMT) y el Tiempo de Destrucción Térmica (TDT). Rellenar los espacios con la etapa correspondiente.

Cuestionario

- 1 ¿Por qué son más sensibles las bacterias psicrófilas al tratamiento térmico?
- 2 ¿Explique por qué las bacterias Gram (+) son más resistentes al tratamiento térmico?
- 3 ¿Cuál es el componente de los microorganismos que se ve mayormente afectado por el tratamiento térmico?
- 4 ¿A qué temperatura se encontró el PMT del microorganismo más resistente probado en la práctica y explique por qué se obtuvo este resultado?
- 5 ¿A qué tiempo se encontró el TDT en la bacteria más resistente y explique a qué se debe este resultado?
- 6 ¿Cómo se define el tiempo de reducción decimal?
- 7 En una curva de la tasa de crecimiento de un microorganismo en función de la temperatura, se distinguen tres puntos importantes conocidos como temperaturas cardinales, ¿a qué se refieren estas temperaturas?

Práctica 6

Determinación del coeficiente fenólico

Objetivo

Que el alumno evalúe la actividad desinfectante de los agentes comúnmente utilizados en la industria de alimentos mediante la determinación del coeficiente fenólico.

Objetivos particulares propuestos por el alumno

- 1.
- 2.
- 3.

Introducción

La contaminación debida al ambiente durante la elaboración de alimentos tiene un impacto directo sobre la salud pública y la calidad del producto. El ambiente en la industria alimentaria (con materias primas y procesadas) rige el número y el tipo de microorganismos presente en los productos terminados. El uso de procedimientos de muestreo apropiados permite descubrir la magnitud y el tipo de contaminación dentro y fuera de la industria. El muestreo microbiológico nos permite una evaluación objetiva de los desinfectantes y las prácticas de sanidad utilizados en elaboración de los alimentos (Gaitan, 2004).

Los desinfectantes son antimicrobianos que son utilizados principalmente en superficies inanimadas (pisos, paredes, mostradores) para eliminar bacterias infecciosas, hongos y virus (Gaitan, 2004).

La determinación de la actividad desinfectante de un determinado agente es necesaria para conocer su posible eficacia. El método primario que se viene empleando desde hace muchos años consiste en comparar la potencia del compuesto a ensayar con la de un desinfectante tipo o estándar, que por motivos históricos es el fenol (Iañez, 2004).

El término “coeficiente fenólico” es la cifra que indica la eficiencia bactericida de compuestos similares al fenol contra *Bacillus typhosus* en comparación con el poder bactericida del fenol puro contra el mismo organismo de prueba bajo condiciones específicas (Reddish, 1937).

La determinación del coeficiente fenólico se desarrolló en Inglaterra hace más de 100 años y se emplea prácticamente en todos los países para probar la actividad bactericida de los desinfectantes. Aunque fue diseñada especialmente para probar desinfectantes, la prueba del coeficiente fenólico es empleada para tres propósitos: (a) para probar la eficiencia bactericida de los desinfectantes, (b) para determinar los valores bactericidas de compuestos químicos puros, y (c) para estimar el valor de los antisépticos (Reddish, 1937).

En la actualidad, la Administración Federal de Alimentos y Medicamentos (FDA) emplea una prueba oficial para desinfectantes en condiciones normalizadas, con una serie de cepas bacterianas concretas cuya susceptibilidad al fenol se conoce exactamente:

Una cepa de *Salmonella typhimurium*

Una cepa de *Staphylococcus aureus*

Una cepa de *Pseudomonas aureoginosa*

Material y equipo

Por equipo	Por grupo
2 Mecheros Fischer	1 Autoclave
1 Gradilla para tubos	1 Incubadora
11 Tubos de vidrio 20x150 mm con tapón de rosca	Papel seda
1 Probeta de 100 mL	Algodón
1 Barra de agitación magnética	Gasa
1 Vaso de precipitados de 50 ml	120 cajas de Petri estériles desechables
1 Espátula	4 Matraces de 250 ml
1 Parrilla de agitación con calentamiento	1 Probeta de 50 ml
1 Propipeta	1 Vaso de precipitados de 20 ml
1 Cilindro para esterilizar pipetas	
10 Pipetas de 1 ml con graduación de 0.1 ml	
10 Pipetas de 10 ml	
1 Baño de temperatura controlada	
1 Espectrofotómetro	
2 Celdas para espectrofotómetro	
1 Piceta con agua destilada	
1 Piceta con alcohol	

Medios de cultivo y reactivos

Caldo nutritivo (CN)	Caldo papa dextrosa (PDB)	Agar cerebro y corazón
Caldo infusión cerebro corazón (BHI)	Agar nutritivo (AN)	Peróxido de hidrógeno
Caldo Luria (CL)	Agar Luria (AL)	Sales cuaternarias de amonio
Agar papa dextrosa (PDA)	Fenol	Cloruro de benzalconio
Peptona	Hipoclorito de sodio	Glutaraldehído

Procedimiento

Crecimiento de los microorganismos

1 Elaboración de medios de cultivo

- 1.1 Preparar 100 mL de caldo cerebro corazón en un matraz de 250 ml
- 1.2 Preparar 200 mL de caldo Luria y repartir en 2 matraces de 250 mL.
- 1.3 Preparar 100 mL de caldo papa dextrosa y colocar en un matraz de 250 mL.
- 1.4 Esterilizar todos los matraces a 121 lb/in² durante 15 min, dejar enfriar e inocular con los microorganismos que se emplearán durante la práctica de acuerdo con la siguiente relación:

Microorganismo	Medio de cultivo
<i>Aspergillus niger</i>	Caldo papa dextrosa
<i>Staphylococcus</i> spp.	Caldo cerebro corazón
<i>Bacillus subtilis</i>	Caldo Luria
<i>Pseudomonas</i> spp.	Caldo Luria

- 1.5 Preparar 10 ml de agua peptonada y colocarlos en un tubo de ensayo con tapón de rosca
- 1.6 Incubar los matraces y el tubo por 24 h a 35°C.

Elaboración de las soluciones a evaluar

2 Soluciones desinfectantes

- 2.1 Preparar 25 mL de una solución de fenol al 5% p/v
- 2.2 Preparar 25 mL de una solución del desinfectante a evaluar al 4% p/v o v/v
- 2.3 En tubos de vidrio con tapón de rosca estériles, preparar las diluciones como se indican en las Tablas 1 y 2

Tabla 1. Diluciones de fenol para la determinación del coeficiente fenólico (Varley y Reddish, 1936).

Dilución	mL de Fenol 1:20 (5%)	mL de H ₂ O destilada	Volumen total (mL)	Volumen a desechar del tubo (mL)
1:50	2	3	5	0
1:60	2	4	6	1
1:70	2	5	7	2
1:80	2	6	8	3
1:90	2	7	9	4

Tabla 2. Diluciones de desinfectante para la determinación del coeficiente fenólico (Varley y Reddish, 1936).

Dilución	mL de desinfectante 1:25 (4%)	mL de H ₂ O destilada	Volumen total (mL)	Volumen a desechar del tubo (mL)
1:150	1	5	6	1
1:175	1	6	7	2
1:200	1	7	8	3
1:225	1	8	9	4
1:250	1	9	10	5

Evaluación del coeficiente fenólico

3 Probar la eficacia desinfectante de las soluciones a evaluar de la siguiente manera:

- 3.1 Colocar cada uno de los tubos de las diferentes soluciones de fenol y de desinfectante en un baño de temperatura controlada a 20°C durante 5 min.
- 3.2 Inocular cada uno de los tubos con 0.5 mL de caldo de cultivo del microorganismo de prueba. Entre la inoculación de cada tubo debe dejarse un intervalo de tiempo de 1 min.
- 3.3 Transcurridos 5 minutos después de la inoculación tomar una alícuota de 0.1 mL de cada uno de los tubos de prueba y colocarla en cajas de Petri con el medio adecuado para cada microorganismo empleado. Extender la muestra utilizando un varilla de vidrio esterilizada y enfriada.
- 3.4 Repetir la operación para los tiempos de 10 y 15 min.
- 3.3 Invertir las cajas e Incubar a 37°C durante 24 h.

Determinación del coeficiente fenólico

- 4 Examinar las cajas sembradas de cada una de las diluciones y determinar si se presentó o no crecimiento.
 - 4.1 Calcular el coeficiente fenólico mediante la siguiente relación

$$CF = \frac{\text{Máxima dilución del desinfectante que mata a un microorganismo en 10 min pero no en 5 min}}{\text{Máxima dilución del fenol que mata a ese microorganismo en 10 min pero no en 5 min}}$$

4.2 Determine cuál es el mejor desinfectante de acuerdo a los resultados obtenidos.



ESQUEMA 8. Realice un diagrama que ilustre la metodología empleada indicando la etapa correspondiente, las diluciones y los medios de cultivo empleados.

Cuestionario

- 1 ¿Qué es un desinfectante?
- 2 ¿En dónde está permitida la aplicación de un desinfectante en la industria de alimentos?
- 3 ¿Cuál es la utilidad del coeficiente fenólico?
- 4 ¿Qué limitaciones tiene la determinación del coeficiente fenólico?
- 5 Mencione cuáles son los desinfectantes más utilizados en la industria de alimentos.

Referencias

-  Ahmed EY y Carlstrom S. (2006). Microbiología de Alimentos. Manual de laboratorio. 1ra Edición. Editorial Limusa. México. D.F. 283 pp.
-  Anónimo (2004). Fung's forecast on rapid and automated methods: where are we now? *Food Safety Magazine*, agosto-septiembre: 24-31, 60.
-  Brock, Thomas D. (2003). Microbiología. Editorial Prentice-Hall Hispanoamericana. 4ª Edición. México, D. F. Págs. 234-237, 640-641, 670-678.
-  Centros de Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés)
-  Chambers, H. (2007). Invitrogen strives for gold medal performance at Beijing Olympics. *San Diego Business Journal*.
-  Collins CH y Lyne PM. (1989). Métodos Microbiológicos. Butterwoths & Co Ltd, Londres, Inglaterra.
-  Frazier WC y Westhoff. (2003). Microbiología de los Alimentos. Acribia, S.A., Zaragoza, España.
-  Fung, D. Y. C., L. K. Thompson, B. A. Crozier-Dodson y C. L. Kastner (2000). Hands-free "Pop-up" adhesive type method for microbial sampling of meat surfaces. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 8(3): 209-217.
-  Fung, D.Y.C. (2002). Rapid Methods and Automation in Microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3-22.
-  Fung, D.Y.C. y C.M. Lee (1981). Double-tube anaerobic bacteria cultivation system. *Food Science*, 7: 209-213.
-  Gaitan HA. (2004). Testing disinfectants in the Food Factory. *Methods in Molecular Biology*. 268: 281-288. Public Health Microbiology: Methods and Protocols. Edited by JFT Spencer and AL Ragout. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
-  Iañez PE. (2004). Acción de los agentes químicos sobre las bacterias en alimentos. *Mundo Alimentario*. Noviembre/Diciembre. 24-26.
-  Jawetz E, Melnick JL y Adelberg E. Brooks GF, Butel JS y Ornston LN (1992). Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg 14ª Ed. Manual Moderno, México.
-  Jay, J.M. (2002). Microbiología Moderna de los Alimentos. 4th ed. Ed. Acribia, Zaragoza, España
-  Madigan M., Martinko J., Parker J. (2006). Brock: Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Pearson Prentice Hall. Madrid, España.
-  Méndes I, Mossos N, Mogollón D, Poutou R, Máttar S. (2006). Epidemiological relationships among strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated from humans, poultry and food. *Universitas Scientiarum*. Revista de la Facultad de Ciencias. 11 (1): 5-13.
-  Neglia TG, Marr TJ, Davis AT. (1976). *Shigella* dysentery with secondary *Klebsiella* sepsis. *Journal of Pediatrics*. 89(2):253-4.
-  Perilla M, Allejo G, Boop C, Eliot J, Facklam R, Knapp J, Popovic T, Wells J. (2004). Manual de laboratorio para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos de patógenos bacterianos de importancia para la salud pública del mundo en desarrollo. Organización Mundial de la Salud.
-  Reddish FG. (1937). Limitations of the Phenol Coefficient. *Industrial and Engineering Chemistry*. 9(9): 1044-1047.

-  Varley JC, Reddish FG. (1936). The phenol coefficient as a measure of the practical value of disinfectants. *Journal of Bacteriology*. 32(2): 215-225.
-  Yousef AE y Carlstrom S. (2006). *Microbiología de Alimentos. Manual de laboratorio*. 1ra Edición. Editorial Limusa. México. D.F. 283 pp
-  Yuste, J., D.Y.C. Fung y M. Capellas (2007). Métodos rápidos y automatización en microbiología alimentaria. *Alimentaria*, mayo 07, 78-80.
-  NOM-092-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
-  NOM-109-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
-  NOM-110-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
-  NOM-112-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.
-  NOM-113-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
-  Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la determinación de Salmonella en Alimentos.
-  NOM-115-SSA1-1994, Norma Oficial Mexicana, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
-  NOM 111 SSA1 1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.dibico.com>

Anexo I

Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (NOM-092-SSA1-1994).

- 1 Cuando solo una dilución tiene el rango apropiado, se deberán contar las colonias, multiplicando por el inverso de la dilución.
- 2 Cuando hay dos diluciones cuyo rango es el apropiado, se deben contar las colonias de cada dilución y luego se promedian las cuentas de dos diluciones.
- 3 Cuando la dilución menor tenga menos de 30 colonias contar las colonias.
- 4 Cuando la dilución máxima tenga más de 300 colonias, se deberá dividir la placa y escoger un área de la placa donde la distribución colonial sea representativa, contando posteriormente las colonias multiplicando por el factor adecuado para obtener la cuenta de la placa.
- 5 Cuando en ninguna de las placas haya desarrollo de colonias, reportar como menor del inverso de la menor dilución usada.
- 6 Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:
 - 6.1 Cadenas de colonias no separadas claramente entre sí que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.
 - 6.2 Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.
 - 6.3 Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.
 - 6.4 Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50% de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25% de la superficie de la caja.
- 7 Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en 6.4, contar cualquiera de los tipos 6.1, 6.2 ó 6.3, como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo 6.1, si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia, si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo 6.2 y 6.3 generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo 6.4, reportarlos como crecimiento extendido. En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias.

Anexo II

Número más probable (NMP)

Con los intervalos de confianza del 95 por 100, entre los cuales pueden variar para diversas combinaciones de resultados positivos y negativos

Número de tubos que dan reacción positiva			Índice NMP/100 ml	Línea de confianza del 95 por 100	
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0.1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	3	<0.5	9
0	1	0	3	<0.5	13
1	0	0	4	<0.5	20
1	0	1	7	1	211
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	336
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1300
3	3	0	460	71	2400
3	3	2	1100	150	4800

Anexo III

Medios de cultivo

Preparación de medios de cultivo

Agar APT (All Purpose Tween 80)

Reactivo	Cantidad (g)
Caseína hidrolizada	12.5
Extracto de levadura	7.5
Dextrosa	10.0
Citrato de sodio	5.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Sulfato de magnesio	0.8
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato ferroso	0.04
Polisorbato (tween) 80	0.2
Hidrocloruro de tiamina	0.001
Agar bacteriológico	15.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH a 6.7 ± 0.2

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Hervir hasta disolución total. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, distribuir en porciones indicadas en el protocolo de la práctica, enfriar y utilizar.

AGAR BAIRD PARKER. Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Reactivo	Cantidad (g)
Peptona de caseína	10.0
Extracto de carne	5.0
Extracto de levadura	1.0
Cloruro de litio	5.0
Agar	17.0
Glicina	12.0
Piruvato de sodio	10.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.8 ± 0.2

Preparación. Suspender 60 g del medio deshidratado en 940 mL de agua destilada. Dejar en reposo 5 a 10 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras) durante 15 minutos. Enfriar a $45^\circ\text{--}50^\circ\text{C}$ y agregar 50 ml de la emulsión de yema de huevo (en condiciones asépticas) y 10ml de la solución de telurito (esterilizar por filtración). Homogeneizar y distribuir en cajas de Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad.

Cepa	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibido
<i>P. mirabilis</i> ATCC 43071	Bueno - Colonias marrones sin zona clara u opaca alrededor
<i>S. aureus</i> ATCC25923	Bueno a excelente - Colonias negras con borde incoloro, convexas, rodeadas de una zona opaca, con una zona clara externa
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	Escaso o bueno - Colonias negras, de tamaño irregular. Zona opaca alrededor de la colonia (no hay zona clara).

Resultados

Microorganismo	Morfología colonial
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento de bueno a excelente; colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Crecimiento de bueno a excelente; colonias brillantes, de tamaño mediano y color de gris oscuro a negro; halos transparentes alrededor de las colonias
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	Ausencia de crecimiento a crecimiento promedio; colonias pequeñas, de incoloras a color gris amarronado; sin zonas transparentes
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición completa
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Ausencia de crecimiento a crecimiento bueno; colonias de color marrón oscuro; proliferación reducida
Sin inocular	De amarillento a marrón claro, opaco

AGAR CITRATO DE SIMMONS. El agar Citrato de Simmons se usa para diferenciar bacterias entéricas gram negativas, basándose en la utilización del citrato como fuente de carbono para la bacteria.

Reactivo	Cantidad (g)
Fosfato di hidrogenado de amonio	1.00
Fosfato di potásico	1.00
Cloruro de Sodio	5.00
Citrato de sodio	2.00
Sulfato de magnesio	0.20
Agar	15.00
Azul de bromotimol	0.08
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.9 ±0.2

Preparación. Se suspenden 24.2 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se dejan remojar de 5 a 10 minutos. Se mezclan bien y se calientan agitando frecuentemente hasta ebullición y completa disolución. Se distribuyen 3mL en tubos 13 x 100 mm. Se esterilizan a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Los tubos se deben enfriar en posición inclinada de manera que el medio de cultivo en el fondo alcance una profundidad de 1.0 a 1.5 cm. Se puede emplear también el medio en placas de petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad

Negativos	Positivos
<i>Escherichia</i>	<i>Arizona</i>
<i>Shigella</i>	<i>Citrobacter</i>
<i>Mima</i> (- ó +)	<i>Salmonella</i>
<i>Listeria</i>	<i>Herellea</i>
	<i>Enterobacter</i>
	<i>Klebsiella</i>
	<i>Serratia</i>

AGAR CUENTA ESTÁNDAR. Es un medio de cultivo rico en nutrientes y es ampliamente usado en recuento microbiano en alimentos.

Reactivo	Cantidad (g)
Peptona de caseína	5.0
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1.0
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.0 ± 0.2 .

Preparación. Suspender 23.5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Mezclar bien de 5 a 10 minutos. Después se calentaran con agitación frecuentemente y dejar hervir durante un minuto. Esterilizar a 121°C a 15 libras de presión durante 15 minutos. Distribuir en placas de Petri, conservar en refrigeración.

AGAR EMB (Agar-Eosina-Azul de metileno-lactosa-sacarosa). Agar selectivo y diferencial para la demostración y el aislamiento de enterobacterias patógenas y bacilos entericos. Útil para el aislamiento y diferenciación de coliformes de otras enterobacterias de interés medico sanitario.

Reactivo	Cantidad (g)
Peptona de gelatina	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Fosfato di potásico	2.0
Eosina Y	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar	13.5
agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.2 ± 0.2 .

Preparación: Suspender 36 gramos de polvo en un litro de agua destilada, mezclar por 10 minutos. Calentará con agitación frecuente y se dejará hervir por un minuto. Esterilizar autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos. Dejar enfriar la solución a 50°C. Agitar suavemente evitando la formación de burbujas para que la composición del medio se uniformice y vaciar en placas de Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad.

Cepas	Crecimiento	Color	Brillo Metálico
<i>E. coli</i>	Bueno	Violeta	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bueno	Rosa con centro oscuro	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	Bueno	Rosa con centro oscuro	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bueno	Incoloro	-
<i>Shigella flexneri</i>	Bueno	Incoloro	-
<i>Bacillus cereus</i>	Nulo/Ligero	Incoloro	-

AGAR INFUSIÓN CEREBRO-CORAZÓN. Es un medio sólido muy apropiado para el cultivo de bacterias y hongos, incluyendo los de difícil desarrollo.

Reactivo	Cantidad (g)
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión corazón vacuno	250.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico	2.5
Agar*	15.0
Agua destilada	1000 ml

*Para preparar caldo infusión cerebro corazón se omite la adición de agar

Ajustar el pH a 6.8 ± 0.2

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Hervir hasta la disolución total. Distribuir en porciones indicadas en el protocolo de la práctica. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Después de la esterilización, enfriar y utilizar.

Control de actividad.

Cepa	Crecimiento
<i>Aspergillus niger</i>	Bueno
<i>Neisseria meningitidis</i>	Bueno
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Bueno
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bueno

AGAR KENER FECAL (KF). Medio de alta especificidad diagnóstica, selectivo y diferencial para el aislamiento y recuento de *Streptococcus* en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria.

Reactivo	Cantidad (g)
Mezcla de peptona	10.0
Lactosa	1.0
Extracto de levadura	10.0
Cloruro de litio	5.0
Agar	15.0
Glicerofosfato de sodio	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Azida de sodio	0.4
Púrpura de bromocresol	0.015
Maltosa	20.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7 ± 0.2

Preparación. Suspender 71.5 g en agua destilada. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir y esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras) durante 15 minutos. Homogenizar y distribuir en cajas Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad

Cepa	Crecimiento
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	Excelente y bueno, la prueba da positiva
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	No presenta crecimiento
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	No presenta crecimiento
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	No presenta crecimiento

AGAR LISINA Y HIERRO (LIA). Medio de cultivo utilizado para diferenciar microorganismos, especialmente *Salmonella spp.*, basado en la descarboxilación / desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

Reactivo	Cantidad (g)
Peptona de gelatina	5.0
Extracto de levadura	3.0
Glucosa	1.0
Lisina	10.0
Citrato de hierro y amonio	0.5
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	15.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.7 ± 0.2

Preparación. Suspender 35 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar hidratar por 15 minutos. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en posición inclinada de modo que el medio de cultivo en el fondo alcance una profundidad de 1.0 - 1.5 cm. Conservar en refrigeración.

AGAR NUTRITIVO. Se emplea de acuerdo al tipo de estudio que se quiera realizar.

Reactivo	Cantidad (g)
Agar*	7.5
Extracto de carne	3.0
Peptona de gelatina	5.0
Agua destilada	1000 ml

* Para preparar Caldo Nutritivo se omite la adición de agar.

Ajustar pH a 6.8 ± 0.2 .

Preparación. Prehidratar 23 g del medio en 1L de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar y agitar hasta ebullición durante 1 minuto. Esterilizar autoclave a 121°C (15 lbs de presión), durante 15 minutos. Enfriar aproximadamente a 45°C y vertir placas de Petri. Conservar en refrigeración de 2 a 8°C.

Control de actividad

Cepa	Crecimiento
<i>Escherichia coli</i> ACTT 25922	Bueno
<i>Staphylococcus aureus</i> ACTT 25923	Bueno
<i>Salmonella typhimurium</i> ACTT 14028	Bueno
<i>Enterococcus faecalis</i> ACTT 29212	Bueno

AGAR DE BILIS Y ROJO VIOLETA (RVB). Es un medio selectivo para la detección y recuento de coliformes en agua, leche y otros alimentos.

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	7.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Lactosa	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0
Rojo neutro	0.03
Cristal violeta	0.002
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.4 ± 0.2

Preparación. Suspender 41.5 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejar hidratar de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuentemente, hasta llegar a ebullición durante un minuto. Después se esterilizará a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Una vez esterilizado, se enfriará a 45°C y vaciar en cajas de Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad.

Microorganismo	Morfología colonial
Enterobacterias fermentadoras de lactosa.	Rojas, con halo de precipitación rojizo
Enterobacterias no fermentadoras de lactosa.	Incoloras
<i>Enterococcus spp.</i>	Rosadas como punta de alfiler

AGAR DESOXICOLATO CITRATO (ADC). Medio moderadamente selectivo diferencial para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y vibrones de cólera en las heces y otras sustancias.

Reactivo	Cantidad (g)
Digerido pancreático de caseína	3.5
Digerido péptico de tejido animal	3.5
Extracto de carne bovina	3.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Desoxicolato de sodio	2.5
Citrato sódico	10.5
Tiosulfato sódico	5.0
Rojo neutro	0.03
Agar	12.0
Agua destilada	1000ml

Ajustar pH a 7.3 ± 0.2

Preparación. Distribuir en porciones indicadas en el protocolo de la práctica. No someter a tratamiento de autoclave. Después de la esterilización por un método alternativo, enfriar y utilizar.

Control de actividad

Cepa	Morfología colonial
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento ausente o aceptable; colonias rosa rojizo, precipitación biliar alrededor de las mismas
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición total
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Colonias incoloras; crecimiento aceptable o bueno
<i>Salmonella abony</i> DSM 4224	Colonias desde incoloras hasta de color naranja pálido; crecimiento bueno o excelente
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Colonias desde incoloras hasta de color naranja pálido; crecimiento bueno o excelente
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Colonias desde incoloras hasta de color naranja pálido; crecimiento entre aceptable y excelente
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Colonias rosa pálido; crecimiento entre aceptable y excelente
Sin inocular	Colonias de color anaranjado rojizo, ligeramente opalescentes

Morfología característica de las colonias:

Microorganismo	Morfología colonial
<i>E. coli</i>	Colonias grandes, planas, de color rosa o rojo con una zona de precipitación biliar
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Colonias grandes, mucoides, de color rosa
<i>Proteus</i>	Colonias incoloras o rojas dependiendo de la especie
<i>Salmonella/Shigella</i>	Colonias incoloras o de color anaranjado pálido
<i>Pseudomonas</i>	Colonias desde incoloras hasta marrón o verde
<i>Vibrio cholerae</i>	Colonias de incoloras a rojas
Bacterias gram-positivas	Crecimiento nulo o escaso

AGAR ENTÉRICO HEKTOEN (AHE). Medio moderadamente selectivo y diferencial para el aislamiento y la diferenciación de microorganismos gram-negativos entéricos en muestras clínicas y no clínicas. Tiene particular importancia como medio para el aislamiento de especies de *Shigella* y *Salmonella*.

Reactivos	Cantidad (g)
Digerido péptico de tejido animal	12.0
Extracto de levadura	3.0
Sales biliares	9.0
Lactosa	12.0
Sacarosa	12.0
Salicina	2.0
Cloruro sódico	5.0
Tiosulfato sódico	5.0
Citrato férrico de amonio	1.5
Azul de bromotimol	0.064
Fucsina ácida	0.1
Agar	13.5
Agua destilada	100 ml

Ajustar pH a 7.6 ± 0.2

Control de actividad

Cepa tipo	Resultados
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Crecimiento bueno o excelente; colonias de color verde a azul verdoso con centro negro
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento bueno o excelente; colonias verde claro
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931	Crecimiento bueno o excelente; colonias verde claro
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición parcial o completa; colonias amarillo anaranjado, puede haber precipitados biliares alrededor de las mismas, halos desde salmón hasta naranja
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición parcial o completa; pequeñas colonias amarillas, halos desde salmón hasta naranja
Sin inocular	Color verde, casi transparente

Morfología característica de las colonias:

Microorganismos	Morfología colonial
<i>E. coli</i>	Colonias grandes, color amarillo o salmón; pueden inhibirse algunas cepas
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Colonias grandes, color amarillo o salmón
<i>Proteus</i>	Colonias variables, color azul verdoso, azul o salmón, la mayoría de las cepas tienen centro negro o son totalmente de este color
<i>Salmonella</i>	Colonias de color azul verdoso o azul; la mayoría de las cepas tienen centro negro o son totalmente de este color
<i>Shigella</i>	Colonias elevadas, verdes y húmedas
<i>Pseudomonas</i>	Colonias irregulares, de color verde a marrón
Bacterias gram-positivas	Crecimiento nulo o escaso

Agar Mac Conkey (AMC)

Reactivo	Concentración (g)
Agar	13.5
Pluripeptona	3.0
Peptona	17.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Cristal violeta	0.001
Rojo neutro	0.03
Agua destilada	1000ml

Ajustar pH a 7.0 ± 0.2

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Esterilizar durante 15 minutos a $121 \pm 1.0^\circ\text{C}$. Enfriar a 45°C verter en placas de Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad

Cepa	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Crecimiento de bueno a excelente, colonias de color rosa a rojo con precipitados biliares
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 12453	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color de beige a amarronado, inhibición de la proliferación
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color beige
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color beige
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición (parcial a) completa
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibición completa.
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Sin analizar
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 6305	Sin analizar
Sin inocular	Rosa claro, ligeramente opalescente

Morfología característica de las colonias

Microorganismo	Morfología colonial
<i>E. coli</i>	De color de rosa a rojo rosáceo (pueden estar rodeadas de una zona con precipitación de bilis)
<i>Enterobacter</i>	Mucoides, de color rosa
<i>Klebsiella</i>	Mucoides, de color rosa
<i>Proteus</i>	Incoloras, inhibición de la proliferación
<i>Salmonella</i>	Incoloras
<i>Shigella</i>	Incoloras
<i>Pseudomonas</i>	Irregulares, de incoloras a color rosa
<i>Estafilococos</i>	Inhibición de parcial a completa
<i>Streptococos</i>	Inhibición completa.
<i>Enterococos</i>	Inhibición de parcial a completa

AGAR SALMONELLA-SHIGELLA (SS). Medio selectivo y diferencial para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*.

Reactivos	Cantidad (g)
Extracto de carne bovina	5.0
Digerido pancreático de caseína	2.5
Digerido péptico de tejido animal	2.5
Lactosa	10.0
Sales biliares	8.5
Citrato sódico	8.5
Tiosulfato sódico	8.5
Citrato férrico	1.0
Rojo neutro	0.025
Agar	13.5
Verde brillante	0.330
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.2 ± 0.2

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Hervir hasta disolución total. Distribuir en placas de Petri. No someter a tratamiento de autoclave. Después de la esterilización por filtración, enfriar y utilizar.

Control de actividad

Cepas	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición de parcial a completa; colonias de color rojo carmesí con precipitación
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Inhibición completa.
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Crecimiento de bueno a excelente; colonias de color beige con centros blancos
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Crecimiento de adecuado a excelente; colonias de color de rosa claro a incoloras
Sin inocular	Rojo anaranjado, tono rosado

Morfología característica de las colonias:

Microorganismo	Morfología colonial
<i>E. coli</i>	Crecimiento ligero, color rosa o rojo
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Crecimiento leve, color rosa
<i>Proteus</i>	Incoloro, con centros blancos
<i>Salmonella</i>	Incoloro, generalmente con centro de color negro
<i>Shigella</i>	Incoloro
<i>Pseudomonas</i>	Crecimiento leve e irregular
Bacterias gram positivas	Ausencia de crecimiento

AGAR SULFURO INDOL MOVILIDAD (SIM). Diferenciación e identificación de enterobacterias. Además, es un medio semi-sólido usado rutinariamente en la diferenciación e identificación de cultivos puros de enterobacterias y que detecta la producción de sulfuros, indol y movilidad de las mismas.

Reactivo	Cantidad (g)
Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH final de 7.3 ± 0.2

Preparación. Suspender 30g del medio deshidratado en un litro de agua destilada agitando frecuentemente. Hidratar durante 10 minutos y hervir durante un minuto. Distribuir en tubos de ensayo a una altura de unos 4 cm y se esteriliza en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos.

Control de Actividad

Microorganismo	Producción de H ₂ S	Producción de indol	Movilidad
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	+
<i>Salmonella</i>	+	-	+
<i>Shigella</i>	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	+	+
<i>Klebsiella</i>	-	+ ó -	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	+
<i>Citrobacter</i>	+	-	+

AGAR SULFITO DE BISMUTO (ABS)

Reactivo	Concentración (g)
Agar	20.0
Extracto de carne de res	5.0
Indicador de sulfito de bismuto	8.0
Verde brillante	0.025
Fosfato disódico	4.0
Sulfato ferroso	0.3
Glucosa	5.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levaduras	3.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar el pH a 7.5 ± 0.2

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Distribuir en porciones indicadas en el protocolo de la práctica. No someter a tratamiento de autoclave. Después de la esterilización por filtración enfriar y utilizar.

AGAR TRIPLE AZÚCAR HIERRO Y (TSI)

Reactivo	Cantidad (g)
Agar	13.0
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa	1.0
Lactosa	10.0
Peptona	20.0
Rojo de fenol	0.025
Sacarosa	10.0
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH de 7.3 ± 0.2 .

Preparación. Disolver los componentes en un litro de agua. Hervir hasta disolución total. Distribuir en porciones indicadas en el protocolo de la práctica. No someter a tratamiento de autoclave. Después de la esterilización por filtración enfriar y utilizar.

Control de Actividad

Cepa	Resultado		
	Superficie	Fondo	H ₂ S
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Ácido	Ácido-gas	-
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 8427	Ácido	Ácido	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Alcalino	Alcalino	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	Alcalino	Ácido	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	Ácido	Ácido-gas	-

AGAR VERDE BRILLANTE (BGA). Es un medio altamente selectivo empleado para aislar *Salmonella* (excepto *S. typhi* y *Shigella*), de heces, orina, leche y productos lácteos y de otros alimentos de importancia sanitaria.

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Sacarosa	10.0
Agar bacteriológico	20.0
Mezcla de peptonas	10.0
Lactosa	10.0
Rojo fenol	0.08
Verde brillante	12.5 mg
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.9 ± 0.2

Preparación. Suspender 58 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y dejarán hidratar 15 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir durante un minuto. Se esteriliza en autoclave a 121 OC y 15 libras de presión durante 15 minutos y distribuir en placas de Petri, conservar en refrigeración.

Control de actividad.

Cepa	Resultado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Amarillo-verdosas sobre fondo amarillento
<i>Salmonella enteritis</i> ATCC 13076	Rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
<i>Salmonella typhi</i>	Crecimiento inhibido
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Rosas, blancas o transparentes sobre fondo rojo
<i>Shigella flexneri</i> . ATCC 12022	Crecimiento Inhibido
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento inhibido

AGAR XILOSA, LISINA DESOXICOLATO (XLD). Para aislamiento de bacterias enteropatógenas, especialmente de los géneros *Shigella*, *Salmonella* y *Arizona*.

Reactivo	Cantidad (g)
Xilosa	3.5
L-lisina	5.0
Lactosa	7.5
Sacarosa	7.5
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de levadura	3.0
Rojo de fenol	0.08
Agar bacteriológico	13.5
Desoxicolato de sodio	2.5
Tiosulfato de sodio	6.8
Citrato de hierro y amonio	0.8
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 7.4 ± 0.2

Preparación. Suspender 55 gramos del medio deshidratado en un litro de agua destilada y mezclar durante 10-15 minutos. Calentar agitando frecuentemente hasta una temperatura de 90°C sin que el medio llegue a hervir. Dejar de calentar en cuanto se obtiene la disolución completa del polvo. Enfriar rápidamente en agua o en baño maría a 50°C y verter en placas Petri. El medio debe ser transparente o casi transparente y tener un color rojo rubí anaranjado

CALDO *ESCHERICHIA COLI* (EC). Es un medio de cultivo selectivo para coliformes y *E. coli* en aguas, alimentos y otros materiales.

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato di potásico	4.0
Fosfato monopotásico	1.5
Lactosa	5.0
Sales biliares	1.5
Peptona de caseína	20.0
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.9 ± 0.2 .

Preparación. Prehidratar 37 g de medio en 1 L de agua destilada. Dejar reposar de 10 a 15 minutos. Calentar con agitación frecuentemente hasta ebullición durante 1 minuto para que se disuelva por completo. Cuando la porción de la muestra a analizar es de 10 mL preparar el medio a concentración doble. Distribuir en tubos de ensayo con campana de Durham. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos y se conservan en refrigeración de 2 a 8°C .

Control de actividad

Cepa	Crecimiento	Gas
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Bueno	+
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Bueno	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Moderado	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031	Bueno	+
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	Bueno	+

CALDO LAURIL SULFATO DE SODIO (CLS). El caldo Lauril Sulfato de Sodio es recomendado por el APHA para la detección de coliformes en aguas y alimentos.

Reactivo	Cantidad (g)
Lauril Sulfato de Sodio	0.10
Peptona de caseína	20.00
Lactosa	5.00
Fosfato di potásico	2.75
Fosfato mono potásico	2.75
Cloruro de sodio	5.00
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.8 ± 0.2

Preparación. Disolver 35.6 gramos de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Distribuir distribuye en tubos de ensayo con campana de Durham en porciones de 10 mL para muestras de 1 mL o menos. Se esterilizaran en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 minutos. Almacenar los tubos a temperatura ambiente o utilizar frascos con tapón de rosca. Si el caldo se refrigera generalmente se vuelve turbio pero únicamente la formación del gas se considera como prueba positiva.

Control de actividad.

Microorganismos	Crecimiento	Gas
<i>Escherichia coli</i>	Bueno o excelente	+
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Bueno o excelente	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	Bueno o excelente	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	Inhibido	

CALDO DE MICROINOCULACIÓN (CM). Se utiliza en ensayos microbiológicos para los microorganismos *Streptococcus* y *Lactobacillus*. Es importante en el inóculo para análisis de vitaminas y aminoácidos.

Reactivo	Cantidad (g)
Dextrosa	10.0
Fosfato monopotásico	2.0
Extracto de levadura	20.0
Polipeptona	5.0
Polisorbato 80	0.10
Agua destilada	1000 ml

Ajustar a pH 6.7 ± 0.2

Preparación. Suspender 30.0 g en agua destilada. Reposar de 10 a 15 minutos Calentar agitando frecuentemente y hervir durante 1 minuto. Distribuir en los tubos de ensayo y se esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras) durante 15 minutos. Para el medio sólido agregar 15.0 g de agar por litro. Homogenizar, esterilizar y distribuir en cajas Petri. Conservar en refrigeración a temperatura de 2 a 8°C .

En algunos medios utilizados en pruebas bioquímicas se ajusta el pH (9.6) o se agregan ciertas concentraciones de sales (NaCl al 6.5%).

Control de actividad

Cepa	Crecimiento
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	Presenta crecimiento
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Presenta crecimiento
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC8014	Presenta crecimiento
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC7469	Presenta crecimiento

CALDO ROJO DE METILO – VOGES PROSKAUER (MR-VP). Medio líquido empleado para efectuar las reacciones indicadas de rojo de metilo y acetil-metil-carbinol (Voges Proskauer), del grupo *Escherichia/Enterobacter*

Reactivo	Cantidad (g)
Mezcla de peptonas	7.0
Dextrosa	5.0

Ajustar pH a 6.9 ± 0.2

Preparación. Disolver 17 gramos de medio deshidratado, mezclar bien y si es necesario calentar un poco hasta la disolución total. Por último, se distribuir y esterilizar entre $118-121^{\circ}\text{C}$ (no más de 15 libras de presión) durante 15 minutos.

CALDO UREA. Medio para diferenciación de enterobacterias. El Caldo Urea se emplea para la identificación de enterobacterias, particularmente para diferenciar los miembros del género *Proteus* de la *Salmonella* y *Shigella*.

Reactivo	Cantidad (g)
Urea	20
Fosfato monopotásico	9.1
Fosfato sódico	9.5
Extracto de levadura	0.1
Rojo fenol	0.01
Agua destilada	1000 ml

Ajustar pH a 6.8 ± 0.2

Preparación. Disolver 38.7 gramos del medio en 100 mL de agua destilada sin calentar; cuando el medio se hay disuelto, filtrar. Distribuir en tubos estériles en cantidades de 0,5 a 2 mL. Se pueden emplear volúmenes mayores, pero las reacciones serían más lentas. Se puede esterilizar el medio en autoclave de 5 a 8 libras de presión durante 15 minutos.

Control de actividad

Cepa	Resultado
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 43071	Positiva / Rojo-rosado
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativa / Amarillo
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	Negativa / Amarillo
<i>S. typhimurium</i> ATCC 14028	Negativa / Amarillo

CALDO VASSILIADIS-RAPPAPORT (CVR). Para el enriquecimiento selectivo de las especies del género *Salmonella* a partir de alimentos u otros materiales.

Solución A

Reactivo	Cantidad (g)
Triptona	5.0
Cloruro de sodio	8.0
Fosfato de potasio dihidrogenado	1.6
Agua destilada	1.0 L

Se disuelven los componentes en agua por calentamiento cercano a 70°C.

Solución B

Reactivo	Cantidad (g)
Cloruro de magnesio hexahidratado	400.0
Agua destilada	1.0 L

Se disolverá el cloruro de magnesio en agua.

Como esta sal es muy higroscópica es conveniente disolver el contenido de cloruro de magnesio desde un recipiente recientemente abierto de tal modo que la concentración de la solución sea de 0,4 g/mL. Se conserva en frasco ámbar a temperatura ambiente.

Solución C

Reactivo	Cantidad (g)
Oxalato de verde de malaquita	0.4
Agua destilada	100mL

Medio completo

Reactivo	Cantidad (mL)
Solució A	1000
Solución B	100
Solución C	10

Preparación. Se adicionarán 1000 mL de la solución A, 100 mL de la solución B y 10 mL de la solución C. Después se ajustará el pH si es necesario, de tal manera que después de la esterilización sea de 5,2. Distribuir antes de usar dentro de tubos en cantidades de 10 mL, almacenar en refrigeración.

Anexo IV

Preparación de reactivos y soluciones

REACTIVO DE KOVACS

Fórmula para la preparación del reactivo.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
p-dimetil- amino-benzaldehído	5 g
Alcohol amílico o butílico	80 mL
Ácido clorhídrico químicamente puro	20 mL

Preparación.

- Disolver el p-dimetil-amino-benzaldehído en el alcohol butílico o amílico.
- Añadir el ácido clorhídrico.
- Conservar en un frasco ámbar en un sitio oscuro
- Almacenar en refrigeración.

Solución de Rojo de Metilo

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico al 95%	250 mL
Agua destilada	250 mL

Preparación.

- Disolver el colorante en el alcohol al 95 %.
- Aforar con agua destilada a 500 mL
- Filtrar la preparación.

SOLUCIÓN "A" VOGES PROSKAUER (α -naftol).

Reactivo	Cantidad ó Volumen
α -naftol	5.0 g
Alcohol etílico al 95%	100 mL

Preparación.

- Disolver el reactivo α -naftol en 80 mL de alcohol al 95 % y posteriormente aforar a 100 mL con alcohol.

SOLUCIÓN "B" VOGES PROSKAUER (KOH)

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Hidróxido de potasio químicamente puro.	40.0 g
Creatina	0.3 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Agregar el KOH a 75 mL de agua destilada, agitando y enfriando constantemente.
- Cuando la solución esta a temperatura ambiente (25°C) se agregar la creatina y suficiente agua destilada para obtener un volumen final de 100 mL.

SOLUCIÓN DE FENOL AL 5%.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Fenol	5.0 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver el fenol en 80 mL de alcohol al 95 % y posteriormente aforar a 100 mL.

SOLUCIÓN DE ÁCIDO TARTÁRICO AL 1.4 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Ácido tartárico	1.4 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

Disolver el reactivo ácido tartárico en 80 mL de agua destilada y posteriormente aforará a 100 mL. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE NITRITO DE SODIO AL 0.2 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Nitrito de sodio	0.2 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver el reactivo nitrito de sodio en 80 mL de agua destilada y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE SORBATO DE POTASIO 3.0 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Sorbato de potasio	3.0 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver el reactivo cloruro de sodio en 50 mL de agua destilada y posteriormente aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y se conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE SULFITO DE POTASIO AL 0.2 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Sulfito de potasio	0.2 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver el reactivo sulfito de sodio en 80 mL de agua destilada y posteriormente aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE BENZOATO DE POTASIO AL 3.0 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Nitrito de sodio	3.0 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver el reactivo benzoato de potasio en 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE ALCOHOL ETILICO AL 68.0 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Nitrito de sodio	68 mL
Agua destilada	32 mL

Preparación.

- Agregar el alcohol etílico en 32 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

SOLUCIÓN DE CLORURO DE SODIO AL 0.90 %.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Nitrito de sodio	9.0 g
Agua destilada	1000 mL

Preparación.

- Disolver el cloruro de sodio en 500 mL de agua destilada y posteriormente aforar a 1000 mL. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE AGUA PEPTONADA.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Peptona	0.1 g
Cloruro de sodio	0.85 g
Agua destilada	100 mL

Preparación.

- Disolver los reactivos en 50 mL de agua destilada y posteriormente aforar a 100 mL, ajustándose a pH de 7.0. Esterilizar por filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE PLASMA DE CONEJO.

Emplear plasma deshidratado de conejo o rehidratado siguiendo las instrucciones del fabricante y agregar ácido etilendiami-notetracético (EDTA) en solución al 0,1 % en plasma rehidratado. Si se utiliza plasma deshidratado diluir con agua estéril en proporción de 1:3.

Nota. Puede emplearse plasma de conejo liofilizado adicionado de EDTA. No debe emplearse sangre citratada.

SOLUCIÓN DE AZUL DE METILENO ALCALINO.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Azul de metileno	0.30 g
Hidróxido de potasio al 0.01%	100 mL
Alcohol etílico al 95%	30 mL

Preparación.

- Disolver el azul de metileno en 30 mL de alcohol etílico y posteriormente mezclar con 100 mL de hidróxido de sodio al 0.01%. Esterilizar por medio de filtración y conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE CRISTAL VIOLETA.

Esta solución se realiza en dos partes

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Cristal Violeta	1 g
Oxalato de amonio	0.4 g
Agua destilada	40 mL
Alcohol etílico al 95%	10 mL

Preparación.

- A) Se disolverá el reactivo cristal violeta en 10 mL de alcohol etílico.
- B) Por otra parte disolver el oxalato de amonio en 40 mL de agua destilada y mezclarlo homogéneamente.
- C) Una vez preparadas las soluciones anteriores mezclarlas cuidadosamente.

Guardar la mezcla en un frasco ámbar en oscuridad durante 24 horas. Filtrar en papel Whatman No. 1 antes de utilizarlo.

SOLUCIÓN DE LUGOL.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Yoduro de potasio	0.333 g
Yodo	0.166 g
Agua destilada	50 mL

- **Preparación.** Disolver el yoduro de potasio en 20 mL de agua destilada agregar lentamente el yodo y posteriormente aforarlo a 50 mL. Filtrar y guardar en un frasco ámbar. Conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE SAFRANINA.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Safranina	0.125 g
Alcohol etílico al 95%	5 mL
Agua destilada	50 mL

- **Preparación.** Disolver la safranina en 5 mL de alcohol etílico y aforar a 50 mL. Filtrar y guardar en un frasco ámbar. Conservar en refrigeración (2 a 8°C).

SOLUCIÓN DE LACTOFENOL-AZUL ALGODÓN.**A) SOLUCIÓN DE LACTOFENOL.**

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Ácido láctico	100 mL
Glicerol	200 mL
Fenol	100 g
Agua destilada	100 mL

- **Preparación.** Disolver el fenol en agua sin calentar y adicionar el ácido láctico y el glicerol.

B) SOLUCIÓN DE AZUL ALGODÓN.

Reactivo	Cantidad ó Volumen
Anilina azul soluble	5 mL
Glicerol	10 mL
Agua destilada	85 mL

- **Preparación.** Disolver la anilina y el glicerol en el agua destilada.

Preparación de la solución de Lactofenol-Azul Algodón. Disolver en partes iguales la solución de lactofenol y azul algodón.

Anexo V

Tinción Gram

Preparación

1. Con la ayuda de un mechero, flamear un asa bacteriológica y esperar que enfríe.
2. Tomar un poco de muestra con el asa (previamente flameada) teniendo cuidado de no llevarse toda la colonia.
3. Depositar la muestra contenida en el asa en la parte central de un portaobjetos, mediante movimientos giratorios de tal forma que al terminar la extensión, tengamos como producto una espiral en la parte media de la lámina
4. Esperar que seque al aire la muestra
5. Fijar la muestra con la llama de un mechero, teniendo en cuenta que el calor no debe ser directo (sólo se pasa por la llama), puesto que el calor excesivo puede cambiar la morfología celular de las bacterias a observar.

Tinción

6. Adicionar la muestra con una gota de cristal violeta (Gram) y deja actuar al colorante por 1 minuto.

Enjuague

7. Al transcurrir el minuto, enjuagar la lámina con agua corriente. Para realizar el lavado, se debe tener en cuenta que el chorro de agua NO debe caer directamente sobre la muestra, ésta debe caer sobre la parte superior de la lámina que no contiene muestra. El chorro debe ser con corriente suave. El enjuague se debe realizar poniendo el portaobjetos en posición inclinada hacia abajo

Mordiente

8. Una vez enjuagado el portaobjetos, aplicar la solución de yodo-lugol durante 1 minuto.
9. Enjuagar

Decoloración

10. Pasado el minuto de haber actuado el mordiente, decolorar con etanol-cetona (40/60 v/v), hasta que ya no escurra colorante.
11. Enjuagar con agua para quitar los residuos de decolorante.

Tinción de contraste

12. Cubrir la muestra con una gota de safranina dejar actuar durante 1 minuto.
13. Pasado el minuto correspondiente, enjuagar con agua y secar en la forma anteriormente descrita.

Nota: A pesar de la gran utilidad del la tinción de Gram, este método debe ser valorado con precaución, ya que la reacción puede variar según la edad de las células, presencia de antibióticos y errores del operador, por ello junto a la muestra deben teñirse controles con Grampositivas y Gramnegativas.

Manual de prácticas de laboratorio. Microbiología de los Alimentos

Se terminó de imprimir en agosto de 2013,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco, No.186, Col. Vicentina,
C.P.09340. Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel.: (01) 58044600