

èditorial

Universidad de **Nariño**

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA

Segunda edición



PROBIOTEC-FORAPIS
Universidad de Nariño

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA

Segunda edición

Henry Jurado-Gómez
Ivonne Catalina Fajardo-Argoti
John Jairo Parreño-Salas

editorial
Universidad de Nariño

Jurado Gámez, Henry

Procedimientos de laboratorio de microbiología zootécnica / Henry jurado Gámez, Ivonne Catalina Fajardo Argoti, John Jairo Parreño Salas —2ª. Ed.-- San Juan de Pasto : Editorial Universidad de Nariño, 2026.

294 páginas : ilustraciones, fotografías, tablas

Incluye Referencias bibliográficas p. 271 - 286 y reseña de los autores p. 289 - 291

ISBN: 978-628-7864-65-8 Impreso

ISBN: 978-628-7864-68-9 Digital

1. Microbiología—Alimentos (origen zootécnico) 2. Microbiología general—Zootecnia—Prácticas 3. Microorganismos—Estudio 4. Microorganismos—Pruebas bioquímicas 5. Crecimiento microbiano—Cinética 6. Alimentos--Bacteriología I. Fajardo Argoti, Ivonne Catalina II. Parreño Salas, John Jairo

664.001579 J957 – SCDD-Ed. 22



SECCIÓN DE BIBLIOTECA

Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica

© Editorial Universidad de Nariño

© Henry Jurado-Gámez
Ivonne Catalina Fajardo-Argoti
John Jairo Parreño-Salas

ISBN impreso: 978-628-7864-65-8

ISBN digital: 978-628-7864-68-9

DOI: <https://doi.org/10.22267/lib.udn.060>

Segunda edición

Diagramación y diseño:

Diana Sofía Salas Chalapud
Nathaly Johana Rivadeneira

Fecha de publicación: abril 2026

San Juan de Pasto – Nariño – Colombia

Prohibida la reproducción total o parcial, por cualquier medio o con cualquier propósito, sin la autorización escrita de su Autor o de la Editorial Universidad de Nariño.

Contenidos

Introducción 13

CAPÍTULO 1. Normas de Trabajo de Laboratorio 15

1.1 Recomendaciones para el Trabajo en Laboratorio16

1.1.1 Introducción.....16

1.1.2 Objetivos.....16

1.1.3 Marco teórico16

1.2 Equipos y Materiales de un Laboratorio de Microbiología.....51

1.2.1 Introducción.....51

1.2.2 Objetivos.....51

1.2.3 Materiales y equipos.....51

1.3 El Microscopio65

1.3.1 Introducción.....65

1.3.2 Objetivos.....66

1.3.3 Marco teórico66

1.3.4 El sistema de iluminación71

1.4 Medidas Microscópicas73

1.4.1 Introducción.....73

1.4.2 Objetivo74

1.4.3 Marco teórico74

1.4.4 Materiales y equipos.....74

1.4.5 Procedimiento75

1.5 Esterilización77

1.5.1 Introducción.....77

1.5.2 Objetivos.....77

1.5.3 Marco teórico77

1.5.4 Materiales y equipos.....84

1.5.5 Procedimiento84

1.6 Efectos Letales de la Luz Ultravioleta.....86

1.6.1 Introducción.....	86
1.6.2 Objetivo	87
1.6.3 Materiales.....	87
1.6.4 Procedimiento.....	88
1.6.5 Observaciones y resultados	88
Conclusión capítulo 1.....	89

CAPÍTULO 2. Prácticas de Microbiología General 90

2.1 Control Microbiano91

2.1.1 Introducción	91
2.1.2 Objetivos.....	91
2.1.3 Marco teórico.....	92
2.1.4 Materiales y equipos.	92
2.1.5 Procedimiento.....	92

2.2 Presencia de Microorganismos en La Naturaleza. ...95

2.2.1 Introducción.....	95
2.2.2 Objetivos.....	96
2.2.3 Materiales y equipos	96
2.2.4 Procedimiento	97
2.2.5 Observaciones y resultados	97

2.3 Preparación de Medios de Cultivo y Métodos de Siembra de Microorganismos98

2.3.1 Introducción.....	98
2.3.2 Objetivos.....	100
2.3.3 Materiales y equipos	100
2.3.4 Procedimiento	100
2.3.5 Observaciones y resultados	108

2.4 Morfología Bacteriana y Fundamentos de Tinción ..109

2.4.1 Introducción.....	109
2.4.2 Objetivos.....	112
2.4.3 Materiales y métodos	113
2.4.4 Procedimiento	113

2.5 Coloraciones Diferenciales	115
2.5.1 Introducción.....	115
2.5.2 Prueba de motilidad.....	118
2.5.3 Observaciones y resultados	119
2.6 Aislamiento de Bacteriófagos.....	119
2.6.1 Introducción.....	119
2.6.2 Objetivo.....	120
2.6.3 Marco teórico.....	120
2.6.4 Materiales.....	123
2.6.5 Procedimiento	124
2.6.6 Observaciones y resultados	124
2.7 Metabolismo Microbiano: Pruebas Bioquímicas	124
2.7.1 Introducción.....	124
2.7.2 Identificación del Género <i>Staphylococcus</i>	125
2.7.3 Esquema de identificación de bacterias Gram Positivas ...	129
2.8 Pruebas Bioquímicas para Identificación De Microorganismos de la Familia Enterobacteriaceae.....	132
2.8.1 Introducción.....	132
2.8.2 TSI (Triple Azúcar Hierro).	132
2.8.3 Descarboxilasas	133
2.8.4 Ureasa.	133
2.8.5 Movilidad	134
2.8.6 Indol.....	134
2.8.7 Producción de ácido sulfhídrico (H ₂ S)	135
2.8.8 Utilización de Citrato.....	135
2.8.9 Rojo metilo.....	135
2.8.10 Prueba Voges Proskauer.....	136
2.8.11 Prueba de oxidasa.....	136
2.9 Cinética de Crecimiento Microbiano	138
2.9.1 Introducción.....	138
2.9.2 Objetivos.....	140
2.9.3 Métodos	140
2.9.4 Procedimiento	141
2.9.5 Interpretación.....	141

2.10 Evaluación de Desinfectantes Usados en la Industria Láctea y Cárnica: Hipoclorito de Sodio.....142

2.10.1 Introducción.....	142
2.10.2 Objetivos.....	145
2.10.3 Materiales por grupo.....	145
2.10.4 Procedimiento	146

2.11 Antibiograma por el Método de Kirby-Bauer147

2.11.1 Introducción.....	147
2.11.2 Objetivos	147
2.11.3 Materiales por grupo	148
2.11.4 Procedimiento	148
2.11.5 Interpretación.....	151

2.12 Cultivo y Coloración de Hongos (Lactofenol).....153

2.12.1 Introducción.....	153
2.12.2 Objetivos.....	155
2.12.3 Materiales.....	155
2.12.4 Metodología.....	155
2.12.5 Procedimiento para Microcultivo de Hogos.....	156

CAPÍTULO 3. Microbiología de alimentos de origen zootécnico 161

3.1 Análisis Microbiológico General162

3.1.1 Identificación de bacterias Gram-positivas.	162
3.1.2 Recuento de mesófilos aerobios.....	171
3.1.3 La familia Enterobacteriaceae.	171
3.1.4 Identificación de <i>Escherichia coli</i>	176
3.1.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	177
3.1.6 <i>Salmonella</i> sp.	178
3.1.7 Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor (Jurado, H. et al., 2021).....	180
3.1.8 Identificación de <i>Listeria</i> sp.....	181

3.2 Antibióticos en Carne182

3.3 Antibióticos en leche.....184

3.3 Determinación de Vomitoxinas.....187

3.4 Recuento de Hongos y Levaduras.189

3.4.1 Prueba de la reducción de colorantes (azul de metileno)..	190
3.4.2 Prueba de la resazurina.	191

CAPÍTULO 4. Procesos biotecnológicos aplicados a la Microbiología Zootécnica..... 194

4.1 Reconstitución, Conservación, Siembra y Cultivos de Bacterias Ácido Lácticas.	195
4.2 Cinéticas de fermentación de bacterias lácticas. ...	197
4.2.1 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/mL	197
4.2.2 Determinación de pH.	198
4.2.3 Determinación de proteínas	198
4.2.4 Determinación de Consumo de Azúcares Totales.....	199
4.3 Determinación de producción de acidez	199
4.4 Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de NaCl.....	200
4.5 Evaluación de la producción de biomasa	200
4.6 Microencapsulación de las bacterias ácido lácticas.	201
4.7 Evaluación del microencapsulado	202
4.7.1 Estudio de supervivencia y estabilidad	202
4.7.2 Viabilidad.....	205
4.7.3 Humedad.....	205
4.7.4 Actividad de agua.....	205
4.7.5 Solubilidad.....	206
4.7.6 Humectabilidad.....	206
4.7.7 Eficiencia de la microencapsulación	206
4.8 Pruebas <i>in vitro</i>.....	207
4.8.1 Resistencia a diferentes niveles de temperatura.	207
4.8.2 Producción de gas.....	207
4.8.3 Actividad de catalasa.....	207
4.8.4 Crecimiento de la BAL a diferentes concentraciones de NaCl.	207
4.8.5 Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas....	208
4.8.6 Análisis de resistencia y liberación a jugos gástricos e intestinales.	209
4.8.7 Verificación de producción de exopolisacáridos (EPS) (Fajardo, I. 2022).	211
4.8.8 Detección de capacidad amilolítica.....	212
4.8.9 Ensayo de antagonismo bacterial.....	212

4.8.10 Capacidad de adherencia al epitelio intestinal	
– ensayos <i>Ex Vivo</i>	214
4.8.11 Evaluación in vivo.....	215
4.8.12 Simulación <i>in vitro</i> del tránsito gastrointestinal.	216

CAPÍTULO 5. Microbiología de alimentos balanceados y el agua 220

5.1 Microbiología de alimentos balanceados	221
5.2 Microbiología del agua.....	225

CAPÍTULO 6. Microbiología Predictiva 228

Introducción a la Microbiología Predictiva.....	229
---	-----

6.1. Conceptos Clave230

6.1.1 Importancia en la Seguridad Alimentaria	231
6.1.2 Aplicación Práctica en la Industria Alimentaria	232

6.2 Modelos Predictivos en Microbiología de Alimentos.....233

6.2.1. Tipos de Modelos Predictivos	233
---	-----

6.3. Desarrollo y Validación de Modelos Predictivos235

6.4. Fundamentos del Desarrollo de Modelos Predictivos236

6.4.1. Recolección de Datos Experimentales	236
--	-----

6.5. Construcción de Modelos Primarios237

6.5.1. Curvas de Crecimiento Microbiano.....	237
--	-----

CAPÍTULO 7. Cultivos Celulares..... 239

7.1 Ventajas del cultivo celular.....	240
7.2 Desventajas del cultivo celular.....	241
7.3 Usos y aplicaciones de los cultivos celulares.....	242
7.4 Medios de cultivo	243
7.5 Fases del cultivo.....	244

7.6 tipos de cultivos celulares	245
7.6.1. Cultivos en monocapa.....	245
7.6.2 Cultivos en suspensión.....	246
7.6.3 Cultivos primarios.....	247
7.6.4 Cultivos secundarios.....	247
7.6.5 Cultivos tridimensionales.....	248
7.6.6 Cultivos continuos o líneas celulares.....	248

CAPÍTULO 8. Probióticos en la industria alimentaria.. 251

8.1 Historia de los probióticos y prebióticos.....	252
8.2 Aplicación de los probióticos productos alimentarios	254
8.2.1 Probióticos en lácteos.....	254
8.2.2 Yogures y leches fermentadas	254
8.2.3 Quesos	256
8.2.4 Productos congelados	257
8.3 Probióticos en carne.....	258
8.4 Probióticos en matrices vegetales.....	262
8.4.1 Probióticos en matrices vegetales.....	264
8.5 Probióticos en chocolate	266
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	270

Los Autores	289
--------------------------	------------

Introducción

Esta Segunda Edición del Libro denominado: **“PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA”**, se ha actualizado en todos los conceptos relacionados con las diferentes prácticas que a nivel de laboratorio se pueden realizar dentro de la Zootecnia. Por estas razones, se brindan con bastante claridad y enfoque científico en un lenguaje claro y sencillo, que permite a sus lectores comprender con bastante seguridad la importancia del contenido de este Libro.

De igual manera, se presentan con un mayor énfasis y conceptos científicos bastante precisos muchas de las metodologías, técnicas y procedimientos desde la microbiología general y que hace que se entienda la importancia de estudiar y comprender *in vitro* todas las características básicas de los microorganismos y en especial, las bacterias. Siguiendo este contexto, también se aprecia con bastante claridad los análisis que se pueden realizar en todos los productos y subproductos tanto de origen animal y vegetal, así como en la gran variedad de alimentos balanceados y el agua, entre algunos que se mencionan en este Libro. Por otra parte, este texto permite entender la aplicación de las bacterias ácido lácticas (BAL) tanto *in vitro* como *in situ* en la Producción Animal, como una rama fundamental de la Zootecnia y de otras profesiones afines.

Todo lo anterior, permitirá comprender para los Docentes, estudiantes y productores el manejo y normas de bioseguridad que se debe llevar a cabo en un Laboratorio de Microbiología Zootécnica, y por lo tanto, ayudará a que todos los objetivos y conocimientos se logren con el mayor éxito posible.

Esta Segunda Edición del Libro denominado: **“PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA”**, se encon-

trarán los siguientes capítulos: Capítulo 1. Normas de trabajo de laboratorio; Capítulo 2. Prácticas de microbiología general; Capítulo 3. Microbiología de alimentos de origen zootécnico; Capítulo 4. Procesos biotecnológicos aplicados a la microbiología zootécnica; Capítulo 5. Microbiología de alimentos balanceados y el agua; Capítulo 6. Microbiología predictiva; Capítulo 7. Cultivos celulares; Capítulo 8. Probióticos en la industria alimentaria.

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOTÉCNICA**

CAPÍTULO 1.

**Normas de Trabajo
de Laboratorio**



1.1 Recomendaciones para el Trabajo en Laboratorio

1.1.1 Introducción

En el Laboratorio de Microbiología Zootécnica se enfrentan algunos peligros que deben considerarse para disminuir los riesgos de accidentes. Se pueden clasificar estos riesgos en: **biológicos** (virus, hongos, parásitos o bacterias), y en **no biológicos**, éstos últimos incluyen los riesgos químicos (solventes inflamables o cáusticos), físicos (cortaduras), eléctricos (descargas eléctricas por enchufes o cables en mal estado), y quemaduras; que son comunes a otros laboratorios (Jurado-Gámez et al., 2021; Ricke et al., 2015).

El estudio de los microorganismos que pueden ser patógenos para humanos, animales, plantas y otras formas de vida, trae consigo ciertos riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados (Bruno-Salabarría & Fuentes-Bedoya, 2020).

1.1.2 Objetivos

- Identificar los posibles riesgos que se pueden presentar antes, durante y después del desarrollo de prácticas en el Laboratorio de Microbiología Zootécnica.

1.1.3 Marco teórico

De acuerdo con Navarro (2018), un laboratorio debe garantizar un buen uso y conservación de los elementos y equipos, así como la seguridad de estudiantes, docentes y auxiliares que se encuentren en el laboratorio. Esto ayudará a alcanzar el objetivo general planteado para el laboratorio. Las siguientes normas deben realizarse de la siguiente manera:

- 1.** Usar siempre bata de laboratorio de manga larga y anti-fluidos, guantes desechables, gorro o cofia y tapabocas (preferiblemente KN95).
- 2.** Al iniciar el trabajo de laboratorio, leer la Guía de la Práctica de laboratorio que va realizar y hacer el plan de trabajo.

- 3.** Los mesones deben ser limpiados y desinfectados al inicio y al final de las sesiones de trabajo. Se debe realizar con soluciones desinfectantes como alcohol o hipoclorito de sodio.
- 4.** Las manos deben ser desinfectadas al inicio y al final de cada laboratorio.
- 5.** Se debe esterilizar las asas bacteriológicas con el mechero hasta que el alambre tome un color rojo vivo, antes y después de su uso.
- 6.** Cada equipo de estudio tendrá un microscopio y otros equipos y materiales que deben manejar y cuidar adecuadamente ya que éstos serán usados durante todo el curso en su semestre académico o durante su investigación.
- 7.** Incluir en las prácticas los siguientes implementos de uso personal.
 - Bata de laboratorio.
 - Gorro o cofia.
 - Guantes desechables.
 - Gafas de protección.
 - Gel o jabón antibacterial.
 - Libreta de notas.
 - Porta- objetos
 - Cubre-objetos
 - Marcador de vidrio o lápiz vidriograf.
 - Encendedor.
- 8.** No comer, beber o fumar dentro del laboratorio.
- 9.** No pipetear con la boca, utilizar pipeteadores (manuales o automáticos).
- 10.** Si se derrama material contaminado, aplicar toallas de papel y humedezca la mesa con compuestos bactericidas (Alcohol o hipoclorito de sodio).
- 11.** Los materiales contaminados se deben poner en recipientes adecuados para su posterior esterilización y/o desecho.

- 12.** Se debe informar de manera inmediata al Profesor de cualquier accidente, como quemadura, cortadura o derrame de medio de cultivo. Se debe tomar precaución en la manipulación y manejo de reactivos para disminuir algún accidente.
- 13.** Después de realizar las respectivas lecturas de los cultivos deséchelos en los recipientes disponibles para este fin, o devuélvalo al laboratorista encargado.
- 14.** Al concluir cada práctica, todos los reactivos y equipos deben estar ordenados y en sus lugares correspondientes.

1.1.3.1 Limpieza

Todo Laboratorio de Microbiología debe seguir unas normas estrictas de limpieza por parte del personal que maneja el laboratorio (incluye a los estudiantes y auxiliares).

De acuerdo con Navarro (2018) estas normas son las siguientes:

- Limpieza general del espacio físico (pisos, paredes, mesas, lavadero, etc.) con agua, jabón, hipoclorito de sodio y alcohol etílico al 70% para minimizar los contaminantes del ambiente.
- Limpieza periódica de incubadoras, estantes, estufas, rejilla de aire acondicionado y demás equipos.
- Esterilización completa de toda la vidriería, morteros, asas, etc.
- Eliminar inmediatamente después de concluida una práctica de laboratorio todos los materiales de desecho que puedan ser foco de contaminación, teniendo en cuenta la clasificación de los tipos de residuos y que pueden constituir una fuente de contaminación cruzada, tanto directa como indirecta.

1.1.3.2 Bioseguridad en el laboratorio

El laboratorio tiene riesgos que se deben considerar para disminuir los accidentes. Estos se pueden clasificar como Riesgos Biológicos y Riesgos No Biológicos (Linda & García, 2020).

El estudio de los microorganismos que pueden ser patógenos para el hombre, los animales u otras formas de vida y que también son causantes de toxiinfecciones y/o enfermedades de transmisión alimentaria (ETA), trae consigo ciertos riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados (Jaramillo-Prado, 2018).

De acuerdo con Ballesteros et al., (2009) la ocurrencia de un accidente causado por un agente biológico, fundamentalmente deben existir cuatro elementos:

- Una persona enferma.
- Un agente patógeno.
- Una cantidad adecuada de este.
- Una vía de transmisión adecuada.

De todos ellos, el que mejor se puede controlar en el laboratorio es la ruta de transmisión, dentro de estas, las más comunes son la aérea y la inoculación directa, aunque la oral, la percutánea y el contacto directo con la piel o las mucosas también son posibles (Gamboa-Capacho, 2019).

Asimismo, es relevante tener en cuenta que debido a la pandemia de COVID-19, ocurrida en el año 2020, en el mundo y unos de los lugares, donde se han implementado estas medidas de control por agentes biológicos han sido los laboratorios tanto de investigación como de aplicación.

1.1.3.3 Seguridad biológica

Con el fin de reducir a un bajo nivel de riesgo biológico todo agente peligroso, las Normas de Seguridad Biológica (NSB) establecen distintos grados de riesgo.

De acuerdo con lo anterior, la NSB establecen tres elementos:

- **Procedimientos de Laboratorio.** Hacen referencia a las prácticas y técnicas microbiológicas que se realizan tanto dentro como fuera del laboratorio. Un monitoreo adecuado de estas actividades ayuda a minimizar los riesgos biológicos. Un adecuado monitoreo de las mismas contribuye a reducir los riesgos biológicos.

- **Equipo de seguridad.** Se incluyen los dispositivos o aparatos que permiten la bioseguridad como son las cabinas de flujo laminar y las cabinas de seguridad biológica, de igual manera, toda prenda de protección personal como zapatos, bata, guantes y mascarilla.
- **Diseño y construcción de la instalación.** En este aspecto influirá los tipos de agentes infecciosos que se manejen en el laboratorio. Lo anterior lleva a una separación por zonas, según las actividades que se realizan (preparación de medios de cultivo, siembra, autoclaves, y sistemas para descontaminar, filtrado del aire de salida al exterior, etc. (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

El equipo y cómo se diseña el Laboratorio de Microbiología aportan a la seguridad únicamente si los empleados están motivados, están al tanto de las regulaciones de seguridad y las implementan. La actitud y el modo de proceder de sus trabajadores determinan su propia seguridad, así como la de sus compañeros y la de la colectividad (Pírez et al., 2020).

De nada sirve la mejor ingeniería sanitaria, un óptimo diseño arquitectónico o la tecnología más avanzada si el personal desconoce o incumple las medidas establecidas para su seguridad (Pírez et al., 2020).

La formación es un componente clave para el éxito de los programas de seguridad y debe ser brindada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio, como los trabajadores de laboratorio, personal de mantenimiento, de limpieza, entre otros.

1.1.3.4 Reduciendo los accidentes mediante el factor humano

Al respecto, McCormick & Sanders (2022), mencionan que el nivel de riesgo dependerá de estado de ánimo del personal, las metodologías utilizadas y el tipo de infraestructura del laboratorio. Los accidentes son consecuencias de distintas causas, pero en muchos casos, son consecuencia de error humano, y que se pueden evitar muy fácilmente. Por lo anterior, el factor humano es clave como elemento de prevención de accidentes:

- Estar atento a situaciones de irritación y ansiedad, que puedan llevar al apresuramiento.
- Identificar problemas de tensión por el trabajo.
- Detenerse a investigar las causas de un accidente menor ocurrido antes y que sea el precursor de uno con mayor impacto.
- Estar atentos a la despreocupación por parte del personal hacia formas de riesgo.
- Determinar que los cambios (p.e. Fallecimiento de un familiar, cambio de trabajo), son factores particulares que pueden generar accidentes.

Para disminuir el riesgo de accidente se debe tener en cuenta algunos aspectos:

- Identificar los elementos de riesgo.
- Saber cómo gestionarlos de manera adecuada.
- Usar los equipos de seguridad necesarios y aplicar técnicas que reduzcan los riesgos.
- Aceptar las recomendaciones de personas con experiencia en el trabajo de laboratorio.
- Comunicar esas recomendaciones a los nuevos integrantes del laboratorio.
- Exigir a los profesores o al personal encargado la implementación de medidas de protección.
- Limitar el acceso de visitantes o personas que no estén familiarizadas con las normas de bioseguridad del Laboratorio de Microbiología.

Si, el accidente se presenta a pesar de todas las sugerencias, se debe identificar que hacer, con quién y a dónde se debe acudir para tomar los correctivos en forma inmediata.

1.1.3.5 Elementos de riesgo

- **Manos.** Son una alta fuente de contaminación, están en contacto con la suciedad no se suele ser consciente de sus movimientos y donde se ponen en contacto con las mucosas oral y ocular, principales puertas de ingreso de microorganismos patógenos. Cuando se está utilizando los laboratorios se deben tener ciertas precauciones, como la de poner en contacto objetos con la boca, debido a que normalmente se colocan en cualquier parte pudiéndose contaminar con bacterias presentes en la superficie de otros objetos.

Un avance crucial para salvaguardar nuestra salud consiste en tomar e implementar en las clases la "Regla de los Cuatro NO" (Primera Regla de Oro de la Bioseguridad), en la que se resalta que dentro de un laboratorio no se debe:

- ▶ Entrar maquillado
- ▶ Consumir alimentos
- ▶ Consumir bebidas
- ▶ Fumar

Para llevar a cabo estas actividades, deben haber lugares específicos para ello, además de elementos de oficina y lectura.

Como un hábito cotidiano y de manera reiterada, es necesario lavar con jabón las manos (preferentemente líquido), las veces que se requiera. Considerando que las manos son propensas a ser objeto de pinchazos, heridas y abrazos. Se aconseja usar guantes al realizar ciertas actividades, ya que la probabilidad de que suceda lo anterior es más alta. Se requieren dos prácticas al utilizar guantes: lavar con jabón y su retirada de las manos cuando se vayan a realizar otras tareas diferentes a las que se están realizando, como, por ejemplo, levantar el teléfono (McCormick & Sanders, 2022).

- **Cabello.** Debe usarse corto o recogido durante el trabajo, en ciertos laboratorios donde se manejan medicamentos o sustancias altamente susceptibles a contaminación se recomienda el uso de cofias.

- **Uso de ropa protectora.** La utilización de bata de laboratorio evita perjuicios más graves, como salpicaduras con tintes, materiales infecciosos o contaminados. Esta vestimenta necesita ser higienizada de manera regular y debe utilizarse únicamente y exclusivamente en el laboratorio.
- **Protección de ojos.** Si se manipulan materiales corrosivos, es aconsejable utilizar gafas de protección o máscaras para reducir la posibilidad de que la córnea sufra daños por salpicaduras o exposición a vapores químicos. Es importante trabajar bajo campana, al manipular solventes, como también tener a mano soluciones y dispositivos especiales para el enjuague de los ojos (Leal et al., 2021).
- **Otras medidas de protección.** En las actividades habituales del laboratorio se producen aerosoles, y dado que la mayoría de las bacterias y virus ingresan al organismo a través de las vías respiratorias, es necesario prevenir su entrada, por ello se hace necesario usar mascarillas apropiadas. Adicionalmente, esto evita contaminar los cultivos, pues no siempre se tiene disponible una cámara de flujo laminar que evite el ingreso de los microorganismos presentes en boca y/o nariz. Se debe evitar el pipeteo manual con la boca, por lo que es indispensable utilizar pipetas automáticas, propipetas (peras de goma), dispensadores, etc.

Otra regla importante, considerada la segunda regla de oro de la bioseguridad es **"Suponer que toda muestra es potencialmente peligrosa y tratarla como tal"**

1.1.3.6 Otras recomendaciones

- Proteger cableado eléctrico de sobrecargas, usando estabilizadores y masa a tierra.
- Emplear tomacorrientes sencillas en vez de conexiones variadas.
- Situar los interruptores en sitios de fácil acceso.
- Emplear radiadores con válvula de protección.
- Realizar revisiones periódicas de los cortapicos.

- Conservar los corredores libres de impedimentos que ayuden a interferir con las salidas.
- Por lo general, el trabajo del Microbiólogo en el Laboratorio se basa en aislar e identificar microorganismos que, en ciertas situaciones, pueden ser patógenos. Para aislar el microorganismo relevante, es necesario manipular elementos estériles (asas, medios de cultivo, vidrio, recipientes, etc.), y tratar las muestras de manera meticulosa, ya que podrían ser portadores de microorganismos dañinos (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).
- En los laboratorios de docencia, es fundamental aplicar las medidas básicas de bioseguridad y reforzarlas al máximo al manipular microorganismos con potencial letal.

1.1.3.7 Precauciones en el manejo de material biológico

De acuerdo con Estacio et al., (2020), en los Programas de posgrado en bioquímica y biología molecular: Una sesión paralela en la conferencia IUBMB/PSBMB 2019 “Aprovechamiento de la educación interdisciplinaria en bioquímica y biología molecular”, se deben manejar las siguientes precauciones:

- Utilizar dispositivos mecánicos para el pipeteo.
- Disponer en los laboratorios desinfectante para manos y mesones.
- Disponer los materiales contaminados, luego de desinfectados en los lugares dispuestos para ello.
- Desechar el material contaminado en el lugar indicado, como por ejemplo en los guardianes.
- Los procesos de incubación deben llevarse a cabo durante el lapso de tiempo sugerido, evitando la presencia innecesaria de material contaminado en las incubadoras.
- Antes de eliminar los materiales utilizados, se deben esterilizar o incinerar.
- Una recomendación final y que deriva de la experiencia de trabajar en un Laboratorio de Microbiología y es siempre

estar en constante observación con el entorno del laboratorio, ya que la práctica continúa permite detectar y corregir aspectos tanto del funcionamiento de todos los equipos, parte eléctrica, instalaciones de gas, caducidad de medios de cultivo, reactivos, etc., que en cualquier momento pueden favorecer el inadecuado manejo de todo material biológico.

1.1.3.8 Categoría de los agentes biológicos según su nivel de riesgo

Según Estacio et al. (2020), para el riesgo que presentan los microorganismos infecciosos, se establece la siguiente clasificación de acuerdo al nivel de riesgo:

- **Grupo I.** Es el que tiene poca posibilidad de provocar enfermedades tanto en el individuo como en la comunidad.
- **Grupo II.** Son agentes que suelen provocar diversas enfermedades en el ser humano y puede representar un riesgo para los manipuladores, con una baja probabilidad de su propagación a la comunidad y usualmente es necesario un tratamiento o profilaxis efectivo.
- **Grupo III.** Son agentes que provocan enfermedades muy severas en el individuo y representa un riesgo significativo para los manipuladores, pudiendo provocar el fallecimiento, con el riesgo de que se propague a la comunidad y requiriendo normalmente una profilaxis o un tratamiento efectivo.
- **Grupo IV.** Es aquel que causa una enfermedad grave en los seres humanos, representa un alto riesgo para los trabajadores, tiene una alta probabilidad de propagación a la comunidad y, por lo general, no dispone de profilaxis ni tratamiento efectivo.

1.1.3.9 Categorización de los laboratorios según su nivel de bioseguridad.

- **Nivel 1.** Agentes que no son dañinos para el ser humano. Se refiere al grado de seguridad necesario para los microorganismos del grupo I, o sea, aquellos que no causan

enfermedades en individuos saludables y con susceptibilidad estable y conocida a los antimicrobianos. Se utiliza comúnmente en los laboratorios para el desarrollo de clases en la universidad o centros de investigación en los que se utilizan microorganismos con baja patogenicidad. Es necesario laborar bajo microorganismos con baja patogenicidad. Ejemplos típicos son: todos aquellos microorganismos importantes y conocidos en la industria alimenticia (Zúñiga-Carrasco & Reyna, 2021).

- **Nivel 2.** Agentes microbianos y procesos con un riesgo moderado. Los agentes trabajados pertenecen al grupo II, microorganismos que de forma habitual están en el hombre, tienen la capacidad de generar patología infecciosa humana en la categoría de limitada o moderada. Deben ser manipulados por personal especializado y son los que con más frecuencia se estudian en laboratorio de microbiología clínica: *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la Hepatitis B, etc. (Zúñiga-Carrasco & Reyna, 2021).

Para este nivel hay otros aspectos que se debe considerar:

- » Las áreas con riesgo deben ser limitadas al personal, prohibiendo el ingreso a individuos que, por algún motivo, tienen un incremento en el riesgo de infección (como personas con inmunodeficiencia).
- » En la entrada al laboratorio se colocarán indicativos de riesgo biológico, términos de entrada y los encargados de él (nombre, teléfono y domicilio).
- » Es necesario que el personal esté vacunado (si corresponde) y capacitado para evitar accidentes y actuar adecuadamente en caso de que sucedan.
- » Administración constante de roedores e insectos.
- » Prevenir la utilización de jeringas o cualquier otra acción que produzca aerosoles.

- » Siempre se deben considerar las muestras como potencialmente infectadas y considerar las precauciones mencionadas.
- » También, es fundamental que haya una continua comunicación con las diferentes dependencias u oficinas que tengan que ver con la recolección o manipulación de material de desecho y que es fundamental sea retirado del laboratorio después de su uso y posteriormente, ser eliminado, según lo dispongan las autoridades ambientales y /o sanitarias.
- **Nivel 3.** En este nivel se trabaja con agentes biológicos del grupo III, microorganismos que causan enfermedades graves, requieren tratamientos complicados y prolongados, pueden dejar secuelas y, en algunos casos, provocar la muerte. En su manejo se utilizan procedimientos laborales para minimizar el elevado riesgo de infección. Los laboratorios clínicos pertenecen a este nivel (Benítez-Campo y Bolaños, 2018).
- **Nivel 4.** Procedimientos con microorganismos exóticos y/o de alto riesgo. Este grupo es necesario cuando se procede de manera segura y se presume de un microorganismo patógeno e infectocontagante, ya sea exótico o no, que genera un agente altamente patógeno e infectocontagioso, ya sea exótico o no, que provoca una alta tasa de mortalidad y para el cual no existe tratamiento o este tiene baja efectividad. Usualmente, se trata de microorganismos con baja dosis de infección y elevada contagiabilidad. En algunos casos el nivel puede emplearse para manejar animales de laboratorio que han sido infectados con microorganismos pertenecientes al grupo IV.

Debe desempeñarse en un laboratorio especial de alta seguridad, donde se requiere duchas y cambios de vestimenta para ingresar y salir y, donde hay obstáculos para el aire exterior (ver figura 1). El manejo del material limpio y contaminado se realiza por canales altamente controlados (Moreno et al., 2011).

Ejemplos de agentes para este nivel incluyen los virus del Ébola, el virus de la fiebre aftosa, el virus del VIH y el virus de Marburgo. Además, este nivel de contención requiere la inclusión de microorganismos característicos del grupo 3 que desarrollan características patógenas que los posicionan en el grupo 4. Un caso ilustrativo sería *Mycobacterium bovis* multirresistente, el cual puede provocar muertes debido a un fracaso terapéutico.

Figura 1. Cámara de flujo laminar.

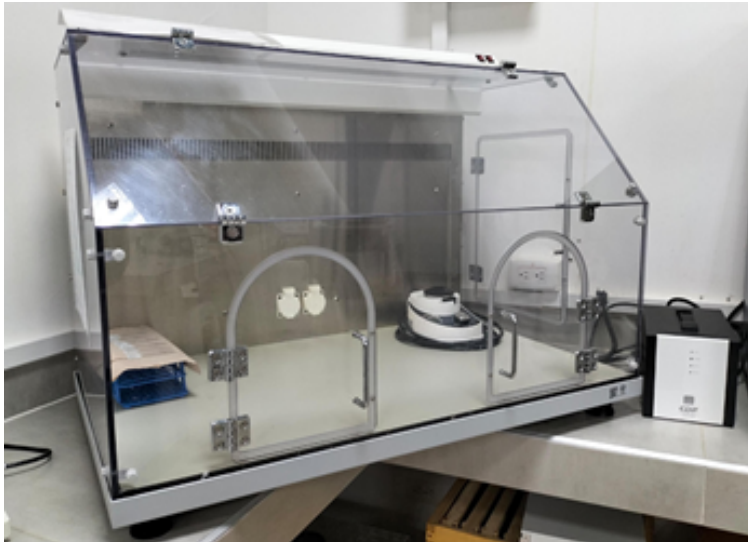


Figura 2. Infografía Cámara de flujo laminar.

Cámara de flujo laminar.

¿Qué es?

Es un equipo de laboratorio diseñado para proporcionar un ambiente libre de contaminación, utilizando un flujo de aire unidireccional filtrado por HEPA o ULPA para eliminar partículas microscópicas.



¿Para qué se usa?

- Protección de muestras sensibles en microbiología y biotecnología.
- Manipulación de cultivos celulares sin riesgo de contaminación.
- Preparación de medios de cultivo en investigación.
- Trabajo con materiales estériles en farmacología y electrónica.

¿Cómo funciona?

Filtración de aire: El ventilador impulsa aire a través de un filtro HEPA.

Creación de flujo laminar: El aire limpio se mueve de manera uniforme sobre la superficie de trabajo.

Protección de muestras: Se evita la contaminación externa y la suspensión de partículas.

Ventajas:

- ✓ Ambiente estéril para procedimientos delicados.
- ✓ Reducción de contaminación en muestras y cultivos.
- ✓ Mayor seguridad en la manipulación de materiales biológicos.
- ✓ Cumplimiento de normas de bioseguridad en laboratorios.

1.1.3.10 Normas para la vigencia de los trabajadores que manipulan microorganismos en el nivel de bioseguridad 1.

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud [OMS], (2005), la experiencia sugiere que estos microorganismos poseen escasas posibilidades de causar enfermedades humanas o de relevancia veterinaria en animales. Sin embargo, lo más conveniente es llevar a todo el personal a un examen médico antes de la contratación, donde se registren los historiales médicos de cada individuo. Conviene que se notifiquen rápidamente las enfermedades o accidentes de laboratorio y que todos los miembros del personal comprendan la importancia de aplicar técnicas microbiológicas apropiadas.

1.1.3.11 Normas para la vigencia de los trabajadores que manipulan microorganismos en el nivel de bioseguridad 2.

- Es esencial el reconocimiento médico antes de trabajar o asignarse a un cargo. Es necesario documentar el expediente médico del individuo y llevar a cabo una valoración de la salud laboral para los propósitos del laboratorio.
- El jefe del laboratorio tiene la responsabilidad de llevar un seguimiento de enfermedades y ausencias de trabajo.
- Es necesario informar a las mujeres en etapa de gestación sobre los peligros que implica para el feto la exposición profesional a determinados microorganismos, como el virus de la rubéola. Las acciones específicas que se implementen para salvaguardar al feto estarán sujetas a los microorganismos a los que la mujer pueda estar expuesta.
- Actualmente, y dadas las experiencias generadas por la pandemia del COVID-19 en el año 2020, las medidas de bioseguridad se han incrementado notablemente.

Capacitación. Los errores de las personas y el uso equivocado de las técnicas pueden amenazar hasta las mejores estrategias para salvaguardar al equipo de laboratorio. Así que, el factor clave para prevenir infecciones adquiridas, incidentes y accidentes en el laboratorio es contar con un equipo adecuado de trabajo comprometido con la seguridad y bien capacitado en cómo identificar y luchar contra los riesgos que supone su labor en ese ambiente. Por lo tanto, es fundamental la formación constante en el servicio sobre las medidas de seguridad. El proceso se inicia con el equipo directivo, que tiene la responsabilidad de asegurar que los procedimientos y prácticas de seguridad en el laboratorio sean parte integral de la formación fundamental de los trabajadores. La educación en medidas de seguridad siempre debe incluirse en la formación inicial de los empleados recién incorporados (OMS, 2005). Además, debe ponerse a disposición del personal el código de prácticas y las directrices locales, incluido el manual de seguridad o de operaciones (Job et al., 2023).

De acuerdo con Anchante (2010), la capacitación del personal a trabajar, debe incluir, la formación del personal, las instrucciones de técnicas seguras para el uso de procedimientos peligrosos que usualmente impactan a todo el equipo del laboratorio y que conllevan los siguientes riesgos:

- Riesgo de inhalación (es decir, formación de aerosoles): uso de asas, siembra de placas de agar, pipeteo, preparación de frotis, apertura de recipientes de cultivo, toma de muestras de sangre/suero, centrifugación entre otros. (OMS, 2005).
- Peligro de ingerir accidentalmente sustancias al trabajar con muestras, frotis o cultivos.
- Posibilidad de perforación cutánea accidental durante el uso de agujas y jeringas.
- Exposición a mordidas o rasguños durante el manejo de animales vivos.
- Contacto con sangre u otros fluidos biológicos que representan riesgos para la salud.
- Protocolos de limpieza y gestión segura de residuos con agentes infecciosos.

Manipulación de desechos. De acuerdo con Anchante (2010), Se considera desecho todo aquello que de origen debe descartarse. Dentro del laboratorio, la desinfección y la destrucción de desechos se encuentran muy relacionados. Se debe tener en cuenta que la cristalería, los instrumentos y la ropa se reutilizan en el laboratorio. La mayoría de los elementos de vidrio, utensilios e indumentaria utilizados en el laboratorio son reutilizados o reciclados tras su uso. El principio fundamental es que todo el material infeccioso debe ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado dentro del laboratorio. (Ñacato-Anchaluisa, 2022).

Para tener, una mejor selección y manejo, se debe realizar las siguientes preguntas, antes de eliminar algún objeto o material que se encuentre en el laboratorio:

1. ¿Fueron los instrumentos o elementos tratados con un protocolo autorizado para asegurar su descontaminación o esterilización?
2. En caso contrario, ¿se han empaquetado mediante un procedimiento autorizado para su incineración inmediata in situ o para ser transferidos a un laboratorio con capacidad de incineración?
3. ¿La eliminación de objetos o materiales descontaminados representa algún otro riesgo, biológico o de otro tipo, para quienes realizan la eliminación inmediata o para aquellos que puedan entrar en contacto con los objetos o materiales desechados fuera del laboratorio? (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

Descontaminación. El uso de la autoclave constituye una de las técnicas mayormente utilizadas en el proceso de descontaminación. El material destinado a la descontaminación y eliminación debe introducirse en recipientes (por ejemplo, en bolsas de plástico resistentes al tratamiento en autoclave) que tengan un código de color para indicar si el contenido ha de pasar a la autoclave o a la incineración (Theel & Schuetz, 2022).

Procedimientos de manipulación y eliminación de material y desechos contaminados. De acuerdo con ICA (2007), se debe disponer de un sistema para la identificación y segregación del material infeccioso y sus contenedores. Se aplicarán las regulaciones nacionales e internacionales vigentes, considerando las siguientes clasificaciones de residuos:

- Residuos no infecciosos: Aquellos que no presentan contaminación y pueden reutilizarse, reciclarse o desecharse como residuos comunes.
- Elementos punzocortantes infectados: Incluyen agujas hipodérmicas, bisturíes, cuchillas o vidrios rotos, los cuales deben almacenarse en contenedores resistentes a perforaciones con cierre hermético y manejarse como desechos infecciosos.

- Material infectado para reprocesamiento: Elementos que serán sometidos a autoclave para posteriormente ser lavados, reutilizados o reciclados.
- Material infectado para eliminación controlada: Residuos que, tras tratamiento en autoclave, serán dispuestos como desecho seguro.
- Material infectado para destrucción térmica: Residuos que requieren incineración inmediata sin procesos previos.
- En este sentido, es muy importante que se disponga en el Laboratorio de Microbiología de los llamados “puntos ecológicos”, que según su uso, bien dispuestos de recipientes de colores (blanco, negro, rojo), que corresponden a una clasificación específica para la eliminación de los diferentes tipos de desechos.

Objetos cortantes y punzantes. De acuerdo con OMS (2005), las agujas hipodérmicas no se deben volver a tapar, cortar ni retirar de las jeringuillas desechables después de utilizarlas. Todo el equipo debe ser depositado en un contenedor específico para su eliminación. Las jeringas desechables, ya sea con o sin aguja, deben colocarse en contenedores especializados y posteriormente ser incineradas. Además, si es necesario, se esterilizarán previamente en autoclave.

Material contaminado (potencialmente infeccioso) que debe ser procesado en autoclave para su tratamiento y posterior reutilización. No se realizará ningún tipo de limpieza en materiales contaminados (potencialmente infecciosos) destinados a tratamiento en autoclave y posterior reutilización. Toda limpieza o reparación necesaria se llevará a cabo únicamente después del proceso de autoclave o desinfección.

Material potencialmente infeccioso destinado a su eliminación. Además de los elementos punzocortantes previamente señalados, todos los residuos infecciosos (con posible riesgo biológico) deberán depositarse en contenedores herméticos (como bolsas plásticas resistentes a procesos de autoclave, identificadas mediante códigos cromáticos) y sometidos a un ciclo de

esterilización en autoclave previo a su disposición final. Tras este proceso, los materiales podrán almacenarse en envases certificados para su traslado a unidades de incineración. Idealmente, los desechos generados en entornos clínicos, incluso aquellos previamente descontaminados, no deberán destinarse a vertederos convencionales bajo ninguna circunstancia. Si se dispone de un incinerador en el laboratorio, no es necesario el tratamiento en autoclave: el material contaminado se coloca en recipientes especialmente marcados y se transporta directamente al incinerador (Job et al., 2023).

Para la gestión de residuos biopeligrosos mediante combustión controlada, es obligatorio obtener el consentimiento formal tanto, de las entidades reguladoras de sanidad y calidad ambiental como del especialista en bioseguridad asignado al centro. Además, este procedimiento debe integrar una validación explícita por parte del equipo técnico del laboratorio antes de su ejecución.

Código de prácticas. Como referencia, Ramos et al. (2021), destacan que los protocolos estándar de laboratorios fundamentales (correspondientes a las clasificaciones BSL-1 y BSL-2) conservan su aplicabilidad en esta situación, aunque requieren ajustes particulares que se detallan a continuación:

Identificación de riesgos en accesos:

- El identificador global de riesgo biológico ubicado en las entradas del laboratorio deberá incluir claramente:
- El nivel de seguridad biológica correspondiente.
- El nombre del responsable a cargo de autorizar el ingreso.
- Requisitos específicos para el acceso (ej.: vacunación obligatoria).

Contención de materiales peligrosos:

- Cualquier procedimiento sin confinamiento que involucre sustancias con posible carga infecciosa deberá ejecutarse exclusivamente dentro de cabinas de aislamiento o equipos de contención primaria certificados.

Protección respiratoria en protocolos especializados:

- El uso de dispositivos de protección para vías respiratorias será obligatorio durante:
- Técnicas de laboratorio con exposición a aerosoles de alto riesgo.
- Manejo de animales infectados con agentes patógenos específicos.

Bioseguridad 4. Laboratorio de alta contención

Las instalaciones de bioseguridad nivel 4 (BSL-4) están diseñadas específicamente para el manejo de agentes biológicos de máxima peligrosidad (categoría IV). El desarrollo e implementación de este tipo de infraestructuras críticas demanda un proceso de asesoramiento exhaustivo con organismos especializados que posean conocimiento práctico en la operación de infraestructuras de contención avanzada. Cuando los laboratorios de contención máxima - nivel de bioseguridad 4 se encuentran en funcionamiento deben ser sometidos al control de las autoridades sanitarias (Wurtz et al., 2016).

Código de prácticas. Los protocolos operativos establecidos para el nivel de bioseguridad 3 (BSL-3) conservan su validez en este contexto, aunque bajo la incorporación de ajustes específicos que se detallan a continuación:

Protocolo de trabajo en equipo obligatorio:

- Se implementará un sistema de colaboración dual, donde todas las actividades dentro del laboratorio deben realizarse con al menos dos operadores capacitados. Esta medida es crítica cuando se manipulan agentes de alto riesgo bajo condiciones de bioseguridad extrema (BSL-4), donde el uso de trajes especializados es mandatorio.

Procedimiento de descontaminación personal:

- El acceso o salida del área restringida exigirá el reemplazo integral del equipamiento protector, incluyendo vestimenta y calzado especializado, para evitar transferencia de contaminantes.

Preparación ante emergencias biológicas:

- Todo el personal debe dominar, mediante programas formativos en gestión de crisis biológicas, los protocolos de evacuación inmediata ante situaciones como deterioro físico abrupto o manifestación de síntomas asociados a exposición patógena.

Sistema de comunicación jerarquizado:

- Se diseñará un mecanismo de intercambio de información bidireccional entre el equipo interno (BSL-4) y el personal externo de soporte, utilizando canales redundantes para garantizar flujo continuo de datos tanto en operaciones rutinarias como en contingencias críticas.

Conceptos de bioprotección en el laboratorio

Los eventos globales recientes, como la crisis sanitaria del COVID-19 en 2020, han puesto de manifiesto la urgencia de resguardar las instalaciones de investigación y sus recursos biológicos frente a acciones que representen amenazas para la salud humana, la fauna, las actividades agropecuarias o los ecosistemas. Previo a establecer los requerimientos de un laboratorio o programa en materia de protección biológica, resulta esencial diferenciar conceptualmente la seguridad biológica (bioseguridad) y la protección biológica (bioprotección).

Bioseguridad: Corresponde al conjunto de protocolos, metodologías y normativas diseñadas para prevenir la exposición involuntaria a agentes patógenos o toxinas, así como su dispersión accidental en el entorno. Este enfoque se centra en medidas técnicas y operativas para contener riesgos durante actividades rutinarias.

Bioprotección: Engloba las estrategias de control institucional y de gestión del personal orientadas a mitigar el riesgo de eventos como el extravío, robo, manipulación inapropiada, desvío o liberación intencionada de materiales biológicos peligrosos. Su objetivo es neutralizar acciones deliberadas o negligentes que comprometan la integridad de los recursos.

Las precauciones de protección deben ser parte de la rutina diaria en el laboratorio, de la misma manera que los protocolos de protección biológica deben integrarse como elementos fundamentales en los protocolos operativos estándar del laboratorio, al igual que las metodologías asépticas y otras prácticas de seguridad microbiológica. Estas medidas no deben obstaculizar el flujo eficaz de recursos de referencia, especímenes médicos o datos epidemiológicos, ni limitar el intercambio de información relevante para estudios clínicos o iniciativas de salud pública. Una administración adecuada de estos protocolos debe equilibrar la seguridad sin entorpecer las rutinas científicas diarias ni convertirse en una barrera al avance científico. Además, es prioritario garantizar el acceso autorizado a recursos críticos, tanto para fines clínicos como de investigación, preservando su disponibilidad bajo criterios éticos y normativos. La evaluación de la idoneidad del personal, la formación específica en temas de protección y el cumplimiento riguroso de los procedimientos de protección de los patógenos constituyen formas razonables para incrementar la bio-protección en el laboratorio (Wurtz et al., 2016).

Cámaras de seguridad biológica

Las Cabinas de Bioseguridad (CBS) son dispositivos diseñados para resguardar al personal, preservar el ambiente del laboratorio y garantizar la integridad de las muestras frente a la exposición de aerosoles o salpicaduras contaminantes generados durante la manipulación de agentes infecciosos. Estos incluyen cultivos primarios, soluciones concentradas o especímenes clínicos. La formación de aerosoles ocurre durante procedimientos que implican transferencia energética a sustancias líquidas o semilíquidas, como agitación, trasvase entre recipientes, mezcla o vertido sobre superficies.

Entre las actividades de riesgo se encuentran:

- Cultivo en placas de agar.
- Inoculación de medios celulares mediante pipeteo.
- Distribución de suspensiones infecciosas en microplacas con dispensadores múltiples.

- Homogeneización, centrifugación o vibración vertical de muestras patógenas.
- Manejo de modelos animales.

Las partículas en suspensión de diámetro inferior a 5 micras, así como las microgotas de entre 5 y 100 micras, son imperceptibles a simple vista. Esta característica aumenta el riesgo de inhalación inadvertida o contaminación cruzada en superficies de trabajo, ya que el operador no detecta su dispersión.

Estudios demuestran que, al emplearse según protocolos establecidos, las CBS reducen significativamente los casos de infecciones ocupacionales y la interferencia entre cultivos por exposición a aerosoles (Wurtz et al., 2016). Además, estas unidades actúan como barrera crítica para mantener la calidad del aire dentro del laboratorio. Las CSB, cuando se emplean correctamente, han demostrado ser altamente efectivas para disminuir las infecciones adquiridas en el laboratorio y la contaminación cruzada de cultivos debido a la exposición a aerosoles. Además, contribuyen a mantener la calidad del aire en el laboratorio (OMS, 2005).

La arquitectura fundamental de las Cabinas de Seguridad Biológica (CSB) ha experimentado adaptaciones continuas a lo largo del tiempo. Entre las innovaciones más relevantes se destaca la incorporación de sistemas de filtración HEPA, cuya eficacia alcanza el 99.97% en la captura de partículas de 0.3 micrones y supera el 99.99% para partículas fuera de este rango dimensional. Este mecanismo asegura la contención integral de patógenos identificados y garantiza la emisión de aire purificado, libre de agentes biológicos, al exterior del dispositivo. Una segunda modificación del diseño consistió en dirigir hacia la superficie de trabajo aire que haya pasado por filtros HEPA, con el fin de proteger de la contaminación los materiales de esa superficie (Wurtz et al., 2016).

Equipo de bioseguridad

Dispositivos de pipeteo. Según investigaciones de Chiong-Lay et al. (2018), los protocolos de pipeteo exigen el uso exclusivo de

instrumentos mecánicos diseñados para este fin. La práctica de aspirar líquidos mediante succión bucal debe prohibirse categóricamente en entornos de laboratorio. Es fundamental enfatizar la implementación obligatoria de dispositivos automatizados para manipular muestras, ya que la manipulación inadecuada ha generado múltiples casos de exposición patógena, principalmente por ingestión accidental o absorción de sustancias peligrosas durante la succión manual.

Además, otra vía de contaminación frecuente es el contacto de dedos contaminados con la boquilla de la pipeta, lo que facilita la transferencia de microorganismos patógenos a las mucosas orales. Un peligro subestimado incluye la generación de aerosoles durante la aspiración manual, cuyas partículas pueden inhalarse inadvertidamente, incrementando el riesgo de infecciones respiratorias asociadas a agentes biológicos.

Los dispositivos de pipeteo deben seleccionarse con cuidado (Figura 3). Es fundamental que su diseño y su modo de uso no incrementen el riesgo de infección, y que sean fáciles de esterilizar y limpiar. Es necesario emplear puntas de pipeta obturadas (resistentes a los aerosoles) al manipular microorganismos y cultivos de células. Las pipetas con extremos de succión rasguñados o astillados deben ser eliminadas, dado que deterioran las puntas sujetas por las que se introducen en los aparatos de pipeteo y generan un riesgo (OMS, 2005).

Figura 3. Micropipetas de volumen variable.



Dispositivos de homogenización, agitación, mezcla y desintegración ultrasónica.

Los equipos de homogenización destinados a uso doméstico o culinario carecen de sellado hermético, lo que puede provocar la liberación de partículas en forma de aerosol. Por esta razón, se recomienda emplear exclusivamente dispositivos desarrollados para entornos de laboratorio, los cuales incorporan diseños que limitan significativamente o eliminan por completo la dispersión de dichas partículas. Incluso los homogenizadores tipo Stomacher, actualmente adaptados para manipular muestras de diversos volúmenes, no están exentos de generar aerosoles durante su funcionamiento.

En contextos donde se manipulan microorganismos pertenecientes al grupo de riesgo III, es obligatorio realizar la carga y apertura de estos equipos dentro de una cabina de seguridad biológica (CSB), garantizando así la contención adecuada de agentes potencialmente peligrosos (OMS, 2005).

Este enfoque mantiene la información técnica mientras modifica estructura, vocabulario y secuencia para reducir coincidencias textuales.

Asas desechables. Estas asas tienen la ventaja de no requerir esterilización, lo que les permite ser empleadas en CSB, donde los hornos de Bunsen y los micro incineradores alterarían la circulación del aire.

Microincineradores. Los microincineradores de calor eléctrico o a gas cuentan con protectores de cristal de borosilicato o cerámica, los cuales reducen al máximo las salpicaduras y la dispersión de material infeccioso durante la esterilización de las asas. Sin embargo, estos pueden modificar el flujo de aire, por lo que deben colocarse en la parte trasera de la superficie de trabajo de las CSB.

Ropas y equipo de protección personal. El traje y el equipo de protección individual actúan como barreras para reducir al mínimo el riesgo de exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculaciones accidentales. La selección de las prendas y el equipo

depende del tipo de actividad realizada. En el laboratorio, los trabajadores deben usar vestimenta de protección. Antes de abandonar el laboratorio, es necesario que se coloquen las prendas de protección y se laven las manos.

Batas y delantales de laboratorio.

De acuerdo con la OMS (2020), es preferible que las batas de laboratorio se abotonen hasta el borde. No obstante, las batas de manga larga y abertura trasera ofrecen una mayor protección que las batas de abertura frontal, siendo más adecuadas en los laboratorios de microbiología y particularmente cuando se opera en una cabina de seguridad biológica CSB. Las batas pueden ser puestas por encima de los delantales cuando se requiera una mayor protección contra el derrame de sustancias químicas o materiales biológicos, como sangre o fluidos de cultivo. Es necesario que los servicios de lavandería se hallen en las instalaciones o en las proximidades (ver figura 4) (OMS,2005).

Figura 4. Batas.



Protección ocular.

La selección de materiales para resguardar ojos y rostro de impactos o líquidos variará según la actividad desarrollada. Estos equipos, disponibles con o sin graduación, cuentan con estructuras específicas que facilitan la inserción de lentes por la zona frontal (Organización Mundial de la Salud, 2005). Los visores están

fabricados con componentes resistentes a fracturas, pudiendo presentar formas curvas o incluir escudos laterales (vidrios de seguridad). Los modelos convencionales con varillas laterales no ofrecen protección eficaz contra salpicaduras, incluso al incorporar aditamentos periféricos. Los protectores faciales integrales diseñados para absorber golpes y líquidos, deben colocarse sobre lentes correctivos o lentillas, ya que estos últimos no brindan defensa frente a agentes químicos o biológicos.

Equipos respiratorios. El uso de mascarillas es recomendable durante actividades de elevado riesgo, como la gestión de vertidos contaminantes. La elección del modelo dependerá de la naturaleza del peligro. Algunos dispositivos incluyen filtros intercambiables que bloquean microorganismos, gases, partículas o emanaciones. Es fundamental asegurar la compatibilidad entre el filtro y el tipo de mascarilla seleccionada. Para lograr un rendimiento óptimo, estos equipos deben adaptarse anatómicamente al usuario y someterse a pruebas de ajuste previas a su empleo.

Elementos para manos. Durante las labores en laboratorio, las extremidades superiores están expuestas a contaminantes y lesiones por instrumentos filosos. Los guantes de un solo uso, elaborados en látex, nitrilo o vinilo y validados para aplicaciones microbiológicas, son los más utilizados en tareas generales, manejo de patógenos o contacto con fluidos orgánicos. Los modelos reutilizables son una opción alternativa, pero requieren procesos de lavado, desinfección y retiro meticulosos. Tras manipular sustancias peligrosas o trabajar en cabinas de seguridad biológica (CSB), es obligatorio desechar los guantes y realizar un lavado exhaustivo de manos. Los guantes usados deben eliminarse como desechos biocontaminados.

Desinfección y esterilización

Para la bioseguridad en el laboratorio es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización. El tiempo de contacto con los desinfectantes varía según el material y el fabricante. Por ello, es esencial que todas las indicaciones sobre su uso se ajusten a las especificaciones del fabricante (OMS, 2005).

Limpieza del material de laboratorio

La OMS (2005), menciona que el proceso de limpieza implica la remoción de suciedad, material orgánico y marcas. Incorpora la limpieza, la aspiración, el desmaquillaje en seco, el lavado o el lavado con un paño y agua con jabón o detergente. La suciedad, la tierra y la materia orgánica tienen la capacidad de albergar microorganismos e interferir con el funcionamiento de los descontaminantes (antisépticos, germicidas, químicos y desinfectantes). Es esencial realizar una limpieza preliminar para lograr una adecuada desinfección o esterilización. Numerosos productos antimicrobianos solo actúan sobre material que ha sido previamente limpiado. Es necesario realizar la limpieza con cautela para prevenir la exposición a agentes infecciosos. Es necesario emplear materiales que sean químicamente compatibles con los pesticidas que se emplearán posteriormente.

Germicidas químicos

Muchas clases de sustancias químicas pueden emplearse como desinfectantes o antisépticos. Considerando que la cantidad y diversidad de productos comerciales se incrementan constantemente, es necesario seleccionar con cuidado las formulaciones que sean adecuadas para satisfacer las necesidades específicas.

De acuerdo con la OMS (2005), la acción germicida de numerosas sustancias químicas es más rápida y efectiva a temperaturas superiores. No obstante, las temperaturas elevadas pueden favorecer su evaporación y degradación. Por ello, es crucial manejar y almacenar estas sustancias con especial precaución en zonas tropicales. Donde si es necesario prestar especial atención al empleo y almacenamiento de dichas sustancias en zonas tropicales, donde su período de preservación puede ser disminuido debido a las elevadas temperaturas ambientales.

Diversos agentes antimicrobianos pueden representar riesgos para la salud humana o los ecosistemas. Su manejo responsable durante la selección, almacenamiento, manipulación, aplicación y disposición final debe seguir estrictamente las directrices del fabricante. En cuanto a la protección individual, se aconseja emplear equipo de protección personal (EPP), como guantes resistentes, indumentaria protectora y gafas especializadas durante la preparación de soluciones desinfectantes. La aplicación

apropiada de estos compuestos químicos no solo optimiza la seguridad ocupacional, sino que también mitiga la exposición a microorganismos patógenos. Por cuestiones económicas, de gestión de inventario y sostenibilidad ambiental, se recomienda reducir al mínimo indispensable la diversidad de desinfectantes químicos utilizados. A continuación se enumeran las categorías más comunes de estos agentes, acompañadas de información general sobre sus usos específicos y protocolos de seguridad:

Cloro (hipoclorito sódico): El cloro, un oxidante de acción rápida, es un agente químico germicida de amplia aplicación y gran espectro. Usualmente se comercializa como lejía, una disolución acuosa de hipoclorito sódico (NaOCl) que puede diluirse en agua para obtener diferentes niveles de color libre. El cloro, en particular en su forma de lejía, posee una alta alcalinidad y puede provocar corrosión en los metales. De acuerdo con la OMS (2005), la materia orgánica (proteínas) disminuye significativamente su actividad. Las soluciones concentradas o de trabajo de lejía almacenadas en recipientes abiertos, especialmente a altas temperaturas, liberan cloro gaseoso, lo que reduce su efectividad germicida. Según la OMS (2020), La regularidad en la preparación de nuevas soluciones laborales de lejía depende de su potencia inicial, del tamaño y la clase de los contenedores (como si tienen tapa o no), de la regularidad y el tipo de uso, así como de las condiciones del entorno. A título de orientación general, las soluciones que reciban materiales con gran cantidad de materia orgánica varias veces al día deben cambiarse al menos diariamente, mientras que aquellas que se usan con menos frecuencia pueden durar hasta una semana.

Se empleará una concentración de 1 g/L de cloro libre como solución desinfectante general para todos los procedimientos de laboratorio (OMS, 2005). Si se presenta un derramamiento que represente un riesgo biológico y hay grandes volúmenes de materia orgánica, se recomienda utilizar una solución más concentrada, que contenga 5 g/L de cloro libre. Las soluciones de hipoclorito sódico, como la lejía de uso doméstico, contienen 50 g/L de cloro libre y por tanto deben diluirse a razón de 1:50 a 1:10 para obtener concentraciones finales de 1 g/L y 5 g/L, respectivamente (Gallandat et al., 2021).

Dicloroisocianurato sódico: La versión polvo del dicloroisocianurato sódico (NaDCC) posee un 60% de cloro libre. Las soluciones elaboradas con NaDCC en polvo con un ratio de 1,7 g/L y 8,5 g/L, respectivamente, incluirán 1 g/L y 5 g/L de cloro libre. Los comprimidos de NaDCC generalmente incluyen el equivalente a 1,5 g de cloro libre cada uno. Uno o cuatro comprimidos disueltos en un litro de agua darán aproximadamente las concentraciones requeridas de 1 g/L 65 g/L, respectivamente (OMS, 2005).

Cloraminas: Las cloraminas se presentan en forma de polvo, con alrededor del 25% de cloro libre presente. Al expulsar el cloro se realiza a una velocidad inferior a la de los hipocloritos, se necesitan concentraciones iniciales superiores para conseguir una efectividad similar a la de estos. Por otro lado, las soluciones de cloramina son menos afectadas por la materia orgánica en comparación con los hipocloritos, y se recomienda una concentración de 20 g/L tanto para situaciones "limpias" como "sucias" (OMS, 2005).

Dióxido de cloro: El dióxido de cloro (ClO_2) es un potente y rápido germicida, desinfectante y oxidante que frecuentemente actúa a niveles inferiores a los requeridos. En el caso del cloro procedente de la lejía, la forma gaseosa es inestable y se descompone en cloro (Cl_2) y oxígeno (O_2) gaseosos, generando calor, produciendo calor. No obstante, el dióxido de cloro tiene solubilidad en agua y estabilidad en una solución acuosa. Se puede conseguir de dos maneras: 1) Mediante generación *in situ*, combinando dos elementos diferentes, el ácido clorhídrico (HCl) y el clorito sódico (NaClO_2), o 2) Encargando la forma estabilizada, que luego se pone en marcha en el laboratorio cuando se requiere. El biocida oxidante más selectivo es el dióxido de cloro. El ozono y el cloro tienen una reactividad mucho superior al dióxido de cloro y son absorbidos por la mayoría de los compuestos orgánicos. En cambio, el dióxido de cloro sólo reacciona con los compuestos de azufre reducido, las aminas secundarias y terciarias, y otros compuestos orgánicos muy reducidos y reactivos (OMS, 2005).

Formaldehído: De acuerdo con la OMS (2005), el formaldehído (HCHO) es un gas con capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos y esporas a temperaturas superiores a las

20 °C. Sin embargo, no muestra efectos sobre los priones. Esta sustancia se distingue por presentar una acción pausada y necesita una humedad relativa cercana al 70%. Su comercialización se lleva a cabo en polímero sólido (paraformaldehído), en trozos o comprimidos, o en forma de formol, una solución del gas en agua con aproximadamente 370 g/L (37%) y metanol (100 ml/L) como estabilizador. Es necesario calentar las formulaciones para liberar el gas, que se empleará en descontaminar y desinfectar los lugares cerrados como locales o CSB. El formaldehído (equivalente al 5% de formol en agua) suele emplearse en forma de fertilizante, líquido desinfectante.

El formaldehído es un compuesto que supuestamente provoca cáncer. Es un gas peligroso con un aroma acre que puede causar irritación en los ojos y las mucosas. Por lo tanto, debe ser guardado y empleado con una campana extractora de vapores o en áreas con buena ventilación. Es necesario cumplir con las regulaciones nacionales de seguridad de los compuestos químicos.

Compuestos fenólicos: los compuestos fenólicos, que constituyen un amplio grupo de productos, son considerados uno de los germicidas más antiguos.

De acuerdo con la OMS (2005), es habitual encontrar triclosán en los productos destinados a la limpieza de manos. Esencialmente actúa contra estructuras vegetales de las bacterias y resulta seguro para la piel y las membranas mucosas. No obstante, en investigaciones de laboratorio se ha notado que los microorganismos que exhiben resistencia inducida a niveles bajos de triclosán, igualmente presentan resistencia a determinados antibióticos. Se desconocen las repercusiones de esta aseveración en la realidad. Compuestos fenólicos pueden verse afectados por la dureza del agua y se inactivan en este tipo de aguas; por lo tanto, su dilución se debe realizar con agua desionizada o destilada.

Alcoholes: El alcohol etílico (C_2H_5OH) y el alcohol isopropílico ($(CH_3)_2CHOH$) poseen características desinfectantes similares. Poseen una acción frente a bacterias vegetativas, hongos y virus con envoltura lipídica, aunque no ejercen efecto sobre estos. Su impacto en los virus sin cobertura lipídica varía. Para mejorar la eficacia, se aconseja emplear una concentración acuosa del 70%

(v/v) alrededor: concentraciones superiores o inferiores pueden no poseer el mismo poder germicida. Un beneficio significativo de las soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan ningún residuo en los objetos tratados (OMS, 2005).

Por otra parte, mezclar otros agentes permiten mayor eficacia que solo alcohol, como una combinación de alcohol al 70% (v/v) con 100 g/L de formaldehído, o 2 g/L de alcohol con cloro libre. La primera solución de etanol (70% v/v) se utiliza en piel y las superficies de trabajo del laboratorio, también se puede utilizar para bañar piezas de instrumentación quirúrgica. Debido a que el etanol seca la piel, este debe ser mezclado con emolientes (OMS, 2005). Sin embargo, hay que recordar que el etanol no tiene actividad contra las esporas y quizá no mate todos los tipos de virus sin envoltura lipídica (Thaddeus et al., 2018).

Yodo y yodóforos: Este tipo de desinfectantes son similares al grupo del cloro, a excepción de que son menos susceptibles en presencia de materia orgánica. Se debe tener en cuenta que el yodo mancha los tejidos y las superficies en las que entra en contacto, lo que hace, que no sea adecuado para usarse como desinfectante. Sin embargo, este grupo de sustancias (yodo y yodóforos) actúan como buenos antisépticos (OMS, 2005). De igual manera, la povidona yodada se considera un excelente agente para la limpieza quirúrgica, siendo aséptico y muy fiable, además, de mejorar la asepsia cutánea preoperatorio (OMS, 2005). Los antisépticos a base de yodo no son buenos para utilizar en los materiales médicos. El yodo no debe usarse en objetos de aluminio o cobre (Jones et al., 2023).

Descontaminación de espacios y superficies

De acuerdo con la OMS (2005), el espacio, los muebles y el equipo de laboratorio necesitan una mezcla de desinfectantes líquidos y gaseosos. Las superficies pueden descontaminarse con una solución de hipoclorito sódico (NaClO); una solución que contenga 1 g/L de cloro libre puede ser apropiada para la limpieza general, pero se recomiendan soluciones más potentes (5 g/L) cuando se trate de situaciones de alto riesgo. En otros casos, la limpieza se puede realizar sustituyendo la legía por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%.

Reglamentación internacional en el transporte de material infeccioso

De acuerdo con la OMS (2005), La reglamentación relacionada con el transporte de material infeccioso por cualquier medio de transporte se basa en las *Recomendaciones relativas al transporte de mercancías peligrosas*, que fueron establecidas por un comité de expertos de las Naciones Unidas y que se vinculan jurídicamente con la Reglamentación Modelo en las normas nacionales y el modelo internacional, con el auspicio de autoridades competentes, esas recomendaciones de las Naciones Unidas han sido elaboradas por el Comité de Expertos de las Naciones Unidas en Transporte de Mercancías Peligrosas. Para que sea legalmente obligatoria, la Norma Modelo debe ser incorporada tanto en las leyes nacionales como en las normativas modelo internacionales por las autoridades pertinentes.

La Asociación Internacional de Transporte Aéreo [IATA], (2025), publica todos los años una guía sobre el transporte de sustancias infecciosas (*Infectious Substances Shipping Guidelines*). La orientación de la IATA (2025), debe acatar al menos las Directrices Técnicas de la OACI, aunque puede establecer limitaciones adicionales. Cuando un envío es llevado a cabo por un integrante de la asociación, debe adherirse a las pautas de la IATA (2025). (OMS, 2005).

La OMS (2005), menciona que la *Reglamentación Modelo para el Transporte de Bienes Peligrosos* es un conjunto activo de sugerencias que se modifican cada dos años, se sugiere al lector que consulte las más recientes versiones de las regulaciones nacionales e internacionales para obtener los textos normativos pertinente.

Sistema triple básico de empaquetado/embalaje. Es el favorito para el traslado de sustancias contagiosas y potencialmente contagiosas. Este sistema de empaquetado/embalaje se compone de tres elementos: i) El recipiente principal que contiene la muestra debe ser hermético, resistente a fugas y tener una etiqueta adecuada que indique su contenido; ii) debe estar cubierto con material absorbente adecuado para absorber cualquier líquido en caso de que se derrame o escape y iii) el contenedor principal

se ubica en un segundo recipiente/embalaje protector, también estanco y a prueba. Es posible ubicar varios contenedores más pequeños en un solo empaque/embalaje secundario. Algunas normativas imponen limitaciones sobre el volumen o peso de las sustancias contagiosas envasadas.

El embalaje externo protege al embalaje secundario de los daños físicos durante el transporte. Los formularios de datos relativos a la muestra, las cartas y demás material informativo que permitan identificarla o describirla, así como identificar al remitente y al destinatario, junto con toda la demás documentación exigida, también se incluirán de acuerdo con la reglamentación vigente (World Health Organization, 2019).

La *Normativa Modelo de las Naciones Unidas* establece la utilización de dos sistemas distintos de triple envase. El sistema básico es el idóneo para el traslado de varias sustancias infecciosas, pero, los microorganismos de alto riesgo deben ser enviados bajo regulaciones más rigurosas. Si, se desea tener mayor información sobre el uso de los diferentes embalajes dependiendo de los materiales que se van a enviar, se recomienda al lector que revise la legislación nacional o internacional para entender los textos normativos pertinentes (OMS, 2005).

Es importante tener en cuenta, especialmente en docencia e investigación, diversos procedimientos en el manejo del Laboratorio de Microbiología, los cuales se describen a continuación:

Organización: conforme grupos máximo de 4 o 5 personas, incluir más personal dificulta el trabajo minucioso y dedicado; recuerde que del buen trabajo en grupo depende en gran parte los resultados de la práctica.

Área de trabajo: los laboratorios de microbiología deben estar dispuestos en mesas de trabajo, con su microscopio respectivo; adicionalmente, durante la clase se puede contar con gradillas, aceite de inmersión, asas bacteriológicas, las soluciones necesarias, colorantes, mecheros de gas, medios de cultivo, entre otros.

Unidades de servicio: en cada mesa existen tomacorrientes para los microscopios u otros equipos; cuide el estado de los cables.

En una mesa auxiliar encuentra la gradilla y los colorantes para realizar las tinciones y un equipo por mesa; utilice sólo una gradilla.

Materiales y equipos: el material utilizado en las prácticas se entregará por parte del docente o monitor antes de comenzar la misma; rotúlelos doblemente indicando el número del grupo, número de mesa, fecha, tipo de prueba y facultad. Luego, de terminada la siembra, el material de trabajo será llevado a incubación, y si el material es de desecho, colóquelo en la bandeja indicada por el profesor. El microscopio debe estar encendido el tiempo que se use, luego se cubre con la funda y se lo separa de los mecheros.

Prácticas de lectura: La mayoría se centran en monitorear el crecimiento de los microorganismos, que solo se puede observar después de varias horas o días de llevar a cabo las siembras. Por esta razón, cada laboratorio incluye una sesión de lectura de resultados que se llevará a cabo durante todo el semestre en el día y hora establecidos por el docente. Las lecturas serán semanales y corresponderán al laboratorio previo. El material no leído también será desechado semanalmente. Una vez recolectados.

Precaución de accidentes: Reporte al docente cualquier percance o lesión experimentada en el laboratorio. Si algo se rompe, no lo agarre con las manos e informe de inmediato sobre el suceso. Es importante recordar que puede infectarse.

Recomendaciones académicas: Antes de cada sesión, comprenda el asunto de la práctica, siga las directrices y obtenga el material requerido. Durante el laboratorio, tome notas de manera constante, elabore esquemas y dibujos de lo que observé, anote los resultados, evalúelos y vincule de manera constante la práctica con la teoría. Finalmente, debe resolver las preguntas de cada práctica.

1.2 Equipos y Materiales de un Laboratorio de Microbiología

1.2.1 Introducción

Los equipos y los materiales usados en un Laboratorio de Microbiología son fundamentales por cuanto permiten realizar el trabajo en laboratorio en forma más eficiente y segura. Es importante tener en cuenta que para el desarrollo normal de las prácticas de laboratorio se debe contar con una infraestructura lo suficientemente segura en donde los equipos, materiales y demás reactivos que se quieran utilizar juegan un rol básico para asegurar la bioseguridad no sólo del investigador, del docente, del estudiante sino también de las demás personas que se encuentran en el laboratorio. Además, dada la complejidad de las actividades que se realizan en un Laboratorio de Microbiología es necesario que éstos garanticen cumplir con los objetivos planteados en las prácticas y que permitan una interpretación adecuada de los resultados obtenidos. Para la sección de materiales en el laboratorio se tomo información de Romero, C. (2009), y para la sección de equipos en el laboratorio se realizo en base a (Universidad Autónoma de San Luis Potosí [UASLP], 2019.)

1.2.2 Objetivos

- Conocer los distintos materiales y equipos con que se trabajará en el Laboratorio de Microbiología.

1.2.3 Materiales y equipos

Muchos de los utensilios más utilizados en los laboratorios están hechos de vidrio resistente a altas temperaturas, gracias a su alto contenido de dióxido de silicio, bajo nivel de álcalis, óxido bórico y trazas de otros óxidos, características que contribuyen a su bajo coeficiente de expansión térmica. Uno de los más conocidos es el vidrio PYREX, el cual posee la característica de ser muy buen conductor del calor y porque al medio ambiente no se altera su composición (ver figura 5).

Los requisitos para que un material de vidrio sea de buena calidad son:

- Que no sean fáciles de fracturar.
- Poseer un tono neutro.
- Tener resistencia ante acciones mecánicas y cambios de temperatura, además de ser álcali-libre (no se raje).
- Tener un coeficiente de dilatación reducido (que no altere su conformación).
- Dependiendo del recipiente que se use, la medición del volumen varía, ya que para volúmenes más exactos, por ejemplo, se usa una probeta y no un beaker.

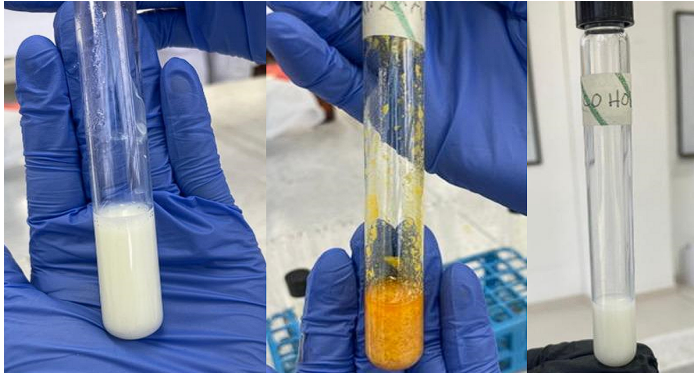
Figura 5. Material de vidrio



1.2.3.1 Materiales de cristal

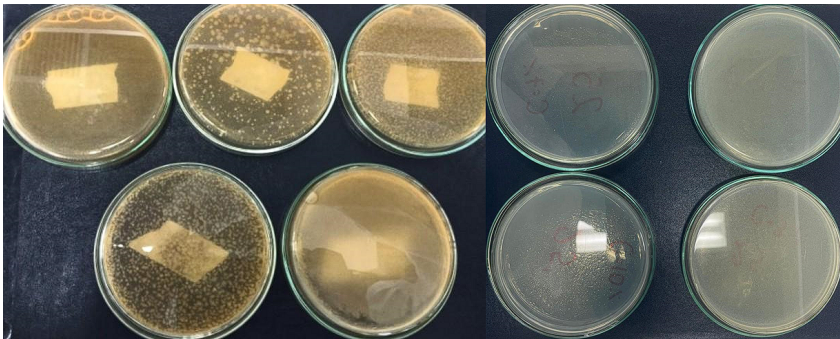
- **Tubos de ensayo.** Se utilizan como contenedores para los medios de cultivo. Es necesario que sean de vidrio neutro, con paredes altas y balanceadas, preferentemente sin rebordes para evitar el taponamiento. Se encuentran de diferentes tamaños dependiendo de la práctica que se desee realizar (ver figura 6).

Figura 6. Tubos de ensayo con muestras microbiológicas.



- **Capsulas o placas Petri.** Se presentan en forma cilíndrica y se utilizan para el cultivo y aislamiento de microbios. Las de 10, 15, 20 y 100 mm son las más empleadas (ver figura 7).

Figura 7. Cajas de Petri.

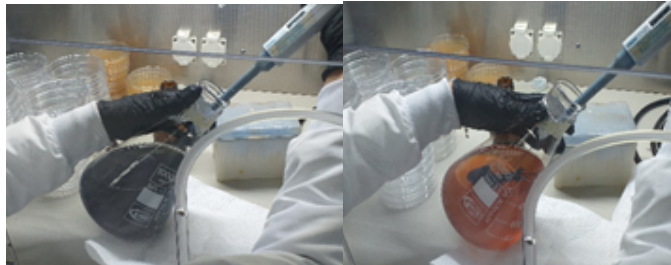


- **Placas Brewer:** Se utilizan para el cultivo y separación de microorganismos anaeróbicos. Las tapas son similares a las anteriores, pero algunas, además de ser más pesadas, están diseñadas para crear un ambiente anaeróbico.
- **Pipetas:** Son tubos de forma cilíndrica con puntas afiladas, que se gradúan en centésimas o décimas de ml. Se utilizan para medir cantidades reducidas de líquidos. Podrían ser:

Volumétricas: Se identifican por tener una dilatación central bulbosa con señales de aforamiento identificadas en la zona más proximal de la pipeta, también conocidas como pipetas de bola; sus métricas más comunes son de 10, 25, 50 y 100 ml.

Pasteur: Son placas de vidrio de 4 con 20 milímetros, con una longitud de 30 a 40cm. La calidad del vidrio debe permitir la acción directa de la llama del fuego, para obtener la capilaridad a través del estiramiento. Se utiliza para la recolección de pequeños inóculos de plantación. (Ver figura 8).

Figura 8. Pipeteó en cámara de flujo laminar.



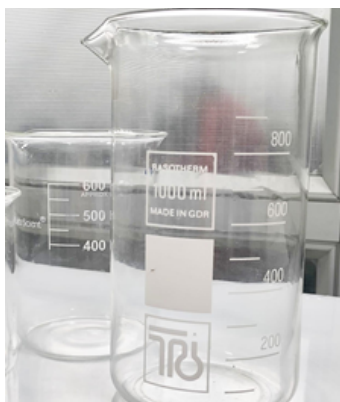
- **Matraces y Erlenmeyers:** Con forma cónica y cuello corto, volumétrico, son necesarios para la elaboración y conservación de soluciones, tintes, reactivos, medios de cultivo, entre otros. (ver figura 9) (OMS, 2005).

Figura 9. Erlenmeyer.



- **Kitasato:** Son recipientes similares a los Erlenmeyers, con paredes de gran grosor y una tubo lateral en su cuello, que actúa como tabulación lateral para realizar el vacío.
- **Probetas:** Es un recipiente graduado que tiene forma cilíndrica, tienen diferentes capacidades. Pueden estar graduadas.
- **Vasos de Precipitación o Beakers:** A este grupo pertenecen los recipientes cortos y con forma cilíndrica, que poseen una pequeña depresión en la bocadura. Se usan en muchos procedimientos, además de ser resistentes a altas temperaturas (ver figura 10).

Figura 10. Beakers.



- **Frascos viales para hemocultivos, vacunas y cultivos de tejido:** Están fabricados con vidrio neutro, resistente al calor, transparente y con tapa de rosca, con capacidades de 50 ml y 100 ml. Pueden ser de color blanco o ámbar, y se utilizan para almacenar soluciones y medios de cultivo en reserva, previamente sellados con algodón esterilizado.
- **Perlas de Vidrio Neutro:** Se usan para desfibrilar la sangre y permiten la recolección o cosecha de microorganismos en preparaciones de antígenos entre 4 y 6 mm. Vienen acompañados de una Varilla de vidrio macizo (ver figura 11).

Figura 11. Perlas de vidrio.



1.2.3.2 Equipos

- **Potenciómetro:** Se utiliza para medir el pH tanto de los medios de cultivo como de las soluciones buffer. Consiste en un par de electrodos ajustados a los niveles de hidrógeno, conectados a un potenciómetro que registra las mediciones. Los potenciómetros emplean un electrodo de vidrio, que está conectado de manera estándar a un electrodo de calomel (ver figura 12 y 13).

Figura 12. Potenciómetro.



Figura 13. Infografía Potenciómetro.

Potenciómetro

¿Qué es?
Es un instrumento de medición eléctrica que permite determinar voltajes de manera precisa, comparándolos con una fuente de referencia conocida.



¿Para qué se usa?

- Calibrar voltímetros
- Medir pequeñas diferencias de potencial
- Experimentación en circuitos eléctricos

¿Cómo funciona?
Utiliza el principio de equilibrio de potencial: ajustando una resistencia variable hasta que no circula corriente por el galvanómetro, se puede conocer con exactitud el voltaje.

Ventajas:

- ✓ Alta precisión.
- ✓ No consume energía del circuito medido.
- ✓ Ideal para uso educativo y de investigación.

- **Centrífugas:** Se emplea para separar sólidos suspendidos en líquidos. Existen centrífugas de diferentes tamaños y velocidades, las cuales se miden en revoluciones por minuto. La velocidad a la que las partículas se sedimentan en un líquido depende de varios factores, como el tamaño y el peso de la partícula, la viscosidad del líquido, la fuerza gravitacional y la ultracentrifugación, que se utiliza para lograr la separación (ver figuras 14 y 15).

Ultracentrifugación analítica: para determinación de características físicas de proteínas o de ácido nucleicos.

Figura 14. Centrífuga de alta velocidad



Figura 15. Infografía Centrífuga de alta velocidad.



La ultracentrifugación preparativa permite la separación de orgánulos celulares, y dicha separación se realiza mediante un gradiente de densidad.

- **Hornos e incubadoras:** Los primeros pueden alcanzar temperaturas por encima de los 100°C, mientras que los segundos alcanzan temperaturas inferiores a los 100°C. Por otra parte, la incubadora integra una salida de aire mientras los hornos no la tienen (ver figura 16 y 17).

Figura 16. Incubadoras.



Figura 17. Infografía Incubadora.



- **Baños de agua:** Se conoce como baño María. Están dotados de un piso para colocar los materiales. Cuentan con termostato y una salida de aire para mantener la temperatura (ver figura 18).

Figura 18. Baño maría.



- **Refrigeradoras y congeladores:** Son equipos de temperaturas menores a los 4°C.

- **Elementos de filtración:** Se utilizan para distinguir entre materiales líquidos y sólidos, un caso de esto son los filtros membranosos.
- **Espectrofotómetro:** Es posible observar los colores de los alimentos con una intensidad determinada por el aparato. Es de gran importancia para determinar la concentración bacteriana de un medio de cultivo según la longitud de onda, teniendo en cuenta la escala de McFarland (ver figura 19 y 20).

Figura 19. Espectrofotómetro



Figura 20. Infografía espectrofotómetro.

Espectrofotómetro

¿Qué es?
Es un instrumento que mide la cantidad de luz absorbida por una sustancia, permitiendo determinar su concentración mediante el análisis espectral.

¿Para qué se usa?

- Cuantificación de proteínas, ADN y ARN
- Análisis de colorantes, reactivos o contaminantes
- Control de calidad en industrias farmacéuticas, alimentarias y ambientales

¿Cómo funciona?
La luz pasa a través de una muestra contenida en una cubeta. El espectrofotómetro mide cuánta luz es absorbida a una longitud de onda específica y, con ello, calcula la concentración de la sustancia presente.

Ventajas:

- ✓ Alta precisión y sensibilidad.
- ✓ Resultados rápidos y confiables.
- ✓ Versátil: sirve para sólidos, líquidos y soluciones.

- **Autoclave:** Opera a través de presiones elevadas a una temperatura superior, consiguiendo así su esterilización, como en las conservas. La temperatura óptima de esterilización para muchas bacterias, incluyendo las bacterias patógenas, es de 121°C / 15 a 20 minutos (ver figura 21).

Figura 21. Autoclave.



Figura 22. Infografía autoclave.

Autoclave

¿Qué es?
Es un equipo de esterilización que utiliza vapor de agua a alta presión y temperatura para eliminar microorganismos, como bacterias, virus y hongos, en instrumentos y materiales de laboratorio.



¿Para qué se usa?

- Esterilización de instrumentos de laboratorio.
- Eliminación de residuos biológicos peligrosos.
- Desinfección de medios de cultivo y muestras.
- Garantía de bioseguridad en investigación y diagnósticos

¿Cómo funciona?

Carga: Se colocan los materiales dentro de la cámara del autoclave.
Generación de vapor: Se calienta agua hasta producir vapor a alta presión.
Esterilización: El vapor alcanza 121°C - 134°C, destruyendo microorganismos.
Enfriamiento: Se libera presión y los materiales quedan listos para su uso

Ventajas:

- ✓ Eficiente: Esteriliza en pocos minutos.
- ✓ Seguro: Cumple normas de bioseguridad.
- ✓ Versátil: Se adapta a distintos materiales.
- ✓ Ecológico: No usa químicos dañinos

- **Horno Pasteur:** Dispositivo de esterilización por calor seco con estructura de tres capas y revestimiento de amianto (asbesto). Funciona bajo el mismo principio que una mufla.

- **Estufas de convección térmica:** Equipos de doble pared y diseño cúbico, empleados para esterilización mediante calor seco, similares al horno Pasteur pero con menor complejidad estructural.
- **Esterilizador Arnold Koch:** Sistema cilíndrico que utiliza vapor a presión (calor húmedo) para procesos de descontaminación.
- **Clasificación microscópica:**

Microscopios tradicionales:

Ópticos:

- » *Básicos:* Monoculares o binoculares.
- » *Especializados:* Incluyen estereomicroscopios, de fluorescencia, contraste de fases, campo oscuro, polarización, luz ultravioleta y luz reflejada.

Electrónicos:

- » MEB (Microscopio Electrónico de Exploración).
- » TEM (Microscopio Electrónico de Transmisión).
- » *Variante avanzada:* Equipos con sistema de barrido láser focalizado (Figura 23).

Figura 23. Microscopio.



- **Estereomicroscopios:** Son microscopios de tipo binocular, equipados con dos objetivos y dos oculares, y cuentan con un sistema de doble prisma que facilita la edición y preservación de la textura. El objeto se ilumina tanto por transparencia como por incidencia, siendo esta última la más habitual. Pueden estar dotados de accesorios microfotográficos, doble dispositivo de observación para observaciones simultáneas, cámaras claras y micro disectores.
- **Microscopio de luz ultravioleta:** Se basa en la longitud de onda ultravioleta corta (180-400 nanómetros), tiene la ventaja de que algunas sustancias estudiadas no requieren tinción para su observación porque tienen bandas de absorción ultravioleta. Los lentes del microscopio se construyen en cuarzo y la imagen ultravioleta se obtiene con fotografía, fluorescencia o fotoemisión.
- **Microscopio de fluorescencia:** Se fundamenta en la característica de ciertos compuestos (conocidos como fluorescentes), de liberar bajo la influencia de una radiación de ondas cortas, y otras con longitudes de ondas larga como fluorescente. Se compone de un haz de luces con una rayos de longitud de onda del ultravioleta al infrarrojo, un filtro que establece el haz de excitación, usualmente ultravioleta, una muestra fluorescente y un filtro (de barrera) que elimina los residuos de la luz de excitación y permite la única emisión de la fluorescencia.
- **Microscopio de contraste de fases:** Se emplea para analizar aquellos compuestos de densidad uniforme y transparente, como las células y las bacterias, donde la reducida capacidad de absorción provoca que la imagen lograda no muestre diferencias de luz entre sus componentes, lo que hace prácticamente imperceptibles los detalles. Es necesario realizar la práctica de coloración de muestras.
- **Microscopio de campo oscuro.** Estos microscopios generan un efecto que consiste en un fondo sombrío donde se aprecian los objetos con alta intensidad de iluminación. La capacidad de resolución se basa en el contraste que

hay entre el objeto y el entorno que lo envuelve. Se utiliza para observar microorganismos sin teñir y que están suspendidos en líquidos.

- » **Microscopio de polarización:** Se trata de microscopios con luces polarizadas, fabricados de un microscopio convencional, al cual se coloca entre el condensador y la luz un polarizador, y el análisis se realiza entre la lente y el objeto.
- » **Microscopios de luz reflejada:** Se emplean en la microscopía de minerales metálicos u opacos. Para ello, es necesario un foco de luz polarizada que incida de manera perpendicular sobre la superficie finamente pulida, con un brillo intenso y sin la interferencia de cubreobjetos. También se requiere un iluminador de opacos que se ajuste adecuadamente al microscopio.
- » En relación a los microscopios electrónicos, poseen el beneficio de lograr una ampliación excepcional y pueden proporcionar una resolución 1000 veces superior a la del microscopio óptico, ya que no utiliza un haz de fotones, sino de electrones.
- » **Microscopio electrónico de barrido MEB:** También denominado microscopía electrónica de exploración. Los electrones impactan la preparación, que puede ser secada a través de la congelación o por punto crítico, y se reviste con una capa de metal como el oro o el platino. Este dispositivo no logra la resolución que un microscopio electrónico de transmisión, pero su beneficio radica en una impresionante impresión tridimensional.
- » **Microscopio electrónico de transmisión:** Para este microscopio los electrones deben atravesar el material que va a ser observado. Opera igual que un microscopio óptico a diferencia de que la imagen se forma sobre una pantalla fluorescente, la cual refleja la luz cuando impacta los electrones; bajo la pantalla hay una cámara que se encargará de tomar fotografías. Es útil con muestras de un grosor muy delgado. Esta

microscopía debe estar acompañada de técnicas de congelación, tinciones negativas y microtomía.

- » **Microscopio con focal de barrido láser:** Es el mayor progreso en microscopía, dado que facilita el uso de la tecnología láser. Facilita la visualización de fragmentos minúsculos dentro de una muestra fluorescente de gran espesor, así como la digitalización y reconstrucción rápida de imágenes de alta resolución tridimensionales.

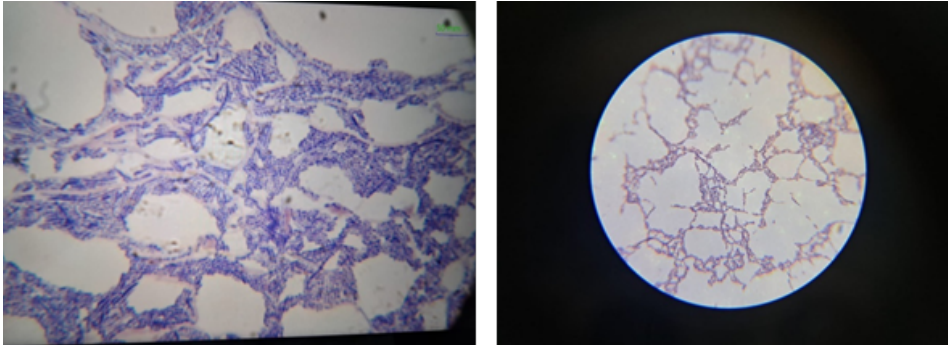
1.3 El Microscopio

1.3.1 Introducción

Casi todos los organismos unicelulares son imperceptibles para el ojo humano, y para observarlos es esencial el microscopio. El uso de este dispositivo es indispensable en el laboratorio de microbiología para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como su reacción a diferentes colorantes, lo cual, junto con otros criterios, permitirá su identificación, por lo tanto, es importante conocer su manejo adecuado.

Además de la ampliación de la imagen, en microscopía hay que tener en cuenta dos factores más: el contraste y la resolución. Los objetos deben poseer un cierto grado de contraste con su medio circundante para poder ser percibidos a través del microscopio. Por ello, la mayoría de los organismos necesitan ser previamente teñidos para poder distinguirlos del medio (*tinciones simples*). Para contrastar o realzar de forma específica distintas características morfológicas o estructurales se emplean *tinciones diferenciales*. Estas técnicas tienen un gran interés en la identificación y clasificación de las bacterias. La tinción diferencial más utilizada es la tinción de Gram (ver figura 24).

Figura 24. Tinción de Gram.



1.3.2 Objetivos

- Entender las distintas partes y el funcionamiento de un microscopio.
- Identificar los diferentes tipos de microscopios y su tarea particular.
- Manejar el microscopio compuesto de manera meticulosa y eficaz.
- Comprender el mantenimiento, uso y beneficio de un microscopio en el laboratorio de microbiología.

1.3.3 Marco teórico

1.3.3.1 Tipos de microscopio

- **Microscopio de contraste de fase.** Es un microscopio que permite resaltar diferencias en fase o trayectoria óptica de muestras por transparencias o reflexión. Un objeto transparente no se puede apreciar en el microscopio compuesto debido a que no absorbe la luz y no resultan alteradas ni la longitud de onda ni la intensidad lumínica. Se emplean unos diafragmas especiales de forma anular y en los que hay usualmente colorantes o una capa absorbente de metal, lo cual permite que la longitud de onda directa sea mayor que la refractada, y esta dismi-

nución en la longitud de onda hace que el objeto se haga visible tomando comúnmente un color gris. Este tipo de microscopio se utiliza principalmente para el estudio de células grandes.

- **Microscopio electrónico.** Tiene un poder de resolución 100 veces superior al microscopio compuesto e igualmente mayor amplificación, lo que permite obtener imágenes muy detalladas de estructuras demasiado pequeñas. A diferencia del microscopio convencional en donde la imagen resulta de la absorción espectral de la luz que atraviesa la muestra, el microscopio electrónico da una imagen producto de la desviación o emisión de electrones por el preparado; además, la imagen se proyecta sobre una pantalla recubierta de material fluorescente o sobre una placa de fotografía que se puede analizar (ver figura 25).

Figura 25. Infografía Microscopio digital o electrónico.

Microscopio digital

¿Qué es?
Es un tipo de microscopio que utiliza una cámara digital para capturar imágenes de alta resolución y mostrarlas en una pantalla o computadora. A diferencia de los microscopios ópticos, permite almacenar imágenes y videos para análisis detallado.



¿Para qué se usa?

- Investigación científica en biología, química y física.
- Análisis de estructuras celulares y microorganismos.
- Control de calidad en la industria y electrónica.
- Estudio de materiales y nanotecnología.

¿Cómo funciona?

Captura de imagen: La cámara digital registra la muestra en alta resolución.
Procesamiento: La imagen se transmite a una pantalla o computadora.
Análisis: Se pueden aplicar filtros, mediciones y ajustes para mejorar la observación.

Ventajas:

- ✓ Imágenes en tiempo real con alta precisión.
- ✓ Almacenamiento de datos para análisis posterior.
- ✓ Mayor comodidad al visualizar en pantallas grandes.
- ✓ Aplicaciones en múltiples disciplinas

- **Microscopio de fluorescencia.** Es una variante del microscopio compuesto al que se le agregan unos dispositivos

que le permiten transmitir a una muestra radiaciones ultravioleta, violeta y azul; esta muestra emite fluorescencia, de suerte que queda con luminosidad propia y coloreada. El colorante más empleado es la fluoresceína, y los anticuerpos marcados con este colorante se denominan anticuerpos fluorescentes que se utilizan como materiales de tinción inmunoespecíficos para caracterizar antígenos en células y tejidos. Este método es útil en la identificación de bacterias, hongos, virus, protozoos y Rickettsias.

- **Microscopio de campo oscuro.** Se utiliza un condensador especial para evitar que la luz entre directamente en la muestra, ya que la evaluación del campo oscuro requiere que la luz entre desde la periferia e ilumine oblicuamente los objetos, haciéndolos parecer brillantes contra un fondo negro. Este tipo de microscopio es útil para estudiar el movimiento de espiroquetas en preparaciones líquidas.
- **Microscopio con sonda de barrido.** Permite cartografiar los objetos a escala atómica y molecular, estudiar las propiedades magnéticas y mecánicas de la materia e incluso poner de manifiesto las variaciones de la temperatura con una resolución mayor, sin alterar las muestras o exponerlas a radiaciones.
- **Microscopio compuesto.** Los componentes de un microscopio compuesto son del tipo mecánico y óptico. Los primeros se muestran como un prototipo actual, ideal para investigar y posee de trinocular (binocular para la visión humana, tercer ocular para microfotografía) con iluminador incorporado en la base.

El factor limitante de la óptica de un microscopio es el **poder de resolución** del objetivo, cuya fabricación requiere el mayor esmero. La resolución de un microscopio se define como la mínima distancia entre dos puntos que el sistema óptico es capaz de distinguir con claridad. Este depende de la capacidad del lente frontal del objetivo para recibir la luz, es decir, del mayor ángulo de incidencia posible de la luz que emerge de la preparación y penetra el objetivo.

Componentes

Estructura mecánica del microscopio

La base del microscopio, diseñada para garantizar estabilidad, sostiene un brazo articulado del que se extiende un tubo central ajustable. Este tubo cuenta con dos sistemas de enfoque: uno macrométrico, que permite movimientos amplios mediante un engranaje de piñón y cremallera, y otro micrométrico, controlado por ruedas estriadas, para ajustes finos. Los modelos contemporáneos suelen incluir un tubo estándar de 160 mm, el cual puede extenderse mediante segmentos graduados para amplificar el aumento. En la parte inferior del tubo se ubica un revólver intercambiable que alberga las lentes objetivos, mientras que el brazo sostiene una plataforma (platina) equipada con sujetadores para fijar las muestras. Algunas platina incluyen mecanismos de desplazamiento controlado, y en la base se encuentra un espejo regulable para dirigir la luz.

Sistemas de ajuste y componentes funcionales

El enfoque grueso se realiza mediante el tornillo macrométrico, ideal para un posicionamiento inicial rápido, mientras que el micrométrico ofrece precisión en el detalle. Ambos sistemas están integrados en el diseño ergonómico del brazo. La platina, además de sostener los portaobjetos, puede incluir marcas graduadas para mediciones específicas. El revólver de objetivos facilita el cambio rápido entre lentes de distintas capacidades, desde aumentos moderados (16 mm de distancia focal) hasta lentes especializadas, como las de inmersión en aceite, esenciales en campos como la bacteriología.

Elementos ópticos y técnicas de visualización

La óptica del microscopio integra objetivos, oculares, condensador y espejo. Los objetivos, montados en el revólver, combinan lentes para amplificar la imagen. En aplicaciones de alta resolución, se emplea un objetivo de inmersión (2 mm) junto con aceite especial, cuyo índice de refracción similar al del vidrio minimiza la dispersión lumínica y mejora la claridad. El condensador, ubicado bajo la platina, concentra la luz hacia la mues-

tra, mientras que el espejo ajustable direcciona la iluminación ambiental o artificial. Estas características, junto con técnicas como el uso de aceite, permiten observaciones detalladas en disciplinas que requieren aumentos elevados y precisión óptica.

Se denomina distancia de enfoque a la separación entre el objetivo y el portaobjetos. En los microscopios actuales, una vez que se ha centrado el objeto de bajo aumento, casi se mantiene enfocado al cambiar (rotar el revólver) por el objeto de alto aumento, sin que se requiera más de una vuelta al tornillo micrométrico para ubicar de manera precisa el objeto.

El poder de resolución de una lente, o su potencia para perfilar detalles, depende de lo que se denomina Apertura Numérica (AN).

El sistema de aumento

- Está compuesto por un par de lentes.
- Las lentes empleadas en el microscopio se encuentran distribuidas en dos grupos, uno en cada extremo de un tubo largo o el propio tubo.
- El primer conjunto de lentes se ubica en la parte inferior del tubo, justo encima de la muestra que se va a observar (el objeto), y se denomina objetivo.
- El segundo conjunto está ubicado en la parte superior del tubo, donde el microscopista observa, y se llama ocular.

Los objetivos

Aumento. Los microscopios poseen distintos aumentos para observar los objetos, para ello cuenta con distintos objetivos que muestra su aumento como un número escrito en la manga de cada lente:

- 10x objetivo de aumento para 10 veces.
- 40x objetivo de aumento para 40 veces.
- 100x objetivo de aumento para 100 veces.

Longitud para la operación del objetivo

Se establece como la separación existente entre el portaobjetos y su lente frontal en el momento en que la imagen está centrada. Conforme el poder de expansión del objeto se incrementa, se reduce la distancia de operación.

10X longitud entre 5 y 6 mm.

40x longitud entre 0,5 y 1,5 mm.

100x longitud entre 0,15 y 0,2.

El ocular

Aumento. En el ocular se puede apreciar el poder de aumento

- Un ocular 4X aumenta la imagen que está en el objetivo por cuatro veces.
- El ocular 6X muestra un aumento de 6 veces.
- El ocular 10X muestra un aumento de 10 veces.

1.3.4 El sistema de iluminación

Componente reflectante. Este elemento dirige los haces luminosos de la fuente hacia la muestra analizada. Presenta dos caras funcionales: una superficie lisa para reflejos directos y otra con curvatura cóncava, que concentra la luz de manera más intensa, optimizando la iluminación según las necesidades del observador.

Sistema de enfoque lumínico. Ubicado entre la platina y el espejo, este mecanismo concentra los rayos de luz en un punto focal sobre la muestra. Su altura es ajustable: al elevarlo se maximiza la intensidad lumínica, mientras que al descenderlo se reduce. Un correcto centrado y calibración de este componente son esenciales para garantizar una distribución uniforme de la luz durante la observación.

Regulador de intensidad. Integrado dentro del condensador, este dispositivo modifica el ángulo de incidencia de la luz y regula su

flujo. Al expandir su abertura, se amplía el ángulo de iluminación y aumenta la apertura numérica, lo que mejora la resolución y permite visualizar estructuras microscópicas más detalladas. Por el contrario, al cerrarlo, se limita la entrada de luz, útil para reducir el deslumbramiento en muestras brillantes.

Filtro. Para determinados microscopios los colores se ajustan con filtros (principalmente azules) debajo del condensador.

Sistema de ajuste. Está comprendido por:

- **La cremallera de progreso acelerado.** Se utiliza primero el tornillo de mayor tamaño para alcanzar la aproximación del enfoque.
- **El rodillo micrométrico de progreso gradual.** Este provoca que el objetivo se mueva más despacio. Se utiliza para obtener una perspectiva ideal del objeto.
- **La herramienta de regulación del condensador.** Se emplea para incrementar o disminuir la iluminación.
- **Herramientas para posicionar el condensador.** Es posible que existan tres tornillos situados junto del condensador: el primero en el frente, el otro en el lado izquierdo y otro en el lado derecho. Se emplean para ubicar de manera precisa el condensador para relacionarlo con el objetivo.

Reglas para el uso del microscopio

- a.** Mantenga limpios el espejo y las lentes del microscopio:
 - Elimine el polvo por medio de un pincel delicado y una soflete de aire.
 - Frote el lente con un papel por una sola vez.
- b.** Coloque y ajuste el enfoque de la muestra en la platina utilizando el aumento más bajo; posteriormente, cambie a aumentos superiores. Evite emplear el objetivo de inmersión a menos que la muestra esté montada en portaobjetos con cubreobjetos delgados o fijada directamente sin cubreobjetos.

- c. Antes de retirar la preparación o guardar el microscopio, asegúrese de regresar el objetivo de menor aumento a su posición inicial de observación.
- d. Tras usar el objetivo de inmersión, limpie su lente frontal con papel óptico: primero retire el exceso de aceite con una hoja seca, luego use otra ligeramente humedecida en xilol o bencina, y finalmente séquela con una tercera hoja. Evite aplicar grandes cantidades de solvente, ya que podrían afectar los adhesivos de las lentes. Nunca utilice alcohol, pues deteriora los acabados lacados del equipo.
- e. Cuando no esté en uso, mantenga el microscopio cubierto con su funda o guardado en su estuche.
- f. En ambientes con alta humedad, almacene el microscopio bajo una campana de vidrio que contenga un agente secante (como carbonato de calcio) o un foco que mantenga una temperatura 5-10°C superior. Un deshumidificador ambiental o el aire acondicionado también protegen el equipo al reducir la humedad en el laboratorio.

1.4 Medidas Microscópicas

1.4.1 Introducción

Una vez que los agentes causantes de cualquier enfermedad se han identificado, es importante medir su tamaño con el fin de hacer comparaciones con las mediciones halladas en la literatura especializada. Por ejemplo, al género *Fusarium* se le conocen 39 especies, dentro de las cuales están *E. oxysporum* y *F. verticillioides*, las cuales atacan el cultivo del clavel, y entre otras características, difieren en el tamaño de las microconidias, pues las de *F. oxysporum* miden entre 23-54 x 3-4,5 μm . y las de *F. verticillioides* entre 31-58 x 2,7-3-6 μm , medidas que sólo pueden ser determinadas a través del uso del *micrómetro*.

1.4.2 Objetivo

- Medir el tamaño de microorganismos a través del empleo del *micrómetro*.

1.4.3 Marco teórico

En microscopía, la unidad de medida utilizada es la micra (μ), equivalente a 0,001 mm. Para determinar el tamaño de los objetos visualizados a través del microscopio, se emplea un *micrómetro ocular*. Este dispositivo consiste en una lámina de cristal con una escala grabada, la cual se coloca dentro del diafragma del ocular. Su ubicación permite que la escala permanezca enfocada, ya que se encuentra en el plano de la imagen real intermedia.

Dado que los aumentos varían entre distintos microscopios, las escalas de los micrómetros oculares no corresponden a medidas estándar, sino a unidades relativas. Para establecer la distancia lineal que representa cada unidad, es decir, el valor micrométrico, es necesario realizar una calibración específica para cada aumento del microscopio. Este proceso se lleva a cabo utilizando un micrómetro objetivo, un dispositivo similar a un portaobjetos que contiene una escala grabada con medidas exactas y convencionales. Por lo general, se emplea un micrómetro objetivo cuya escala consta de 100 o 200 divisiones de 0,01 mm (10 μ).

La distancia entre las líneas de un *micrómetro* ocular varía con el objetivo que se emplee. Para determinar la distancia exacta entre estas graduaciones oculares es necesario calibrar el *micrómetro* ocular con la escala del *micrómetro* objetivo, teniendo líneas grabadas sobre ella, las cuales se encuentran exactamente a una distancia de 0,01 mm ó 10 μ .

1.4.4 Materiales y equipos

- Microscopio compuesto.
- *Micrómetro* ocular.
- *Micrómetro* objetivo.

1.4.5 Procedimiento

Para calibrar el *micrómetro* ocular para un objetivo dado, es necesario sobreponer las dos escalas y determinar cuántas de las graduaciones del ocular coinciden con una graduación de la escala del *micrómetro* objetivo. Las escalas aparecen cuando están apropiadamente alineadas en el microscopio. En este caso, siete divisiones del ocular coinciden con una división del *micrómetro* objetivo de 0,01 mm para dar un valor de $0,01/7$ ó 0,00143 mm. Debido a que hay 1000 μ en 1 mm, estas divisiones están 1,43 μ aparte. Con esta información conocida, el *micrómetro* objetivo es reemplazado con una lámina portaobjetos que contiene un microorganismo para ser medido.

Una vez obtenida esta información, se calcula la fórmula o coeficiente micrométrico. Por ejemplo, si 20 divisiones del micrómetro ocular abarcan tres unidades del micrómetro objetivo, entonces cada división del ocular equivaldrá a

$$3 \times 0.01$$

3×0.01 mm / 20, lo que da como resultado 0.0015 mm o 1.5 μ . Esto significa que, para la combinación óptica utilizada, cada 20 divisiones del micrómetro ocular corresponden a 1.5 μ . De este modo, el valor micrométrico (VM) en micras (μ) se determina de la siguiente manera:

VM = Medida del *micrómetro* objetivo en micras / Unidades del *micrómetro* ocular.

Es necesario repetir el cálculo para cada objetivo, empleando aceite para el objetivo de inmersión. Finalmente, para cada microscopio se debe preparar una etiqueta con la información obtenida, la cual se pegará al microscopio (Tabla 1). Ejemplo con un ocular de 10X:

Tabla 1. Objetivo y valor micrométrico.

Objetivo	Valor micrométrico (μ)
4X	24.7
10X	9.9
40X	2.5
45X	2.2
100X	1.0

Medición. Para determinar el tamaño de un objeto en el campo del microscopio, es fundamental alinear uno de sus extremos con una división mayor de la escala del micrómetro ocular. Luego, se debe contar la cantidad de unidades que abarca y multiplicarlas por el valor micrométrico (VM) correspondiente al objetivo utilizado. El resultado obtenido representa la longitud de la estructura en micras (μ).

Calibración del micrómetro ocular. A) Vista mostrando la alineación del *micrómetro* del objetivo y del ocular. B) Vista mostrando apariencia de las graduaciones del *micrómetro* ocular. C) Apariencia de las graduaciones del *micrómetro* del objetivo. D) Medida de un microorganismo.

Observaciones y resultados

- Calibre los objetivos del microscopio empleando el ocular 10X.
- Compare en micras los tamaños promedio de los microorganismos (hongos, protozoos, virus, bacterias, algas y glóbulos rojos humanos).
- Mida el tamaño en micras (μ) de un espécimen dado.
- Consulte a qué equivale una micra.

1.5 Esterilización

1.5.1 Introducción

Los microorganismos como otros seres vivos son susceptibles a los cambios de las condiciones ambientales, y en la medida en que se han podido adaptar a estos cambios, se han distribuido en una gran diversidad de hábitats incluyendo los de condiciones extremas sobre todo de tipo físico y químico (Jones et al., 2023).

Se han creado y utilizado diferentes procesos de desinfección y esterilización para reducir o eliminar la presencia de microorganismos. La esterilización es un método que elimina completamente todo tipo de microorganismos, garantizando la total ausencia de cualquier forma viviente, mientras que la desinfección es un proceso que solo elimina las formas vegetativas de los microorganismos.

1.5.2 Objetivos

- Conocer las diversas formas de esterilización.
- Llevar a cabo la tarea de encapsular y acondicionar los materiales para su posterior esterilización.
- Conocer el manejo de la estufa, autoclave y mechero Bunsen.

1.5.3 Marco teórico

1.5.3.1 Formas de esterilización

1.5.3.1.1 Esterilización por calor

- **Calor seco**

Horno o estufa. El calor seco de la estufa eléctrica u horno (el horno de una cocina a gas es adecuado), es útil para la esterilización de la cristalería y se usa comúnmente para esterilizar las cajas de Petri. Si se esterilizan frascos u otros recipientes abiertos que deben taponarse

con algodón o cubrirse con algún otro material, debe tenerse cuidado de que la temperatura no pase de 180 °C para evitar que el algodón se quemara. Las temperaturas de 160 a 180 °C por 90 a 120 minutos son eficaces si se deja espacio suficiente para que circule el aire caliente alrededor de todos los materiales (Ver figura 26).

Figura 26. Estufa de secado.



Llama directa. En siembras o cultivos, en preparación de extensiones para colorear, se utiliza el método de la llama directa. Poner correctamente las asas, agujas de histología, pinzas y el resto de material que se va a esterilizar, es fundamental para el éxito de una buena esterilización. Además, los extremos de los elementos metálicos de los instrumentos deben esterilizarse en la parte superior de la llama y hasta que adquieran un color rojo intenso, signo de una buena esterilización.

- **Calor húmedo**

Ebullición. Es un método corriente en bacteriología, pero no presenta un grado de eficiencia tal como la esterilización en la autoclave, a la llama directa o a la tyndalización, especialmente porque con las temperaturas de

ebullición no se logra la destrucción de gérmenes esporulados. El método de ebullición se usa regularmente en hospitales, centros de salud y clínicas veterinarias para esterilizar agujas hipodérmicas, jeringas y otros elementos; sin embargo, este material se debe esterilizar en el horno o en la autoclave.

Vapor a presión. La esterilización por autoclave es el método de elección para lograr la desinfección de elementos y sustancias que fácilmente se deterioran por la utilización del calor seco, tales como material de caucho, medios de cultivo en general y otros.

Las libras de presión utilizadas, así como el tiempo de exposición, depende fundamentalmente de los medios y materiales que se van a esterilizar. En general se esterilizan los medios de cultivo a 15 libras de presión por 15 minutos y a una temperatura de 121°C. Para cultivos con bacterias esporuladas se esterilizan a 15 libras de presión por un tiempo de 30 a 60 minutos y a una temperatura de 121°C.

La esterilización por autoclave es el método de elección, pues permite la destrucción de gérmenes resistentes al calor, tanto en forma vegetativa como esporulante. La esterilización por la autoclave se basa en la producción de calor húmedo, principal factor de esterilización por elevación de temperatura, y el vapor es originado por el agua depositada en el recipiente (olla a presión, en muchos casos) de material herméticamente cerrado.

A continuación, se describen, además de los tipos más comunes de esterilización, el principio de su funcionamiento.

Autoclave portátil vertical

Consta de un recipiente de aluminio similar a una olla de presión de aproximadamente 35 cm de diámetro y 30 cm de altura. La tapa es separada y se adhiere por medio de armellas al borde superior del recipiente, y está provista de un manómetro y una válvula de seguridad (Ver figura

27). El agua destilada se pone en el fondo hasta un nivel inferior del soporte de la base, sobre el que se coloca una olla en el interior, dentro de la cual se insertan las vasijas que se van a esterilizar. Según el tipo y el volumen de los frascos que se utilicen, se pueden esterilizar unos 3 o 4 litros de medio.

Figura 27. Autoclave vertical, permite la destrucción de microorganismos.



Autoclave horizontal

Las autoclaves horizontales grandes constan de un cilindro horizontal de pared simple o doble, con una compuerta de cierre hermético que tolera presiones de vapor de agua de por lo menos 30 lb/pulg². Su efectividad se basa en el hecho de que, a mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua.

Tiene una caldera propia o conexión a vapor de agua de una central. Cuando la presión aumenta a dos atmósferas (15 lbs) la temperatura llega a 121.6 °C; no hay microorganismo que tolere esta temperatura por 15 min. El tiempo es el factor clave que permite que el calor penetre y sea absorbido. Este método es ideal para esterilizar medios en frascos, pero si el volumen excede un litro, será necesario aumentar el tiempo de operación. Debe observarse que la temperatura, llegue a 121°C, lo cual no sucede con

presión de 15 lb si la evacuación del aire inicialmente encerrado es inadecuada.

Si se esterilizan placas en autoclave, es conveniente envolverlas de tres en tres, en papel periódico, para que no se contaminen después y facilitar su manipulación. Tanto en este caso, como cuando se trata de pipetas dentro de cilindros, se deberá esterilizar por unos 40 min. Los medios en botellones no deben ocupar más de tres cuartas partes, para permitir una ligera ebullición sin derramarse. Las tapas de rosca de botellones medicinales deben ir ligeramente sueltas. Si se usan frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón, para permitir la entrada del vapor. Se sugiere cubrir el algodón con una pequeña bolsa de papel invertida para evitar que se humedezca en exceso. Los medios preparados en tubos de ensayo deben colocarse en canastillas de malla metálica, asegurándose de que los tubos estén ligeramente separados para permitir que el calor se distribuya de manera uniforme.

1.5.3.1.2 Esterilización por filtración

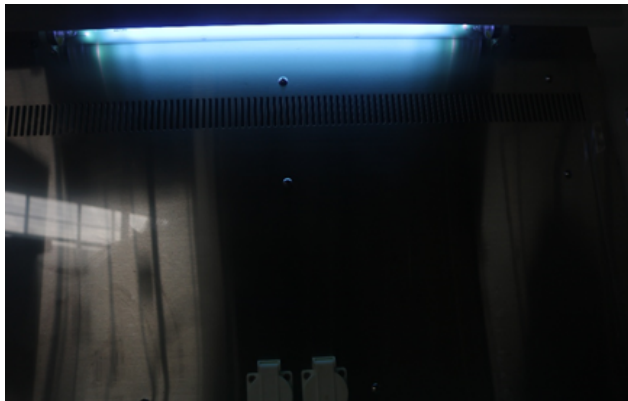
En el Instituto Louis Pasteur se desarrollaron métodos de esterilización por filtración; sin embargo, Dimitry Iwanowsky en 1892 demostró que estos filtros no eran adecuados para algunos agentes causales de enfermedades, que se llegaron a llamar virus (virus del Mosaico del tabaco). La filtración se utiliza especialmente cuando se desea preservar intactas las proteínas que tiene la propiedad de desnaturalizarse (lábil a temperaturas de esterilización). Los filtros más usados son de porcelana (Chamberland), tierra diatomácea (Berkefeld o Mandler), vidrio desmenuzado, asbestos (Seitz), membranas de celulosa y colodión. Como auxiliar para el proceso de filtración se utiliza vacío o presión.

1.5.3.1.3 Esterilización ultravioleta

Los rayos de luz ultravioleta son letales para los organismos, por lo que se pueden utilizar lámparas ultravioletas (UV) para esterilizar medios; pero como estos rayos tie-

nen poca penetración a través de vidrio o de un espesor grande de medio, solo son útiles para trabajos especiales. Se pueden utilizar, por ejemplo, para esterilizar bolsas de plástico pequeñas que se van a emplear para el envío de cultivos o para esterilizar medios de poco grosor preparados en bolsas de plástico selladas. Se debe instalar la lámpara ultravioleta (UV) dentro de una caja para que los rayos no causen daño al operador, de manera que quede a unos 10 cm del material que se desea esterilizar (ver figura 28).

Figura 28. Luz ultravioleta en la cámara de flujo laminar.



Tyndalización

Este método de esterilización, también llamado método de esterilización fraccionada, debe su nombre a Tyndall, quien la ideó a fines del siglo XIX con el fin de lograr la esterilización de gérmenes resistentes al calor, especialmente los esporulados.

El método consiste en un calentamiento repetido durante 2 o 3 días a temperatura de 80 °C y por tiempos de 30 minutos. De esta manera, se logra la destrucción de las formas vegetativas bacterianas, al tiempo que se logra la germinación de los gérmenes esporulados. Estos serán destruidos luego a través de los calentamientos sucesivos. La tyndalización es el método de esteriliza-

ción indicado para los medios de cultivo que incorporen sustancias biológicas fácilmente alterables por el calor como lo son el suero, el huevo, los aminoácidos, entre otros (Daza-Pérez & Martínez-Benavides, 2015).

Pasteurización

El término proviene de Pasteur, quien fue pionero en la aplicación de este procedimiento. Este método implica calentar rápidamente un líquido y luego enfriarlo de manera abrupta. En la pasteurización tradicional, el líquido se mantiene a 63°C durante 30 minutos, lo que permite eliminar las formas vegetativas, excepto aquellas resistentes al calor. También existe una variante conocida como pasteurización rápida o de alta temperatura, en la cual una fina capa de leche se expone a 71°C en placas o tubos, requiriendo solo 15 segundos de tratamiento.

Recomendaciones para la esterilización

Los métodos de esterilización se utilizarán de acuerdo al material que se ha de esterilizar. Así, por ejemplo, cultivos que contengan material contaminado con *Mycobacterium tuberculosis*, gérmenes esporulados como *Bacillus* sp. y *Clostridium* sp., entre otros, deberán ser esterilizados únicamente en la autoclave por un periodo mínimo de una hora.

Cuando se trata de cristalería nueva, que puede estar contaminada con gérmenes esporulados, deben hervirse utilizando detergentes; el enjuague deberá hacerse con agua abundante y luego dejar los recipientes en agua destilada, antes de esterilizarlos en el horno caliente.

Si en la cristalería se han cultivado gérmenes infecciosos, este material se dejará en solución desinfectante, como el cresol al 3%. De esta manera, a la vez que se destruyen los microorganismos presentes en el material usado, se evita la contaminación tanto del personal de laboratorio como del medio ambiente: aire y superficies (Rutala et al., 2023).

Por ningún motivo se deben dejar materiales contaminados expuestos al medio ambiente. El material sometido a desinfección se lava con detergente y se esteriliza en horno caliente.

1.5.4 Materiales y equipos

- Tubos de cultivo de 16 x 150 mm con tapón.
- Pipetas de 1, 2 y 10 mL.
- Pipeta Pasteur.
- Caja de Petri (vidrio).
- Erlenmeyers de 250 mL.
- Agitador con calentamiento.
- Mechero (Fisher).
- Autoclave.
- Incubadora.
- Gasa, algodón e hisopo estéril.
- Papel Kraft.

1.5.5 Procedimiento

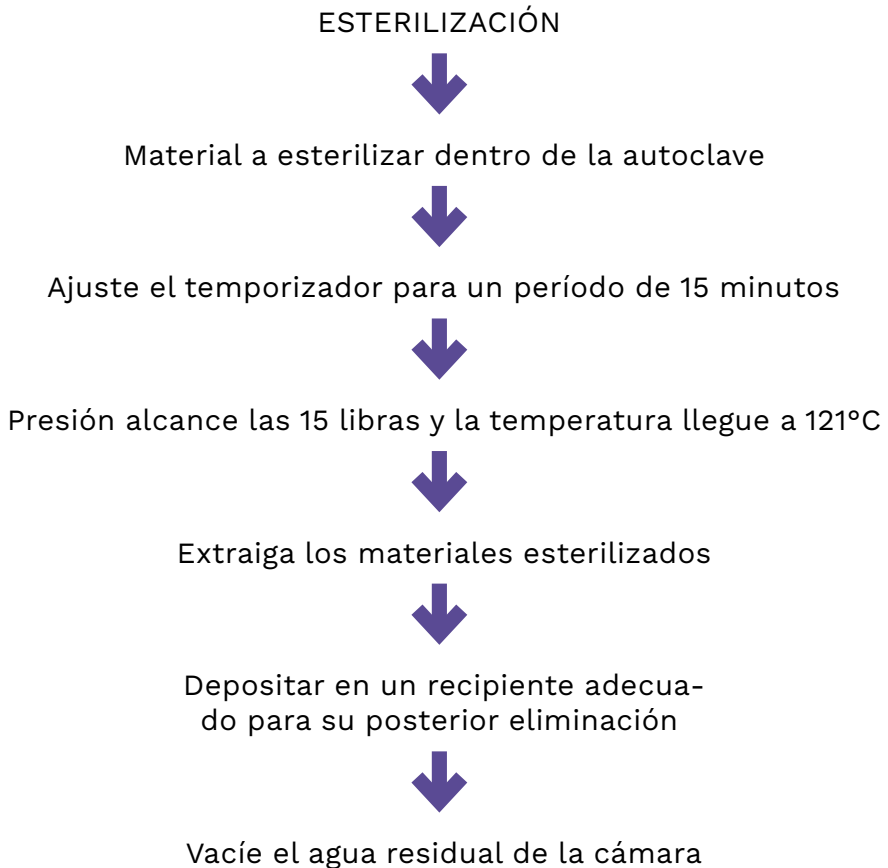
- 1.** Introduzca el material a esterilizar dentro de la autoclave.
- 2.** Ajuste el temporizador para un período de 15 minutos. El proceso de esterilización comenzará automáticamente cuando la presión alcance las 15 libras y la temperatura llegue a 121°C. Una vez finalizado el ciclo, el equipo se apagará y la válvula de escape se abrirá de manera automática.
- 3.** No abra la cámara hasta que la presión interna haya descendido completamente a cero. Al abrirla, permita que el vapor escape durante unos segundos antes de retirarla por completo.
- 4.** Extraiga los materiales esterilizados. Si se trata de líquidos, transfíralos directamente a la cámara de aislamiento.
- 5.** Vacíe el agua residual de la cámara, realice un lavado superficial y límpiela adecuadamente.
- 6.** Asegúrese de secar completamente el interior de la autoclave.

7. Mantenga la puerta de la cámara abierta durante la noche para facilitar la ventilación.
8. Una vez que el material se haya enfriado, etiquete un tubo de ensayo que contenga caldo nutritivo esterilizado y colóquelo en la incubadora pasado por el proceso de esterilización.

Observaciones y resultados

1. Describa todo el procedimiento de la esterilización de material en autoclave.
2. Después de 48 horas observe los resultados.

Flujograma



1.6 Efectos Letales de la Luz Ultravioleta

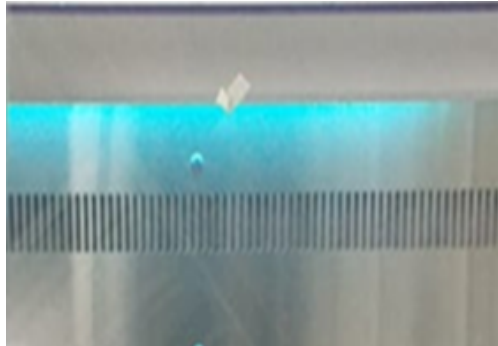
1.6.1 Introducción

Excepto para los microorganismos fotosintéticos, la mayoría de las bacterias son dañadas por la radiación ultravioleta. Aquellas que contienen pigmentos fotosintéticos requieren exposición a la luz solar con el fin de sintetizar sustancias requeridas por su metabolismo. Aunque la luz solar contiene el espectro completo de longitudes de ondas desde cortas a largas, solo las longitudes de onda corta de luz ultravioleta invisible son perjudiciales a los microbios no fotosintéticos, pues la luz ultravioleta causa mutaciones en el material genético del microorganismo (Wai et al., 2024).

Las longitudes de onda de luz pueden ser expresadas en milimicrones ($m\mu$) o unidades Ángstrom (Å). La unidad Ángstrom es igual a 10^{-8} cm. En términos de milimicrones, 10 Å equivalen a 1 milimicrón; por lo tanto, una longitud de onda de 4.5000×10^{-8} cm sería expresada como 4.500 Å , $450 m\mu$ o $0,45 \mu$.

Por definición, la luz ultravioleta incluye aquellas radiaciones electromagnéticas que caen dentro de la banda de longitud de onda que oscila entre 4.000 y 40 Å (ver figura 29). Ella une la brecha que hay entre los rayos X y las longitudes de ondas más cortas visibles al ojo humano. El rango visible está aproximadamente entre 4.000 y 7.800 Å . Actualmente, el rango práctico de ultravioleta oscila entre 2.000 y 4.000 Å . El rango "extremo" ($2.000 - 40 \text{ Å}$) incluye radiaciones que son absorbidas por el aire y, consecuentemente, funciona solamente en un vacío. Esta región también se refiere como "vacío ultravioleta".

Figura 29. Luz ultravioleta.



Los efectos germicidas de los rayos ultravioletas son limitados solamente a regiones específicas del espectro ultravioleta. La longitud de onda más efectiva es 2.650 Å. Lámparas de vapor de mercurio de presión baja, que tienen un alto rendimiento (90 %) de 2.537 Å, son muy efectivas como lámparas bactericidas. Para esta sección se toma como referencia información de los autores Amézquita-Tovar y Carvajal-Ahumada (2022).

1.6.2 Objetivo

- Demostrar el efecto letal de la luz ultravioleta en el desarrollo de los microorganismos.

1.6.3 Materiales

- » Colonias de bacterias formadoras de esporas (*Bacillus* sp.).
- » Colonias de bacterias no formadora de esporas (*Staphylococcus* sp.).
- » Cajas de Petri.
- » Agar nutritivo (AN).
- » Lámpara ultravioleta.
- » Reloj timer.

1.6.4 Procedimiento

1. Los microorganismos se sembrarán por estría en agar nutritivo o en medios selectivos, según la bacterias que se vaya a evaluar y serán expuestos a radiación ultravioleta por varios periodos de tiempo para determinar la cantidad mínima de exposición requerida para efectuar un 100 % de muerte.
2. Los tiempos de exposición serán así:
 - Bacteria formadora de esporas: 1, 2, 4, 8, 15, 30 y 60 min.
 - Bacteria no formadora de esporas: 10, 20, 40 y 80 segundos; 2:30,5 y 10 minutos.
3. Mediante un asa, estríe completamente la superficie de los medios en las cajas (Una caja por bacteria).
4. Coloque las cajas bajo la lámpara de luz ultravioleta, pero sin las tapas.
5. Cubra la mitad de cada caja con un trozo de madera rectangular.
6. Exponga las cajas durante los tiempos correctos de tiempo, y una vez expuestas, retorne las tapas e incúbelas invertidas a 37 °C durante 48 horas.

1.6.5 Observaciones y resultados

1. ¿Qué tiempo es requerido para la destrucción de la bacteria que no forma esporas como *Staphylococcus* sp.?
2. Exprese cuantitativamente cuál es más resistente, si *Bacillus* sp. o *Staphylococcus* sp. Por ejemplo, ¿cuántas veces es más resistente?
3. ¿Por qué es deseable remover las tapas de las cajas de Petri cuando se van a exponer a la luz ultravioleta?
4. ¿De qué manera la luz ultravioleta destruye los microorganismos?

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 1.

NORMAS DE TRABAJO DE LABORATORIO

Es importante considerar que un laboratorio de Microbiología Zootécnica se tienen muchos riesgos desde los biológicos, químicos, físicos, eléctricos y quemaduras, y por lo tanto, deben considerarse para disminuir todo tipo de accidentes. En este sentido, particularmente, los microorganismos pueden ser patógenos para humanos, animales, plantas y otras formas de vida, trae consigo ciertos riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados.

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA**

CAPÍTULO 2.

**Prácticas de
Microbiología General**



2.1 Control Microbiano

2.1.1 Introducción

Antes de que los seres humanos conocieran la relación microbio-enfermedad, el concepto de higiene era muy pobre, y se limitaban a evitar el contacto con los humores del cuerpo enfermo, pero en asuntos de alimentos y agua, desconocían por completo las normas higiénicas o de potabilización del agua. Los trabajos de Louis Pasteur y Robert Koch sientan las bases de la asepsia y control de los microorganismos para evitar el daño de los alimentos y bebidas (pasteurización) o evitar el contagio de enfermedades infecciosas. Durante las primeras décadas del siglo XX se desarrollaron técnicas (físicas y químicas) para controlar a los microorganismos (Cerra et al., 2013).

Actualmente nadie niega las bondades de la asepsia, la desinfección, la esterilidad y de las prácticas de saneamiento ambiental, porque estas acciones han mejorado sustancialmente la calidad de vida de las personas. Ahora los medios de comunicación masivo venden la idea del mundo “limpio” y de comprar productos para lograrlo, por lo tanto, es importante tener un conocimiento adecuado del control de los microorganismos y no pecar de consumistas, queriendo la esterilidad donde no es necesaria y creando cepas de microorganismos resistentes a los controles, situación bastante preocupante para las generaciones venideras (Cerra et al., 2013).

2.1.2 Objetivos

- Evaluar la resistencia de los microorganismos a controladores químicos (Mínima Concentración Inhibitoria -MCI-).
- Evaluar la acción de luz ultravioleta (LUV) como control de microorganismos.
- Observar la acción de sustancias vegetales sobre los microorganismos.
- Valorar el efecto del choque térmico en un microorganismo.

2.1.3 Marco teórico

El control microbiano se lleva a cabo básicamente por tres formas: control físico, control químico y control *in vivo* o quimioterapéuticos. El primero está basado especialmente en el calor y las radiaciones, así como en la presión y los filtros; en el control químico se encuentran los desinfectantes y los antisépticos; finalmente, entre los controles *in vivo* están los antibióticos y los análogos de crecimiento, que actúan sobre bacterias, mientras que los quimioterapéuticos actúan contra los virus y los inhibidores del ergosterol para los hongos (Cerra et al., 2013).

2.1.4 Materiales y equipos.

- » Alcohol.
- » Creolina.
- » Limón.
- » Sustancias vegetales microbicidas.
- » Tubos de ensayo.
- » Cajas de Petri.
- » Lámpara Luz Ultravioleta (LUV).
- » Pipetas.
- » Agar nutritivo.
- » Solución salina estéril.
- » Cepas.

2.1.5 Procedimiento.

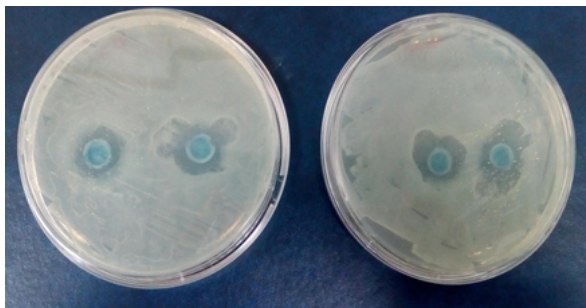
- **Evaluación del control por calor.** En un tubo estéril sembrar una asada de una colonia de *Escherichia coli* y en otro tubo una colonia de *Bacillus subtilis*; diluir en 1 mL de solución salina estéril o agua peptonada y agitar en vórtex; sumergir los tubos al baño María cuando el agua esté hirviendo; tomar una muestra con el asa, y sembrar por extensión en agar nutritivo o en agar *Plate Count* (PCA); repetir las siembras cada tres minutos hasta el minuto 12, e incubar a 37°C/24h y contar las colonias de cada caja (Santori et al., 2024).

Elaborar una gráfica de tiempo versus número de microorganismos.

- **Evaluación del control por agentes químicos (MIC).** Preparar seis tubos con 9 mL de caldo nutritivo, sembrar en cada tubo una colonia del microorganismo que se va a controlar (*Staphylococcus aureus* o *Escherichia coli*, por ejemplo). Al primer tubo añadir 1 ml de creolina, agitar bien y transferir 1 mL al segundo tubo y agitar bien, transferir 1 ml al siguiente tubo y así sucesivamente hasta el último. Incubar los tubos a 37 °C por 24 horas, observar los tubos que presenten turbidez, escoger la Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) que corresponde a la última dilución o la dilución de menor turbidez que presentó el mínimo crecimiento microbiano (es recomendable verificar este crecimiento por lectura de densidad óptica de acuerdo a la longitud de onda previamente establecida). Se puede variar el microorganismo y la sustancia que se va a evaluar, así como la dilución del controlador químico (Daza-Pérez & Martínez-Benavides, 2015).
- **Control por luz ultravioleta (LUV)**
 - » Toda la experiencia se debe realizar en la mayor oscuridad posible e incubar en ausencia de luz. Utilizar guantes y gafas de seguridad para luz ultravioleta (LUV).
 - » Tomar una colonia de *Escherichia coli*, sembrarla en 5 ml de caldo Infusión-Cerebro-Corazón (BHI) con agitación constante en vórtex, incubar a 37 °C durante 15 horas.
 - » Tomar 0.1 ml del cultivo y diluir en 9,9 ml de agua destilada estéril, transferir 100 µL a 9,9 ml de agua destilada estéril.
 - » Sembrar por extensión y con la ayuda de un rastrillo en cuatro cajas con 0,1 ml cada una con la última dilución.
 - » La caja 1 se usa como control.
 - » Ubicar las cajas 2, 3 y 4 debajo de lámpara de luz ultravioleta (LUV) (a 30 cm de distancia aproximadamente), destaparlas y dejarlas irradiar por la lámpara.
 - » A los tres minutos de irradiación, sacar la caja 2 y llevarla a la incubadora.

- » A los ocho minutos de irradiación retirar la caja 3 e incubar.
 - » A los 12 minutos retirar la caja 4 e incubar.
 - » Contar las colonias en las cajas 1, 2, 3, y 4.
 - » Calcular el porcentaje de sobrevivencia dividiendo el número de colonias (NC) en cada caja irradiada sobre el NC en la caja control.
 - » Se puede repetir esta misma práctica con la diferencia de exponer las cajas irradiadas a 10 minutos a la luz blanca, luego incubarlas en la oscuridad. Este procedimiento puede ocasionar fotorreparación del ADN y repara algunas mutaciones producidas por el ADN. Comparar las cajas sin y con exposición a la luz.
- **Control por pozos.** Tomar una colonia de *Staphylococcus aureus* y diluirla en 10 ml de agua destilada Estéril (ADE) con agitación constante en vórtex, tomar de ahí 1 ml, trasladarlo a una caja de Petri vacía y estéril (ver figura 30). Posteriormente, verter el Agar *Plate Count* (PCA) fundido, esperar que se solidifique, construir tres pozos en el agar, en cada uno de ellos agregar 100 μ L de tres soluciones de antibiótico o de un control vegetal. Observar el crecimiento de la bacteria alrededor del pozo (Daza-Pérez & Martínez-Benavides, 2015).

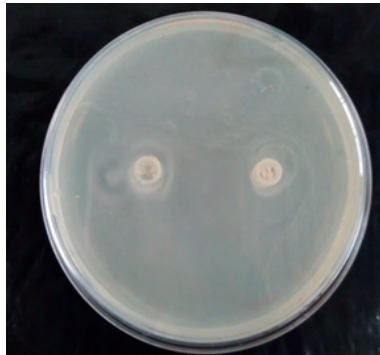
Figura 30. Control por pozos.



- **Control por sensidiscos.** Tomar una colonia de *Staphylococcus aureus* y diluirla en 10 mL de Agua Destilada Estéril (ADE),

tomar de ahí 1 mL por cada tubo y diluirlo en cada tubo de AgarPlate Count (PCA) fundido a 45°C, que contiene 10 mL de PCA, verter el agar en una caja de Petri y esperar a que solidifique. Preparar tres extractos etanólicos de plantas (manzanilla, orégano y cedrón) que según la literatura o la tradición popular tengan control sobre infecciones de heridas. Recortar trozos de cartón dúplex circulares de 5 mm de diámetro, sumergirlos en cada extracto etanólico, impregnar, además, otros con el alcohol que se usó como diluyente (ver figura 31). Con la ayuda de una pinza estéril poner los sensibilizadores (tres de los extractos y uno de alcohol) en la caja de Petri de forma que queden equidistantes, repetir el proceso en otras dos cajas (Daza-Pérez & Martínez-Benavides, 2015).

Figura 31. Control por sensibilizador.



2.2 Presencia de Microorganismos en La Naturaleza.

2.2.1 Introducción

La actividad de los microorganismos se evidencia en diferentes entornos y materiales donde se llevan a cabo varias funciones, ya sean estas beneficiosas o dañinas. Los microorganismos son componentes esenciales de la biósfera ya que están presentes en todos los lugares donde haya vida, pudiéndose desarrollarse en condiciones ideales y extremas (Dion, 2023).

De acuerdo con Jurado et al. (2021), La unicidad de los microorganismos se fundamenta en tres rasgos fundamentales:

- Su pequeño tamaño les otorga una gran capacidad de dispersión.
- Su variabilidad y adaptabilidad metabólica les permite resistir y ajustarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables.
- Su plasticidad genética (o gran capacidad para transferir genes horizontalmente) les facilita recombinar y acumular características favorables, permitiéndoles perdurar y adaptarse durante largos períodos a las cambiantes condiciones del entorno.

A pesar de la continua relación "rechazo" (enfermedad, degradación), "dependencia" (empleo de bacterias para producir enzimas, cerveza, antibioticos, quesos, entre otros), entre las personas y los microorganismos, este conjunto de seres "invisibles" simbolizan un extenso campo de conocimiento y diversidad biológica inexplorado. Sin el conocimiento de los microorganismos la biología sería mucho más limitada, no se sabría de la vida en condiciones extremas de temperatura, salinidad o pH (Caro-Astorga et al., 2024).

2.2.2 Objetivos

- Examinar la presencia de bacterias en el entorno.
- Confirmar en microbiología el principio de la ubicuidad.

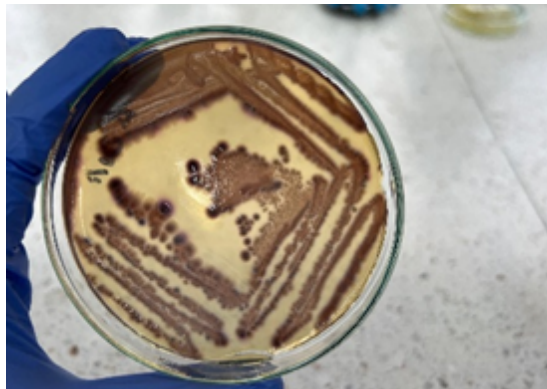
2.2.3 Materiales y equipos

- Cajas de Petri con agar nutritivo y agar Saboraud.
- Mecheros.
- Asas de platino.
- Cinta vinipel.

2.2.4 Procedimiento

- a.** Bacterias que están suspendidas en el aire.
- Seleccione dos cajas de Petri: una que contenga agar nutritivo y otra con agar Sabouraud. Ábralas y colóquelas en un área determinada dentro del laboratorio de Microbiología.
 - Deje las cajas expuestas durante 30 minutos. Luego, cúbralas, séllelas con cinta vinipel y etiquételas correctamente.
 - Incube las muestras a 37°C por un período de 24 horas.
 - Después de este período, observe el desarrollo de microorganismos en las cajas de Petri.
 - Analice, compare y describa las colonias observadas con ayuda de la figura (ver figura 32).

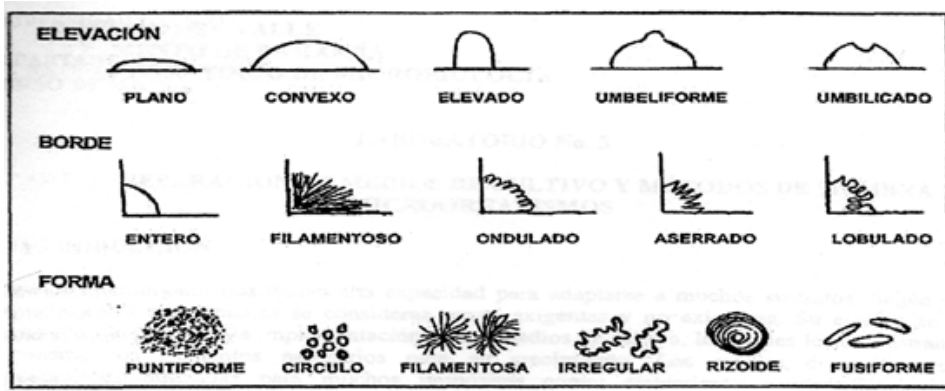
Figura 32. Cultivo ambiental.



2.2.5 Observaciones y resultados

1. Mencione acciones buenas o perjudiciales de los microorganismos hacia los humanos.
2. ¿A qué se refiere cuándo se menciona el término aislamiento?
3. Que significa colonia (ver figura 33).

Figura 33. Formas de agrupación de las colonias en el medio de cultivo.



Fuente: Vallaneti et al. (2012)

2.3 Preparación de Medios de Cultivo y Métodos de Siembra de Microorganismos

2.3.1 Introducción

Algunos microbios poseen una gran habilidad para ajustarse a diversos sustratos. Se clasifican sus necesidades nutricionales en exigentes y no exigentes. Se ha logrado su estudio mediante la aplicación de medios de cultivo, que proporcionan al microorganismo los elementos y factores de crecimiento requeridos para su evolución. Los medios de cultivo son preparaciones utilizadas para muchos propósitos como: aislamiento e identificación de microorganismos, análisis ambientales, análisis de alimentos y prueba de sensibilidad a los antibióticos (Camaró-Sala et al., 2015).

Jurado et al. (2021) Menciona que, aunque los distintos medios de cultivo contienen diversas sustancias según el tipo de microorganismo que se busca aislar, muchos de ellos pueden desarrollarse en medios básicos elaborados a partir de:

- **Agentes solidificantes:** Agar, gelatina, agarosa, agar nutritivo.

- **Peptonas:** su pureza y calidad fluctúan en función del tipo de hidrólisis efectuada.
- **Infusión y extractos:** usualmente provienen de carne y otros tejidos; se refiere al material proteico, que se puede disolver en agua, sin presencia de actividad enzimática.

Usualmente, los medios de cultivo pueden incluir:

- » Tintes que ayudan a teñir las paredes del microorganismo, como por ejemplo: violeta cristalina, safranina y verde de malaquita.
- » Dispersantes como cloruro de sodio o tween.
- » Indicadores de pH.
- » Agentes antimicrobianos: sulfamidas.

Los medios de cultivo pueden clasificarse en:

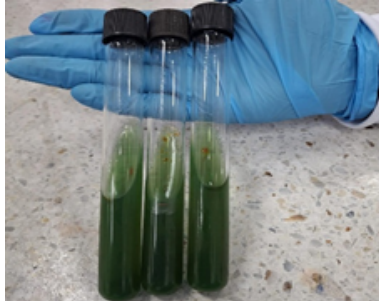
- » **Sólidos:** contienen sustancias como agar, gelatina o huevo coagulado (ver figura 34).
- » **Líquidos:** no poseen agar ni otro agente solidificante y son conocidos como caldos de cultivo.
- » **Semilíquidos:** presentan propiedades intermedias entre los medios sólidos y líquidos.

Figura 34. Medio de cultivo



Hay otros medios de cultivo que se emplean con objetivos particulares. Este conjunto incluye: **medios selectivos, diferenciales, de conservación, medios no selectivos y enriquecidos** (ver figura 35).

Figura 35. Medios de cultivo sólido en tubo de ensayo.



2.3.2 Objetivos

- Entender el procedimiento de elaboración de un medio de cultivo y valorar la relevancia de sus elementos para el desarrollo de microorganismos.
- Entender el procedimiento de elaboración de un medio de cultivo y valorar la relevancia de sus elementos para el desarrollo de microorganismos.

2.3.3 Materiales y equipos

- Mecheros.
- Asas.
- Cajas de Petri estériles.
- Medios de cultivos líquidos y sólidos estériles.
- Alcohol al 96%.

2.3.4 Procedimiento

Preparación de medios de cultivo. Según Jurado et al. (2021), Los medios de cultivo pueden elaborarse a partir de sus componentes o de acuerdo a las sugerencias del productor. Cuando se obtiene comercialmente, existen varias normas que se deben respetar para garantizar la calidad óptima del medio elaborado.

Estas reglas incluyen:

- El agua utilizada debe ser destilada, bidestilada o desmineralizada, y debe proceder de un sistema de destilación apropiado. Su medición debe ser precisa, evitando aproximaciones que puedan afectar la consistencia del medio.
- Si los ingredientes para la preparación del medio de cultivo están deshidratados, deben dejarse en remojo durante 15 minutos para lograr una hidratación completa de las moléculas. Esto ayuda a evitar un calentamiento excesivo que podría causar evaporación y descomposición del medio.
- Antes de ser esterilizado en autoclave, el medio debe disolverse completamente. No se recomienda disolverlo directamente con el calor del autoclave, ya que el exceso de temperatura puede generar grumos por una disolución inadecuada.
- Los medios de cultivo que contienen suplementos como yema de huevo, carbohidratos, urea y antibióticos u otros nutrientes deben ser esterilizados mediante filtración o vapor fluente, ya que no pueden someterse a la autoclave. En este caso, solo el medio base se esteriliza en autoclave y los suplementos se incorporan cuando la temperatura del medio base se encuentra entre 45 y 50 °C.
- Una vez preparados y servidos en cajas de Petri estériles, los medios de cultivo deben colocarse en posición invertida para eliminar el exceso de humedad en la superficie y reducir el riesgo de contaminación.
- Las cajas con el medio de cultivo pueden guardarse en refrigeración dentro de bolsas plásticas por un máximo de tres semanas, dependiendo del tipo de medio. Sin embargo, los medios que contienen antibióticos deben utilizarse en un plazo inferior a dos semanas.

Flujograma

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS



Seguir las instrucciones de preparación del medio de cultivo, sea sólido, semisólido y líquido



Usar agua utilizada que debe ser destilada, bidestilada o desmineralizada



Antes de ser esterilizado en autoclave, el medio debe disolverse completamente hasta ebullición



Ajuste el temporizador para un período de 15 minutos



La presión debe alcance las 15 libras y la temperatura llegue a 121°C



Extraiga los medios de cultivo esterilizados

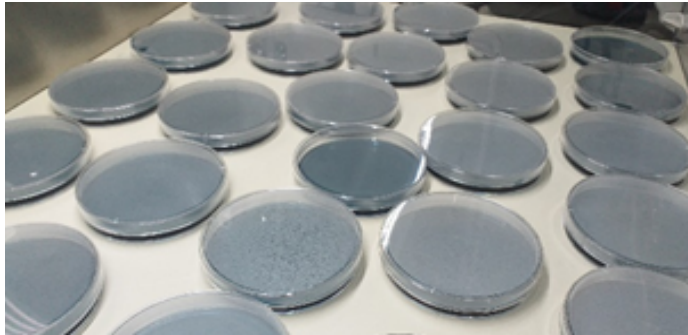


Depositar en cajas de Petri estériles el agar y retirar los tubos de ensayo con medio líquido. Todo lo anterior, en cámara de flujo laminar



Guardar todos los medios de cultivo en nevera para su posterior uso

Figura 36. Medios de cultivo sólido en cajas de Petri.



Caracterización de medios de cultivo comerciales

- Revise los medios de cultivo deshidratados y otros componentes dispuestos en la mesa del laboratorio. Registre la siguiente información: nombre, composición, aplicaciones y método de preparación.
- Abra el envase y, sin entrar en contacto directo con el contenido, observe sus características, incluyendo color, olor y textura (ya sea en forma de cristales, gránulos o polvo).

Preparación de medios de cultivo y caldo nutritivo.

Cálculos iniciales: Determine las cantidades requeridas para elaborar 250 mL de agar nutritivo comercial y 250 mL de caldo nutritivo, basándose en las proporciones indicadas (ejemplo: 20 g/L, según el medio).

Preparación del medio:

- Consulte las indicaciones del envase para ajustar las concentraciones.
- Verifique y corrija el pH según las especificaciones.

- Disuelva los componentes en un matraz Erlenmeyer bajo agitación constante, evitando llegar al punto de ebullición.
- Precaución: Utilice guantes protectores durante el proceso.

Material proporcionado:

- El laboratorio suministrará medio esterilizado en cajas de Petri, tubos con agar en slant (inclinado) y caldo nutritivo para inoculación bacteriana.
- Los estudiantes emplearán tanto el medio previamente preparado como el elaborado durante la práctica.

Métodos de siembra

Siembra en tubo con medio sólido inclinado.

- Utilizando un asa previamente esterilizada y enfriada, tome una muestra de bacterias e introdúzcala en línea recta en un tubo de ensayo con agar nutritivo inclinado. Inocule el microorganismo sobre la superficie del medio, luego flamee la boca del tubo y ciérrelo. Posteriormente, esterilice nuevamente el asa y repita el procedimiento con cada uno de los cultivos bacterianos proporcionados (ver figura 37). No olvide etiquetar correctamente.
- En esta prueba, después de 24 horas de incubación, observe el tipo de crecimiento bacteriano en función de las siguientes características:
 - **Filiforme:** Desarrollo uniforme a lo largo de la línea de inoculación.
 - **Equinulado:** Bordes irregulares con aspecto dentado.
 - **Rosariforme:** Colonias separadas, dispuestas casi juntas o en forma de rosario, con un crecimiento semifloculento.
 - **Efuso:** Crecimiento muy tenue, similar a un velo.
 - **Arborescente:** Patrón de desarrollo ramificado o en forma de árbol.
 - **Rizoide:** Apariencia similar a raíces.

Figura 37. Siembra en tubo con medio inclinado.



- Inocule en tubos con caldo nutritivo las mismas bacterias utilizadas en el procedimiento anterior. Luego de 24 horas de incubación, observe el tipo de crecimiento. No olvide etiquetar correctamente cada tubo.
- Evalúe el desarrollo bacteriano en el medio líquido según las siguientes categorías:
 - **Superficial:** Formación de una película en la superficie, ya sea membranosa o con masas flotantes de bacterias (floculenta).
 - **Sub-superficial:** Apariencia turbia, con partículas granuladas, floculentas o escamosas dispersas en el líquido.
 - **Sedimento:** Acumulación bacteriana en el fondo del tubo, con textura granular, floculenta, escamosa o viscosa.
- Tome una nueva muestra de cada cultivo bacteriano y extiéndala cuidadosamente en forma horizontal sobre la superficie del agar en las cajas de Petri.
- Cubra la caja, esterilice el asa y repita el proceso con los demás cultivos. Recuerde etiquetar correctamente cada muestra.
- **Siembra en superficie**
- Antes de comenzar el procedimiento de siembra, flamee y deje enfriar el asa bacteriológica (ver figura 38).

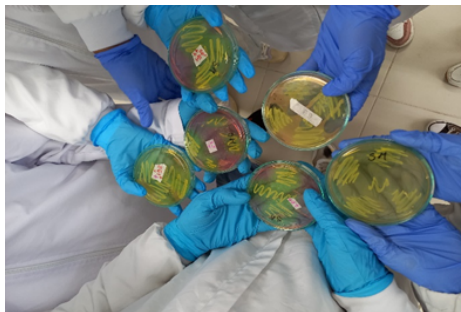
Figura 38. Siembra en caja de Petri con medio sólido.



Siembra por estría

- Utilizando el asa bacteriológica, recoja una muestra de un tubo que contenga un cultivo bacteriano mixto y siembrela en un tercio de la caja de Petri con agar nutritivo.
- Esterilice el asa con la llama y deje que se enfríe.
- En uno de los extremos de la caja, realice trazos suaves y horizontales sobre la superficie del agar, formando estrías. Luego, flamee nuevamente el asa, gire la caja 90° y repita el procedimiento, formando nuevas estrías. Continúe este proceso en los tres extremos restantes.
- Al llegar al último extremo, tenga precaución de no tocar con el asa el primer conjunto de estrías que realizó (ver figura 39).

Figura 39. Siembra por estría en caja de Petri con medio sólido.



Siembra por agotamiento

- Con el asa de argolla, tome una muestra bacteriana y, en un extremo de la caja de Petri con medio de cultivo, realice trazos suaves de un lado a otro cubriendo un tercio de la caja. A partir de ahí, reduzca progresivamente el rayado hasta finalizar en el punto medio del otro extremo de la caja.

Siembra en profundidad o vertido en placa

- Para esta técnica, primero prepare diluciones en agua peptonada hasta alcanzar una concentración de 10^{-3} .
- Etiquete cada dilución como 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
- Utilice pipetas estériles para cada dilución.
- Deposite 1 mL de cada dilución en el centro de una caja de Petri estéril vacía.
- Vierta el medio de cultivo Plate Count Agar (PCA), previamente fundido a 45°C , sobre la caja de Petri con la dilución.
- Mezcle mediante movimientos giratorios horizontales en varias direcciones, evitando la formación de burbujas y el derrame del medio.
- Deje solidificar e incube.

Siembra por punción o picadura

- Emplee un medio de cultivo sólido e inclinado en un tubo de ensayo.
- Esterilice el asa de punta recta en la llama y enfríela antes de proceder.
- Tome una muestra del cultivo microbiano e insértela en el medio de cultivo mediante una punción vertical con el asa.
- Desinfecte la boca del tubo mediante flameado antes de cerrarlo.

- Vuelva a esterilizar el asa.
- Incube el cultivo durante 24 horas y observe la forma del crecimiento.

NOTA: Esterilice el asa en la llama del mechero, calentándola completamente hasta que se ponga roja y se introduce sólo hasta la porción que se ha esterilizado, de lo contrario se puede contaminar el medio de cultivo con bacterias diferentes a las que se quiere trabajar (ver figura 33).

2.3.5 Observaciones y resultados

Identificación de procesos microbiológicos en medios de cultivo.

1. Analice los distintos tipos de medios de cultivo empleados en microbiología, incluyendo selectivos, diferenciales, de mantenimiento, no selectivos y enriquecidos.
2. Proporcione ejemplos de cada categoría e indique el procedimiento adecuado para su preparación.

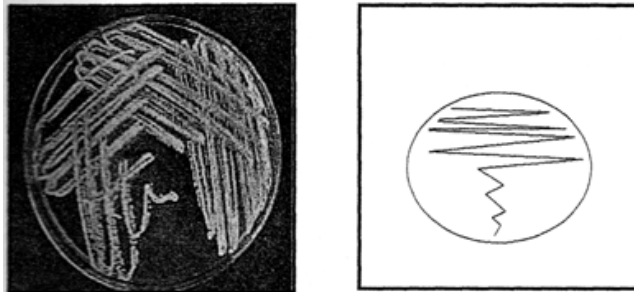
Adición de antibióticos a un medio de cultivo

3. Describa el procedimiento necesario para incorporar un antibiótico en un medio de cultivo, asegurando que se mantenga su estabilidad y eficacia.

Tabla de medios de cultivo para bacterias específicas

4. Elabore una tabla que relacione los medios de cultivo más adecuados para el crecimiento de las siguientes bacterias:
 - *Salmonella typhi*
 - *Escherichia coli*
 - *Staphylococcus aureus*
 - *Streptococcus agalactiae*
 - *Clostridium botulinum*

Figura 40. Métodos de siembra.



Fuente: Kramer et al. (2002)

2.4 Morfología Bacteriana y Fundamentos de Tinción

2.4.1 Introducción

La identificación del tamaño y la forma de los microorganismos es crucial para su clasificación. Mediante el análisis de sus características morfológicas, es posible reconocerlos, siempre complementado con una revisión adecuada de la literatura científica. Para simplificar el estudio de la morfología y el tamaño de las bacterias, se puede observarlas de manera directa, sin teñir, para evaluar su movilidad, o bien teñirlas con colorantes (Vargas-Flores & Kuno-Vargas, 2014).

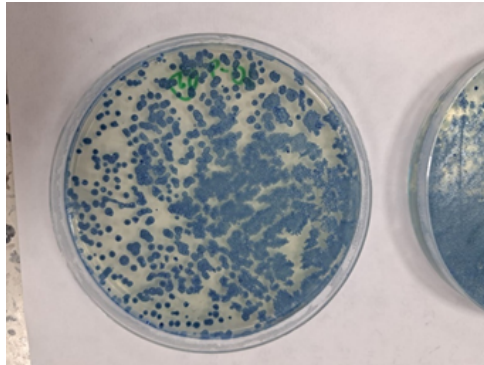
Los colorantes son sustancias orgánicas que contienen grupos cromóforos (responsables del color), y pueden clasificarse como ácidos, básicos o neutros. Los colorantes ácidos tiñen las partes celulares que tienen características básicas, mientras que los básicos tiñen las partes ácidas. La coloración de las células resulta de una interacción entre fenómenos químicos y físicos, como la capilaridad, adsorción, ósmosis y el intercambio de iones entre el colorante y los sitios activos en la superficie o el interior de la célula. Es fundamental que todos los colorantes se preparen en el laboratorio siguiendo las recomendaciones del fabricante (Vargas-Flores & Kuno-Vargas, 2014). Es importante

seguir cuidadosamente las instrucciones al preparar mezclas o soluciones con varios colorantes, ya que el tiempo y las condiciones de almacenamiento son factores determinantes para la composición y calidad del colorante final. En el análisis de microorganismos se emplean dos tipos de coloración:

a. Coloración simple.

Este procedimiento implica colorear una célula, empleando un único tinte, ya sea ácido o básico. Los azules de metileno, cristal violeta, fucsina o safranina son los más utilizados. Estos tintes se utilizan para valorar la forma y el tamaño, aunque no revelan pormenores de la estructura interna (ver figura 41).

Figura 41. Coloración simple.



b. Coloración diferencial.

Este método permite observar la estructura interna de las células. Las *tinciones diferenciales* más utilizadas son:

1. Coloración de Gram.
2. Coloración de Cápsula.
3. Coloración de Espora.
4. Prueba de KOH.

Otra prueba importante y que no implica el uso de colorantes pero que sirve para la clasificación de las bacterias es la Prueba de Motilidad.

De acuerdo con Benitez-Campo y Bolaños (2018), la tinción de Gram, desarrollada por el danés Hans Gram en 1884, permite distinguir bacterias según la estructura de su pared celular. Al observar un extendido de flora bacteriana mixta teñido con este método, se pueden identificar las diferencias características entre los microorganismos. Muchas bacterias retienen el complejo violeta-yodo, lo que las tiñe de púrpura (Gram positivas), mientras que otras se tiñen de rojo al aplicar safranina o un colorante utilizado para la contra-coloración (Gram negativas). Este procedimiento facilita la observación de la forma, el tamaño y otros detalles estructurales, diferenciando dos grupos de bacterias según su reacción frente a los colorantes (Gram-positivas y Gram-negativas). Las diferencias en las reacciones de ambos grupos se deben a su composición química: las células Gram-negativas contienen una mayor cantidad de lípidos en su pared, lo que hace que el alcohol extraiga el lípido, aumentando la permeabilidad celular. Como resultado, el complejo cristal violeta-yodo se pierde y se tiñen de rojo con safranina o fucsina. En las células Gram-positivas, la deshidratación provocada por el alcohol reduce la permeabilidad, lo que permite que el cristal violeta se retenga tras la decoloración. En cultivos muy jóvenes o viejos, los resultados de la tinción pueden ser atípicos (Vargas-Flores & Kuno-Vargas, 2014). La distribución del peptidoglicano o mureína en la pared celular determina el tipo de tinción que retienen las bacterias. Aquellas que no conservan el color violeta con este método se consideran Gram negativas. Estas presentan una pared más delgada, con menos capas de peptidoglicano, y una membrana externa rica en lípidos, lo que impide que se adhiera la tinción Gram. Al observarlas al microscopio, aparecen de color rosa.

- » **La cápsula es una estructura típica de algunas bacterias.** Técnicas de visualización capsular:
 - **La identificación de cápsulas bacterianas requiere técnicas específicas de tinción.** Algunos protocolos, como la técnica de Anthony, se basan en teñir la célula y el entorno circundante, dejando la cápsula sin coloración directa. Esto genera un contraste que

resalta la envoltura transparente como un halo alrededor del microorganismo.

- **Enfoques diferenciales:**

- Otros métodos emplean tinciones diferenciales, donde la cápsula puede adsorber un segundo colorante (contracoloración), permitiendo distinguirla de otras estructuras celulares. Este enfoque facilita la diferenciación visual entre componentes bacterianos y su matriz extracelular.

- **Coloración negativa:**

- Una alternativa es la tinción negativa, como el método que utiliza tinta de India (Aguirre-Medina et al., 2015). Aquí, la cápsula repele el colorante, quedando como una zona clara sobre un fondo oscuro, ideal para observar bordes definidos en microscopía.

- » **Las esporas son estructuras características de algunas bacterias;** Estas son bastante resistentes a los agentes físicos y químicos y no se tiñen con facilidad. Por lo general, se requiere el calor para permitir la penetración del colorante en las esporas (Aguirre-Medina et al., 2015).
- » La prueba de KOH es un método moderno y sencillo para diagnosticar las bacterias, el cual permite diferenciar el tipo de pared celular bacteriana. Este método cumple con la misma función que la tinción de Gram, pero se obvian una serie de pasos y la prueba resulta más eficiente (Aguirre-Medina et al., 2015).
- » Algunas bacterias poseen la capacidad de motilidad, esto se debe a la existencia de flagelos. Este hecho puede ser comprobado con facilidad en circunstancias de laboratorio.

2.4.2 Objetivos

- Obtener habilidad en la elaboración de placas para extender cultivos de bacterias.

- Examinar con diversos tintes la forma, el tamaño, la variación en la composición de la pared, la cápsula y las esporas en ciertas bacterias.
- Comprobar que la prueba de KOH es más rápida y eficiente.
- Observar la actividad de ciertas especies bacterianas mediante el microscopio.

2.4.3 Materiales y métodos

- Láminas cubre y porta objetos
- Asas
- Goteros
- Mecheros
- Colorantes: nigrosina o tinta china, fucsina o safranina, azul de metileno.
- Bacterias
- Aceite de inmersión
- Agua destilada
- Logol para Gram
- Alcohol acetona
- Sulfato de cobre
- solución de malaquita (5%)
- Cajas de petri
- Papel filtro esteril
- Tubos de ensayo
- Microscopio

2.4.4 Procedimiento

Preparación de extendidos

- Esterilice el asa que contiene bacterias, situándolo verticalmente en la llama del fuego hasta que se quemé.
- Comprenda el asa al colocarlo al borde del medio de cultivo o al esperar unos segundos junto a la llama del ventilador.

- Deposite una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos previamente desengrasado, utilizando un asa de inoculación estéril.
 - **Recolección de muestra:** Con el asa de alambre estéril, tome mínimamente una porción de colonia bacteriana, evitando arrastrar residuos del medio de cultivo sólido.

Elaboración del frotis:

- Combine la muestra con la gota de agua en el portaobjetos.
- Realice una extensión uniforme y delgada para lograr una distribución bacteriana óptima.

Nota: Si la suspensión forma gotas en lugar de esparcirse, el portaobjetos presenta grasa residual. En tal caso, repita el proceso en uno nuevo debidamente limpiado con alcohol-etéter.

- Para el caso de cultivos líquidos se coloca directamente la gota con medio de cultivo en el portaobjetos y se fija por calor con el mechero. Es recomendable que antes de tomar la muestra, se lleve el tubo de ensayo con ésta al vórtex para una adecuada homogenización de la misma.
- Efectúe una extensión del cultivo de la bacteria proporcionados (se pueden colocar dos bacterias distintas por cada lámina, pero, ya que se utilice el mismo tinte después).

Procedimiento de fijación de la muestra:

- Permita que el frotis bacteriano seque de forma natural a temperatura ambiente.
- Realice la fijación térmica exponiendo la lámina brevemente a la llama de un mechero (2-3 pasadas rápidas), asegurando que los microorganismos queden inmovilizados en el portaobjetos sin carbonizarse.

Coloraciones simples

- Ubique las láminas portaobjetos sobre las que llevó a cabo los extendidos en una placa de coloración.
- Comprenda completamente los extendidos con los tintes, pero cada uno de manera individual. Es necesario tener un extendido de cada bacteria para ponerle un colorante a cada una. Permita que los colorantes operen de esta manera:
- **Cristal violeta:** 1 minuto
- **Azul de metileno:** 5 minutos
- **Fucsina o Safranina:** 30 segundos
- Las placas deben ser lavadas con agua destilada, escurrir y dejarlas secar a temperatura ambiente. Observe al microscopio utilizando lentes de 40X y luego de 100X (aplique aceite de inmersión).

Coloración negativa

- Coloque una gota de nigrosina o tinta china en un extremo de un portaobjetos. Con el asa, tome una muestra de cualquiera de las bacterias proporcionadas y mézclela suavemente con la gota. Luego, use otro portaobjetos limpio para extender la mezcla, formando una capa delgada. Deje secar.
- Una vez que las láminas estén secas, observe al microscopio a 40X y 100X. Describa las formas, coloraciones y distribución de los microorganismos. Realice esquemas de las observaciones realizadas.

2.5 Coloraciones Diferenciales

2.5.1 Introducción

Los colorantes diferenciales son una alternativa para identificar ciertos grupos de microorganismos, estos actúan de diferente manera, especialmente los Gram negativos y los Gram positivos. Por

esta razón, permite realizar diferentes tipos de identificación y con ello, se adaptan a diversos microorganismos, de acuerdo con las características físicas que posee (Espinoza-Santillán et al., 2016).

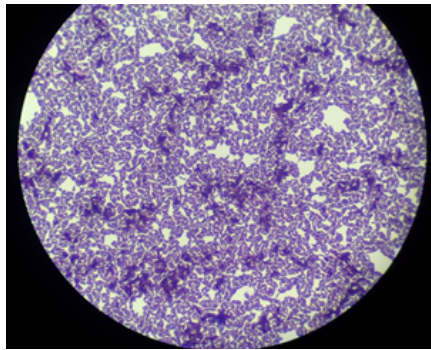
2.5.1.1 Coloración de Gram. La tinción de Gram es un tipo de tinción que se realiza sobre las bacterias para observarlas mejor bajo el microscopio (ver figura 35).

- Realizar un extendido fino de una colonia bacteriana y dejar que se seque al aire.
- Fijar el material al portaobjetos para evitar que se desprenda durante la tinción, pasándolo tres o cuatro veces por la llama del mechero.
- Luego, se coloca la preparación en el soporte para la tinción y cubrirlo con solución de cristal violeta por 1 minuto.
- Enjuagar cuidadosamente con agua destilada estéril (ADE).
- Cubra el preparado con solución de yodo (Lugol de Gram) durante 1 minuto.
- Volver a lavar con ADE.
- Sostener el portaobjetos con el pulgar y el índice y aplicar unas gotas de colorante (Alcohol-acetona) en la superficie durante 10-20 segundos, dependiendo del grosor del extendido (fase crítica).
- Enjuagar nuevamente con agua destilada y colocar el portaobjetos sobre el soporte; luego, cubrirlo con safranina o la coloración elegida elegido para la contra-tinción durante 30 segundos y lavar con agua estéril.
- Examinar el preparado al microscopio, primero con objetivo 40X y luego con 100X (usar aceite de inmersión). Las bacterias Gram-positivas se observan de color violeta o azul y las Gram-negativas rojas o rosadas (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

2.5.1.2 Coloración de cápsula (método de Anthony)

- Realice un extendido delgado y uniforme de un cultivo bacteriano de *Klebsiella pneumoniae* utilizando un portaobjetos en ángulo recto.
- Deje secar al aire, sin fijar con calor.
- Tiña con una solución acuosa de cristal violeta al 1% durante 2 minutos.
- Enjuague con una solución de sulfato de cobre al 20%.
- Deje secar al aire en posición vertical y observe bajo el microscopio.
- La cápsula aparecerá de color azul pálido, mientras que las células se teñirán de púrpura intenso, con un fondo claro.

Figura 42. Coloración de Gram.



2.5.1.3 Coloración de esporas.

- a. Realice un extendido de una colonia bacteriana tomada del agar con el asa bacteriológica de un cultivo de *Clostridium perfringens* o *Bacillus cereus*. Cubra el portaobjetos con una tira de papel filtro.
- b. Sumerja todo el portaobjetos en una solución acuosa de Verde Malaquita al 5%.

- c. Caliente el portaobjetos sobre un beaker con agua hirviendo (al vapor) durante 3 a 6 minutos, asegurándose de que no se seque. Si es necesario, agregue más colorante.
- d. Enjuague con agua destilada.
- e. Realice una contracoloración con solución de Safranina al 0.5% durante 30 segundos.
- f. Lave nuevamente con agua destilada y deje secar al aire.
- g. Observe las esporas, que aparecerán como esférulas verdes, dentro de las células bacterianas teñidas de rojo o rosado, o junto a desechos de color rojo o rosado.

2.5.1.4 Prueba de KOH

Flamee el asa de argolla, tome una gota de KOH al 3%. Tome una muestra de la colonia bacteriana pura y estríela sobre el portaobjetos (KOH+ bacteria), deje reposar por 30 segundos. Con el pabillo de madera frotar la mezcla y observar la apariencia mucóide.

La presencia de moco en la mezcla nos indicará tinción de Gram-negativa; ausencia de moco en la mezcla indicará tinción de Gram-positiva.

2.5.2 Prueba de motilidad

- Ponga una gota de agua sobre un portaobjetos.
- Con un asa esterilizada, tome una pequeña cantidad de la muestra de cultivo bacteriano, preferentemente de *Escherichia coli* o *Salmonella typhi* (por su presencia de flagelos).
- Coloque con cuidado el asa sobre la gota de agua, evitando que se derrame por toda la lámina.
- Ponga una lámina cubreobjetos sobre la gota y observe al microscopio.

2.5.3 Observaciones y resultados

- Determine el fundamento de la tinción de Gram, para saber su importancia para clasificar los microorganismos.
- ¿Cuál es la importancia de identificar la cápsula y espora en las bacterias?
- Mencione ejemplos de bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Esta sección del libro tomo información de los autores González Meléndez et al., (2018).

2.6 Aislamiento de Bacteriófagos

2.6.1 Introducción

Los virus son moléculas de *ADN* o *ARN* rodeadas por una envoltura proteica que necesitan células viables para replicarse. Los virus utilizan la maquinaria metabólica de las células para sintetizar su material genético y proteínas de la envoltura. Hay diferentes tipos de virus que pueden infectar células procariontas o eucariotas. Los bacteriófagos o fagos son virus que se reproducen en células procariontes (Samaniego-Moreno et al., 2012).

Los bacteriófagos (fagos) son parásitos intracelulares obligados que se replican dentro de las bacterias, utilizando algunas o todas sus maquinarias biosintéticas. El genoma de los fagos puede ser *ARN simple cadena* (MS2, QB), *ARN doble cadena* (phi 6), *ADN simple cadena* (phi X174, fd, M13) o *ADN doble cadena* (T3, T7, lambda, T5, Mu, T2, T4). Estos ácidos nucleicos pueden contener bases inusuales que son sintetizadas por proteínas del fago. En los T-pares el genoma no contiene citosina, sino 5-hidroximetilcitosina, mientras que en otros tipos de fagos alguna de las bases está parcialmente sustituida (Samaniego-Moreno et al., 2012).

Los bacteriófagos se emplean actualmente como vectores de clonación en el campo de la ingeniería genética y su estudio

tiene implicaciones importantes en la medicina y la genética, en concreto, en la comprensión de las infecciones virales, defectos genéticos, problemas de desarrollo del cáncer y la resistencia de las bacterias a los antibióticos (Samaniego-Moreno et al., 2012).

2.6.2 Objetivo

- Aislar virus bacterianos utilizando técnicas adecuadas.
- Aprender a trabajar con Bacteriófagos.

2.6.3 Marco teórico

Los bacteriófagos o virus bacterianos son sumamente abundantes y, en términos numéricos, los organismos más comunes de la biosfera. Algunos de estos virus tienen la capacidad de transferir genes de manera horizontal. Además, una proporción considerable de los genes en ciertas bacterias provienen de virus, y algunos de estos genes otorgan nuevas características a las cepas que los incorporan, en un proceso denominado conversión fágica. Entre estos fagos se encuentran aquellos que transportan los genes de la toxina-Shiga (Samaniego-Moreno et al., 2012).

2.6.3.1 Composición y estructura del bacteriófago

- Los bacteriófagos presentan una **composición variable**, pero siempre contienen ácido nucleico y proteínas. El tipo de ácido nucleico puede ser ADN o ARN, pero nunca ambos, y su estructura puede variar según el tipo de fago. Con frecuencia, estos ácidos nucleicos incluyen bases inusuales o modificadas que los protegen de las endonucleasas del huésped durante el proceso de infección. La cantidad de ácido nucleico varía según el fago: los más simples solo codifican de tres a cinco productos génicos, mientras que los más complejos pueden codificar más de 100 (Zhao et al., 2021).

En cuanto a las proteínas, su variedad y cantidad dependen de la clase de fago. Los fagos más simples tienen solo una o dos proteínas en múltiples copias, mientras que los más complejos presentan una gran diversidad de proteínas.

Durante la infección, estas proteínas desempeñan una función protectora al resguardar el ácido nucleico de posibles ataques por nucleasas presentes en el entorno (Samson et al., 2024).

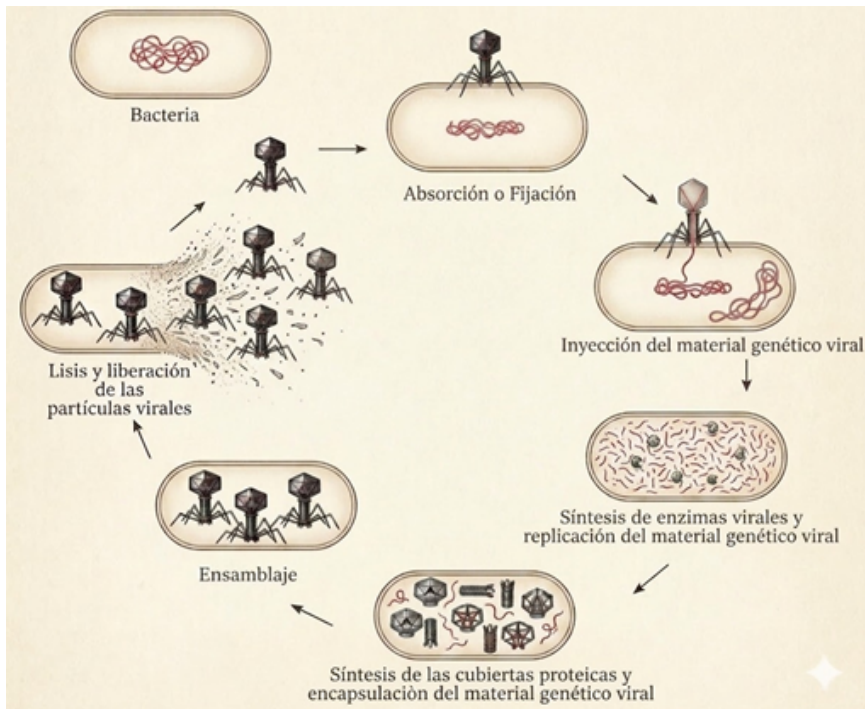
- **Los bacteriófagos presentan una gran diversidad en su forma y tamaño.**
 - **Tamaño:** Los fagos pueden medir entre 24 y 200 nm de largo. El bacteriófago T4 es uno de los más grandes, con aproximadamente 200 nm de longitud y un ancho que varía entre 80 y 100 nm. Esta variabilidad en las dimensiones es una característica notable de este grupo.
 - **Cabeza o cápside:** Muchos bacteriófagos poseen una cabeza que varía en tamaño y forma. Algunas presentan una estructura icosaédrica (20 caras), mientras que otras son alargadas y filamentosas. La cabeza está compuesta por múltiples copias de proteínas y protege el ácido nucleico que contiene en su interior.
 - **Cola:** En varios fagos, aunque no en todos, la cabeza está unida a una cola hueca a través de la cual el ácido nucleico se transfiere durante la infección. Su longitud varía, y algunos fagos carecen de esta estructura. Los fagos complejos, como el T4, tienen una cola rodeada por una cubierta contráctil y presentan una base con una o más fibras asociadas. Estas fibras ayudan a la fijación del fago a la célula bacteriana. Sin embargo, existen fagos que carecen de base o fibras, sustituyéndolas por otras estructuras que también facilitan la unión (García-Doval, 2013).
- El ciclo de replicación del fago T4, similar al de otros virus bacterianos y eucarióticos, se divide en varias etapas:
 - Adsorción.
 - Introducción del material genético viral.
 - Replicación de este material.
 - Producción de envolturas proteicas.

- Envolvimiento del ADN y ensamblaje.
- Lisis de la célula y liberación de partículas virales.

2.6.3.2 Ciclo de multiplicación del fago

- **Fagos líticos o virulentos.** Los fagos líticos o virulentos son aquellos que solo pueden replicarse en bacterias y provocan la muerte de la célula por lisis al final de su ciclo de vida.

Figura 43. Ciclo de replicación de un bacteriófago T4



Fuente: www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/Seminario.Bacteriofagos.htm

- **Fagos temperados (lisogénicos):**

Estos virus bacteriófagos poseen la capacidad de replicarse mediante dos rutas: el ciclo lítico (destrucción celular) o la lisogenia (estado latente). Durante la lisogenia, el material genético del fago se integra al genoma bacteriano en forma de profago, manteniéndose inactivo y sin expresar la mayoría

de sus genes. En esta fase, el profago no genera partículas virales, pero conserva el potencial de reactivarse y desencadenar un ciclo lítico bajo ciertas condiciones ambientales.

- **Mecanismo de integración del profago:**

En la mayoría de los casos, el material genético del fago se inserta en el genoma bacteriano, replicándose de manera sincronizada con el ADN del hospedador y distribuyéndose equitativamente durante la división celular. La bacteria portadora del profago no experimenta efectos perjudiciales, permitiendo que el estado lisogénico se mantenga de forma estable a lo largo de generaciones.

- **Persistencia del estado lisogénico:**

La coexistencia entre el profago y la célula hospedera no altera su viabilidad, pudiendo prolongarse indefinidamente bajo condiciones favorables. Este equilibrio asegura la propagación pasiva del ADN viral sin activar mecanismos líticos, a menos que factores externos induzcan la transición al ciclo destructivo.

2.6.4 Materiales

- Cepa bacteriana de *Escherichia coli*.
- Agua residual.
- Medio de cultivo: caldo doble concentrado (CDC).
- Viales.
- Agar triptosa.
- Frascos estériles.
- Filtros de porcelana.
- Asas bacteriológicas (rectas y en ángulo).
- Centrífuga refrigerada.
- Tubos para centrifugar.
- Estufa.
- Bomba de vacío.
- Matraz.
- Placas portaobjeto.
- Placas cubreobjeto.
- Papel filtro.

2.6.5 Procedimiento

En un frasco estéril, coloque 50 mL de caldo doble concentrado (CDC), enseguida siembre el microorganismo a estudiar (*Escherichia coli*) en el CDC (una colonia cuando se tenga en medio líquido o cuatro si se siembran en placa). Incube durante cuatro o cinco horas en el caso de *Escherichia coli*. Después, agregue 50 mL de agua residual (previamente filtrada a través de papel filtro) y continúe la incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas. Tras este tiempo, filtre nuevamente el contenido con papel filtro y centrifugue el filtrado a 1.500 rpm durante 10 minutos para eliminar las impurezas macro. El líquido sobrante se filtra utilizando un filtro bacteriológico de porcelana y, de manera aséptica, transfiera el filtrado a viales estériles. Luego, tape los viales y guárdelos en refrigeración (Benitez, N. 2018).

Comprobación de fagos

Tome una placa con el medio agar triptosa, se siembra la bacteria a evaluar (*Escherichia coli*), seguidamente se incuba por espacio de seis horas; pasado el tiempo, con el asa se añade un poco del filtrado en las placas; finalmente, se incuba a 37 °C durante 24 horas.

2.6.6 Observaciones y resultados

- Realice un esquema para el aislamiento de bacteriófagos.

2.7 Metabolismo Microbiano: Pruebas Bioquímicas

2.7.1 Introducción.

El género y especie de las bacterias suelen ser determinados por pruebas bioquímicas, basándose en los patrones de fermentación de azúcares y la generación de diversos subproductos metabólicos como el ácido sulfhídrico (sulfuro de hidrógeno, también conocido como ácido sulfhídrico), entre otros (Pares-Farras & Juárez-Gimenez, 1997).

El impacto en el sustrato se define por la falta o existencia de diversas enzimas que dirigen el metabolismo de los microorganismos.

Los sustratos de estas enzimas tienen la capacidad de modificar, y son incluidos en un medio de cultivo junto con un indicador que señalará la disminución del sustrato o la existencia de sustancias del metabolismo. Algunas de las reacciones bioquímicas más comunes incluyen:

- Agar Sangre = promueve el desarrollo de la mayoría de las bacterias, además sirve para observar hemólisis.
- Agar Mac - Conkey => Promueve el desarrollo de las Bacterias Gram-negativas.

Esquema de Identificación de Cocos Gram-positivos. A este grupo se les considera básicamente dos géneros:

- *Staphylococcus*.
- *Streptococcus*.

Estas bacterias desarrollan bien en agar sangre; mediante coloración de Gram se observan como esférulas violetas que presentan la formación de racimos en el caso de *Staphylococcus* y en pares o cadena en el caso de los *Streptococcus*.

2.7.2 Identificación del Género *Staphylococcus*.

Las colonias que se desarrollan en el agar sangre son grandes, elevadas, opacas.

Entre las pruebas a realizar para la identificación de los microorganismos del género *Staphylococcus* están:

- **Prueba de Catalasa.** *Staphylococcus* descomponen el peróxido de hidrógeno.
- **Prueba de Coagulasa.** Es una de las pruebas más antiguas, considerada como uno de los mejores criterios para la identificación de *Staphylococcus* patógeno.

- **Fermentación de Agar Manita Salada.** *Staphylococcus aureus* en contraste con *Staphylococcus epidermidis* realiza una fermentación de Manitol a ácido.
- El Agar manita salada constituye un medio altamente selectivo para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*.

2.7.2.1 Identificación de Microorganismos del Género *Streptococcus*.

Los microorganismos pertenecientes a este género pueden crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, son catalasa negativos, forman colonias puniformes, en el agar sangre, las cuales presentan variada actividad hemolítica.

La presencia o ausencia de hemólisis es una de las características que se utilizan para establecer una clasificación de este género.

La hemólisis producida sobre los glóbulos rojos. Pueden ser:

- **Beta =>** *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*
Algunos *Enterococcus*, *Streptococcus*
- **Alfa =>** *Enterococcus*, *Streptococcus* grupo *viridans*.
- **Gamma =>** *Enterococcus*.

Streptococcus grupo *viridans* y algunos *Streptococcus agalactiae*.

Las pruebas más utilizadas para la identificación de microorganismos del género *Streptococcus* son:

Prueba Susceptibilidad a la bacitracina. Esta prueba es útil para la identificación presuntiva de *Streptococcus pyogenes*, ya que éste es inhibido por bajas concentraciones de bacitracina de 0.02 a 0.04 unidades.

Prueba de CAMP. La prueba ha sido utilizada a través del tiempo para la identificación de *Streptococcus agalactiae*. El factor CAMP es una sustancia extracelular producida por *Streptococcus agalactiae* que intensifica la lisis de glóbulos rojos producida por *Staphylococcus aureus* Beta lisina positiva.

Prueba de la Bilis Esculina. Es una de las pruebas preliminares

para la identificación de los *Enterococcus* y tienen la capacidad de hidrolizar la esculina en presencia de la Bilis.

Prueba de la Tolerancia al NaCl 6.5%. Mediante esta prueba se diferencian fácilmente, a los *Enterococcus* de los *Streptococcus* del grupo *viridans*: los primeros resisten y pueden crecer en medios que contengan NaCl 6.5% mientras los segundos no crecen.

2.7.2.2 Esquema de identificación de Microorganismos Gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. La morfología observada mediante la coloración de Gram no es útil para separar las Enterobacterias de otros bacilos Gramnegativos.

En el agar sangre se desarrollan colonias de color gris opaco, pueden ser secas o mucoides.

- **Identificación Bioquímica de Especies.**

La clasificación de las Enterobacterias está basada principalmente en el reconocimiento de ausencia o presencia de diferentes enzimas que guían el metabolismo de la bacteria (García, A. et al., 2017).

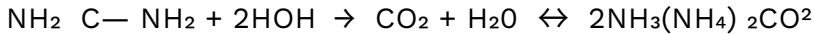
Las enzimas pueden actuar sobre los sustratos cuando son incorporados a un medio de cultivo junto con un sistema de indicación que señalará la disminución del sustrato o la existencia de productos metabólicos específicos. Entre las reacciones bioquímicas más comunes se incluyen:

- » **Simmons Citrato Agar.** Que se basa en la utilización de citrato por una bacteria como la única fuente de carbono mediante la formación de subproductos alcalinos.
- » **TSI.** Mediante el medio triple azúcar de hierro, se puede observar el uso de carbohidratos como glucosa, lactosa y sacarosa. A través de la fermentación del medio, también se puede observar la generación de gas y H₂O.
- » **Descarboxilasas.** Son un conjunto de enzimas y sustratos específicos que pueden actuar sobre la porción carboxilo de los aminoácidos, produciendo aminas que generan una reacción alcalina. En la reacción de

descarboxilación se produce como elemento secundario el dióxido de carbono. Existen descarboxilasas específicas para cada aminoácido, lisina, ornitina, y arginina, en caso de las enterobacterias produce las siguientes aminas específicas:

Lisina	cadaverina
Ornitina	putrescina
Arginina	citrulina.

- » **Urea Agar Base (Christensen Medio).** La ureasa es una enzima que tiene la capacidad de numerosas especies de microorganismos para hidrolizar la urea, generando así amoníaco, agua y CO₂.



Ureasa

El amoníaco reacciona con la solución para formar carbonato de amonio, lo que causa una alcalinización y aumenta el pH del entorno.

- **Movilidad.** El movimiento bacteriano es clave para la identificación de una especie, ya que las bacterias se desplazan gracias a los flagelos.
- **Producción de sulfuro de hidrógeno denominado ácido sulfhídrico (H₂S).** Mediante esta prueba se determina la capacidad de ciertas bacterias para liberar azufre de aminoácidos y otros compuestos que lo contienen.
- **Indol.** El indol es un producto resultante de la degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco.

- **Rojo de Metilo.** Es una prueba cuantitativa para la producción de ácidos y requiere la producción de ácidos fuertes (acético, fórmico y láctico), a partir de la glucosa por vía fermentativa.
- **Prueba de Voges Proskauer.** El ácido pirúvico, componente clave formado en la degradación fermentativa de la glucosa, es metabolizado a través de diversas vías según los sistemas enzimáticos presentes en las distintas bacterias, uno de los productos es la acetoína. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoína se convierte en diacetilo, y el alfa-naftol actúa como catalizador, revelando un color rojo.

Sistemas Comerciales de Identificación Microbiana. La introducción de sistemas comerciales de identificación microbiana a partir de la década de 1960 facilita la reacción de las pruebas bioquímicas. La disponibilidad de medios deshidratados permitió a varios laboratorios la oportunidad de preparar una gran variedad de medios de cultivo inmediatamente antes de su uso, con sólo agregar agua a una porción de polvo desecado.

El uso de medios deshidratados, permite que los resultados obtenidos en diferentes laboratorios se puedan comparar en forma significativa; además, de ser estructuras compactas que requieren poco espacio.

2.7.3 Esquema de identificación de bacterias Gram Positivas

2.7.3.1 Prueba de Catalasa.

Materiales

- Peróxido de hidrógeno 30%
- Cultivos de microorganismos a estudio en agar nutritivo.

Técnica

1. Con un asa recta, se transfiere una colonia bien aislada del microorganismo en el estudio a la superficie de un portaobjeto.
2. Se añade de 1 a 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. Se interpreta así:

Positiva: Producción de burbujas = *Staphylococcus* sp.

Negativa: Ausencia de burbujas = *Streptococcus* sp.

Los microorganismos catalasa positiva son sometidos a:

2.7.3.2 Prueba de Coagulasa.

Materiales

- Plasma de conejo con EDTA.
- Caldo BHI.
- Cultivos de Microorganismos a estudio en agar Nutritivo.

Técnica

1. Se coloca 0.5 mL de plasma de conejo en el tubo.
2. Se añade 0.5 mL del cultivo puro.
3. Se incuba a 37°C de 4 a 24 horas.

Interpretación. Transcurrido el tiempo de incubación se observa:

- Formación coágulo -> positiva -> *Staphylococcus aureus*.
- Ausencia de coágulo -> Negativa -> *Staphylococcus epidermidis*.

2.7.3.3 Fermentación Agar Manita Salada.

Materiales

- Agar Manita Salada.
- Colonia de bacterias a estudio.

Técnica

Realizamos el cultivo mediante técnica de agotamiento anteriormente descrita del microorganismo a estudio y se incuba de 18 a 24 Horas a 37°C.

Interpretación.

Luego de un tiempo de incubación se observa en la fermentación del Agar Manita Salada viraje del medio de rojo a amarillo positivo a *Staphylococcus aureus*.

Ausencia de Fermentación. No hubo viraje del medio *Staphylococcus epidermidis*.

2.7.3.4 Prueba de Tolerancia a NaCl al 6.5%

Materiales.

Se prepara un caldo que contenga los siguientes reactivos.

- Caldo infusión cerebro corazón 2.5 g
- NaCl 6.0 g
- Indicador en 100 mL de etanol al 95%.
- Glucosa 0.1 g
- Agua destilada 100 mL.

Se mezclan los reactivos, se sirven en tubos de tapa rosca y se esterilizan.

- Microorganismos provenientes de un cultivo puro.

Técnica.

- Se inocula la colonia del microorganismo en estudio al caldo anteriormente preparado.
- Se incuba de 18 a 24 horas.

Interpretación

Viraje de color → Crecimiento positivo → *Enterococcus*
del Medio amarillo

No viraje del → ausencia de → *Streptococcus*
color del medio crecimiento grupo *viridans*

2.8 Pruebas Bioquímicas para Identificación De Microorganismos de la Familia Enterobacteriaceae.

2.8.1 Introducción

Para llegar a la identificación final de la *E. coli* (bacteria Gram negativa), la cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae se utilizan las siguientes pruebas bioquímicas.

La información de los siguientes procedimientos y pruebas se toma de los autores Jurado e Insuasty (2021).

2.8.2 TSI (Triple Azúcar Hierro).

2.8.2.1 Objetivo

- Identificar los microorganismos de las bacterias de la familia *enterobacteriaceae*.

2.8.2.2 Materiales.

Inicialmente, se prepara el medio de agar TSI siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego, se distribuye en tubos de 16 x 10 mm con tapa de rosca. Posteriormente, se somete a un proceso de esterilización en autoclave a 121°C durante 15 minutos y, una vez finalizado, los tubos se inclinan.

Técnica

Se toma una colonia del microorganismo en estudio con el asa recta y se introduce en el medio, realizando una punción en el centro hasta el fondo del tubo, además de hacer estrías en la superficie. Luego, se incuba durante 24 horas y se procede a la interpretación (Jurado et al., 2021).

Lectura

- La lectura es A/A presenta fermentación la glucosa, lactosa y sacarosa.

- Verificar producción de H₂S.

2.8.3 Descarboxilasas

2.8.3.1 Materiales

Medio LIA Descarboxilasa de Mueller

Se elabora, siguiendo las directrices de la casa comercial, y se reparte en tubos de tapa roscada. Se esteriliza, se mantiene en 121°C durante 15 minutos y se desplaza.

Técnica

Con una asa recta se lleva el inóculo al medio una colonia del microorganismo, se hace doble punción y se estrías la superficie. Se incuba de 18 a 24 horas a 37°C. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoina se convierte en diacetilo, y el alfa-naftol actúa como catalizador, revelando un color rojo.

Interpretación

La reacción positiva es descarboxilación K/K.

2.8.4 Ureasa.

2.8.4.1 Materiales

Agar urea de Christensen para el cual, primero se prepara la base y se esteriliza a 121°C por 15 minutos y luego se adiciona un indicador y se coloca en tubos con tapa rosca estériles junto al mechero y se inclinan.

Técnica

Se inocula con asa recta el agar urea de Christensen estriando únicamente la superficie del medio con el microorganismo a estudio, utilizando un asa recta. Se incuba de 18 a 24 horas a 37°C.

2.8.5 Movilidad

Materiales

Medio SIM (H₂S - Indol - Motilidad)

Se elabora el medio de acuerdo con las directrices de la casa comercial. Se reparte en tubos de tapa roscada y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos.

Técnica

El medio se inocular con una asa recta y se incuba a 37°C durante 24 horas. Es necesario inocular el agar SIM mediante una picadura en el centro, hasta la mitad o un centímetro antes del fondo.

Interpretación

Se lleva a cabo un análisis macroscópico del medio, observando una región de desarrollo difuso que se extiende desde la línea de inoculación, lo que se percibe como una evidencia positiva de movilidad (Jurado et al., 2021).

2.8.6 Indol

Basado en jurado e insuasty (2021):

Materiales

- Medio SIM.
- Reactivo de Kovac's.

Técnica

El medio se inocular con una asa recta. Se deja en incubación durante 18 a 24 Horas a 37°C, tras este lapso se añaden 5 gotas de reactivo de Kovac's (Jurado et al., 2021).

Interpretación

El surgimiento de un anillo rojo señala una evaluación positiva de indol.

2.8.7 Producción de ácido sulfhídrico (H₂S)

Materiales

Medio SIM - TSI y LIA

Técnica

Se inocula, los medios mencionados anteriormente según técnicas descritas. Se incuba de 18 a 24 horas a 37°C.

Interpretación

Se entiende que el no ennegrecimiento de los medios implica una generación de H₂S negativa.

2.8.8 Utilización de Citrato

Materiales

Simmons Citrato Agar, que se elabora siguiendo las directrices de la empresa comercial, se aplica en tubos de tapa rosca. Se esteriliza a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se inclinan.

Técnica

Se toma una colonia bien aislada con asa recta y se inocula la superficie del medio y se incuba a 37°C por 24 Horas (Jurado, et al., 2021).

2.8.9 Rojo metilo

Materiales

Caldo RM / VP

Se organiza siguiendo las directrices de la casa comercial. Se reparte en tubos de tapa roscada y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos. Indicador rojo de metilo.

Técnica.

El caldo RM/VP se introduce con el microorganismo en investigación y se mantiene incubado durante 18 a 24 horas a 37°C. Tras este periodo, se añaden 4 gotas del indicador rojo de metilo (Jurado et al., 2021).

Interpretación.

Al añadir el indicador, el medio adquiere un tono rojo, lo que señala una prueba favorable para la Prueba de Rojo del Metilo.

2.8.10 Prueba Voges Proskauer

Materiales

- Caldo RM/VP
- Alfa Naftol 5%
- KOH 40%

Técnica

El Caldo RM/VP se inocula con el microorganismo a investigar y se incuba a 37°C durante 18 a 24 horas. Después de concluir el periodo de incubación, se traslada 1 mL del caldo RM/VP a un tubo estéril, se añaden 0.6 mL de alfa Naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40%, exponiéndolo al oxígeno atmosférico (Jurado et al., 2021).

Interpretación.

La prueba se considera negativa si no aparece un color rojo 15 minutos después de añadir el reactivo (Jurado et al., 2021).

2.8.11 Prueba de oxidasa.

La oxidasa es una enzima que facilita una reacción de oxidación/reducción en la que el oxígeno molecular (O₂) acepta electrones. Como consecuencia de la reacción, el oxígeno pasa a agua o como peróxido de hidrógeno.

De acuerdo con Jurado e Insuasty (2021), la prueba de la oxidasa se emplea como una característica fenotípica para la identificación de cepas bacterianas aeróbicas o facultativas aeróbicas.

Esta prueba determina si la bacteria produce citocromo oxidasa, lo que indica que utiliza oxígeno en la cadena de transporte de electrones (Tabla 2).

Para esta prueba se utilizarán tiras impregnadas con BACTIDENT OXIDASA (Dicloruro de nindimetil 1,4 fenil endiamonio 1-naftol) (Jurado et al., 2021).

Técnica

Se extrae un fragmento de la bacteria y se estiró en el borde de la cinta. Deje pasar 60 segundos (Jurado et al., 2021).

Interpretación

Prueba Positiva: Coloración púrpura en la tira.

Prueba Negativa: No hay cambio de color en la tira.

Tabla 2. Reacciones bioquímicas de algunas enterobacterias.

PRUEBA		MICROORGANISMO A EVALUAR			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Gas	+	D	-	+
	H ₂ S	-	+	+	-
	TSI	A/A	K/A	K/A	K/A
SIM	Movilidad	D	+	+	-
	Indol	+	+	-	-
	H ₂ S	-	+	+	-
MRVP	Voges-Proskauer	-	-	-	+
	Rojo de metilo	+	+	+	-
	Citrato	-	D	-	+
	Urea	-	+	-	+
	Lisina	+	-	+	+

Fuente. Laboratorio Lamer Cia Ltada (2006).

2.9 Cinética de Crecimiento Microbiano

2.9.1 Introducción

La cinética de crecimiento microbiano es una técnica muy utilizada por la ingeniería alimentaria y la biotecnología, ayuda a conocer y a entender los mecanismos de crecimiento y le permite cuantificar el proceso, por cuanto permite determinar la viabilidad bacteriana (UFC/mL), ya que se determina con precisión la fase de latencia, la fase exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte de la bacteria. Además, permite calcular otros datos muy importantes como lo son: el consumo de azúcares, producción y consumo de proteínas, tiempo de duplicación celular, velocidad específica de crecimiento, fin de la fase logarítmica, rendimiento, entre algunas variables. Por lo tanto, en esta sección se proporciona información sobre los mecanismos de reproducción bacteriana, así como su uso en la determinación de características, especificaciones y un análisis de las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

2.9.1.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento es una consecuencia del aumento en el tamaño de la célula, duplicación del núcleo, división celular, división citoplasmática, que traen como resultado dos células hijas de tamaño idéntico y conteniendo los mismos elementos estructurales y potencialidades (Ballesteros-Trujillo et al., 2018).

Algunos microorganismos como la levadura, y microorganismos similares, muestran un comportamiento denominado gemación o botón. Inicia con una pequeña protuberancia que aumenta de tamaño, para luego producir la división del núcleo y migrar hacia la protuberancia. Luego de que crece lo suficiente se separa y forma otra célula idéntica a la madre (Ballesteros-Trujillo et al., 2018).

- **Medición del crecimiento microbiano.** La medición del crecimiento celular en suspensión se lleva a cabo con recuento celular, masa celular o actividad celular. Se encuentran dos métodos, el indirecto y el directo (Ballesteros-Trujillo et al., 2018).

- **Métodos directos.**

- » Recuento de células en una cámara.
- » Peso seco celular.
- » Determinación DNA, proteínas totales o nitrógeno.
- » Recuento de células en cámara.

- **Métodos indirectos.**

- » Turbidez.
- » Recuento en placa.
- » Consumo de oxígeno.
- » Recuento en filtro de membrana.
- » Liberación dióxido de carbono.
- » Precursores radiactivos.

- **Absorción.** Si un rayo de luz colimado incide sobre una partícula suspendida, una parte del haz se refleja, otra se dispersa, una fracción es absorbida y el resto se transmite. La nefelometría es un procedimiento que mide la dispersión de la luz en una solución de partículas (Ballesteros-Trujillo et al., 2018).

Las técnicas basadas en la dispersión de la luz son las más empleadas para el monitoreo del crecimiento de cultivos bacterianos. Aunque resultan herramientas valiosas y eficaces, pueden generar resultados incorrectos. Su principal utilidad radica en proporcionar información relacionada con el peso seco, es decir, el contenido macromolecular.

- » **Turbidimetría.** Evalúa la reducción en la transmisión de luz causada por las partículas presentes en una suspensión y cuantifica la cantidad de luz que logra atravesarla.

- **Recuento microscópico.** Se caracteriza por ser una técnica común, rápida y económica que usa equipamiento de fácil disponibilidad en los laboratorios de microbiología. Los recuentos se efectúan en cámaras de recuento, aunque en ciertos casos se emplean muestras fil-

tradas a través de membranas o teñidas con colorantes fluorescentes, como el Naranja de acridina.

El recuento en cámara presenta problemas de reproducibilidad y dificultades debido a la adsorción de células en superficies de vidrio, lo que puede generar errores en las mediciones. La dilución de la muestra es un factor crítico, ya que afecta los resultados, aunque puede minimizarse utilizando medios con alta fuerza iónica, como solución fisiológica o un medio sin fuentes de carbono. Lo más empleado para este proceso son las cámaras de Hawkley y Petroff-Hausser. Además de permitir el conteo microbiano, esta técnica proporciona información sobre el tamaño y la morfología de las partículas analizadas (Ballesteros-Trujillo et al., 2018).

2.9.2 Objetivos

- Determinar la cinética de crecimiento de *Escherichia coli*, *Lactiplantibacillus plantarum* en caldo tripticasa de soya TSB y en caldo MRS respectivamente.
- Representar la curva de crecimiento del microorganismo con la técnica de turbidimetría.
- Se determinará la ecuación de la fase exponencial, la duración de duplicación celular y su coeficiente de correlación.

2.9.3 Métodos

Cada grupo debe tener el siguiente material:

- Erlenmeyer de 100 mL con 45 mL de caldo TSB y/o caldo MRS a una temperatura de 36°C.
- Tubo de ensayo con 5 mL de caldo TSB y/o caldo MRS inoculado con *E. coli* y *Lactiplantibacillus plantarum* respectivamente (mantenido a 36°C), ajustado por la escala de Mac Farland.
- 8 tubos tapa rosca, estériles.
- Micropipeta estéril de 1 mL.

- Pipeteadores automáticos.

Para uso de todos los grupos se debe tener:

- Microscopio.
- Espectrofotómetro.
- 50 mL de TSB y/o caldo MRS estéril para realizar los tubos blancos.

2.9.4 Procedimiento

Recuento por turbidimetría

- a. Primero, se ubica el filtro UV del equipo a 550 nm y se coloca en cero con el tubo blanco (caldo TSB estéril y/o caldo MRS).
- b. Se toman los tubos tapa rosca y se marcan con los números del 1 al 8.
- c. Se toma el tubo con 5 mL de medio y se agregan al Erlenmeyer con 45 mL de TSB y/o caldo MRS. Se registra la hora ($t=0$), enseguida se pipetea 6 mL en el tubo 1 y se mide la absorbancia (No) en el espectrofotómetro.
- d. Del preparado anterior, tomar 6 mL y pipetear en los tubos restantes y se los lleva a incubación a 36°C.
- e. Se determina la densidad óptica (DO) del caldo presente en cada tubo de tapa rosca. Se debe tener cuidado con la cubeta del espectrofotómetro, dado que huellas dactilares en la zona de lectura puede generar problemas de lectura.
- f. Las mediciones se realizarán al tiempo cero (inicio de la fermentación o crecimiento, fase de latencia), a la hora, a las 4 horas, a las 8 horas, a las 12 horas, a las 16 horas, a las 20 horas y a las 24 horas.

2.9.5 Interpretación

Con los datos, realice la curva de crecimiento para las dos (2) bacterias, teniendo en cuenta como eje de las equis (x) el tiempo

y como eje de las yes (y) el conteo bacteriano.

Determinar el valor del tiempo de duplicación (g), velocidad específica de crecimiento microbiano, fase exponencial, fase de latencia, la fase estacionaria, la fase de muerte de la bacteria, el consumo de azúcares, producción y consumo de proteínas, tiempo de duplicación celular, velocidad específica de crecimiento, fin de la fase logarítmica, rendimiento y la ecuación de la recta en fase exponencial.

2.10 Evaluación de Desinfectantes Usados en la Industria Láctea y Cárnica: Hipoclorito de Sodio

2.10.1 Introducción

Las actividades de limpieza y desinfección en plantas y equipos de la industria láctea se rigen por la NTC 5245 (2004), ratificada por el Consejo Directivo el 25 de febrero de 2004. Esta norma tiene una correspondencia modificada (MOD) respecto al *British Standard Code of Practice for Cleaning and Disinfecting of Plant and Equipment Used in the Dairying Industry, BS 5305:1984*, enfocado en limpieza, desinfección e industria láctea.

Siempre que sea posible, los equipos deben estar diseñados para facilitar su limpieza y desinfección, y se deben tomar todas las precauciones necesarias para mantenerlos en óptimas condiciones. Contar con superficies limpias es fundamental para garantizar la seguridad y calidad de los productos (NTC 5245, 2004).

Necesidad de tener superficies limpias

Los equipos después de su utilización se encuentran contaminados con microorganismos y las condiciones del ambiente pueden acelerar su crecimiento. Ante esta afirmación, Torres-Arroyo et al., (2021), mencionan que cuando existe un inadecuado proceso de limpieza de los equipos y herramientas, y luego se somete a un proceso de desinfección, se puede presentar lo siguiente:

- a.** Los microorganismos presentes en los residuos de suciedad pueden quedar protegidos tanto del contacto con desinfectantes químicos como, en cierta medida, de la acción del calor (NTC 5245, 2004).
- b.** La eficacia de una solución desinfectante química puede disminuir si existe una acumulación excesiva de suciedad.
- c.** La aplicación de calor para desinfección puede endurecer los residuos, haciendo que sean más difíciles de eliminar en futuros procesos de limpieza.
- d.** Los microorganismos que sobrevivan al calor o a los desinfectantes químicos pueden proliferar en residuos húmedos (NTC 5245, 2004). Si el equipo permanece sin uso durante un tiempo prolongado, existe el riesgo de una contaminación significativa.

La acumulación de suciedad por inadecuada limpieza puede incrementar los problemas cuando se vuelve común. Por lo anterior, una eficiente limpieza permite una adecuada desinfección de los equipos, instalaciones y herramientas (Wildbrett, 2000).

En la NTC 5245 (2004), se menciona que en la industria de productos lácteos, los agentes desinfectantes pueden emplearse solos o en combinación con detergentes, formando soluciones detergente-desinfectante. Es fundamental que ambos tipos estén aprobados si se utilizan para desinfectar equipos destinados a la manipulación de leche y crema. Sin embargo, esta restricción no aplica a equipos utilizados en la elaboración de productos lácteos y helados de crema, aunque generalmente se prefieren agentes químicos aprobados (NTC 5245, 2004).

El hidróxido de sodio y el formaldehído (o formalina) pueden ser empleados para usos específicos. La eficacia de los desinfectantes aprobados depende de factores como la concentración, tiempo de contacto, temperatura, presencia de materia orgánica, pH, dureza del agua, combinación con detergentes y tipos de microorganismos (NTC 5245, 2004).

Los desinfectantes químicos tienen una capacidad de penetración limitada, lo que permite que microorganismos presentes en depósitos de piedra de leche o grietas sobrevivan al tratamiento.

Incluso residuos menos resistentes, como restos de leche seca, pueden dificultar el contacto inmediato de los agentes químicos con los microorganismos. Sin embargo, el uso de desinfectantes junto con detergentes compatibles permite realizar la limpieza y desinfección en una sola etapa (Wildbrett, 2000).

Los desinfectantes químicos no son efectivos contra las esporas bacterianas y no deberían confiarse en que erradiquen las esporas de mohos (NTC 5245, 2004).

Cloro

De acuerdo con NTC 5245 (2004), las soluciones de hipoclorito de sodio y los fosfatos trisódicos clorados pueden utilizarse como desinfectantes por separado; además, el hipoclorito puede mezclarse con detergentes apropiados para crear soluciones de doble función. Los agentes químicos orgánicos que liberan cloro, como el diclorodimetilhidantoína y el dicloroisocianurato de sodio, suelen formularse junto con detergentes y se venden en forma de polvo.

Una solución de hipoclorito de sodio aprobada debe contener entre el 8 % y el 12 % de cloro disponible durante su vida útil en estantería. En términos prácticos, se puede considerar que tiene un 10 % de cloro disponible, lo que significa que diluir una parte de hipoclorito aprobado en 1000 partes de agua genera una solución con aproximadamente 100 mg/L de cloro disponible (NTC 5245, 2004).

El cloro disponible del hipoclorito y otros productos similares reacciona rápidamente con la materia orgánica, como los residuos lácteos, y se inactiva por esta acción. Sin embargo, bajo condiciones de uso normales, el volumen y la concentración de la solución son tales que la cantidad de suciedad en el equipo no afecta significativamente su capacidad desinfectante. Sin embargo, el almacenamiento de soluciones usadas puede dar como resultado una reducción notoria en su potencia, excepto con productos recomendados especialmente para uso repetido, sólo se deberían usar soluciones recién preparadas (Gallandat et al., 2021).

Actualmente se utilizan los antisépticos y desinfectantes de

manera rutinaria en medios de salud pública, sanidad, en medios hospitalarios y domésticos.

De esta manera, un desinfectante ideal se caracteriza por ser un germicida potente; dependiendo de su uso, debe ser de acción rápida o lenta y tener un espectro antimicrobiano por lo general amplio. Se entiende siempre que el desinfectante debe ser bactericida sobre todas las formas vegetativas y esporas de bacterias, hongos principalmente.

Con respecto a su modo de acción, los desinfectantes actúan como “envenenadores del protoplasma”, que implica la destrucción de muchos de los constituyentes del protoplasma en los microorganismos. Así, éstos presentan muchas dificultades para adaptarse a estas situaciones o presentar mutaciones que las hagan resistentes (Jones et al., 2023).

2.10.2 Objetivos

- Evaluar la acción desinfectante del hipoclorito de sodio usado en la planta piloto de lácteos o cárnicos o en un laboratorio en diferentes concentraciones sobre microorganismos patógenos.
- Determinar cuál es la relación existente entre la concentración del hipoclorito de sodio y el tiempo en el control de microorganismos patógenos.

2.10.3 Materiales por grupo

Esta sección se basa en los autores Jurado e Insuasty, (2021).

- 1 tubo de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo.
- 1 tubo de ensayo con 10 ml de hipoclorito de sodio al 9%.
- 1 tubo de ensayo con 10 ml de hipoclorito de sodio al 6%.
- 1 tubo de ensayo con 10 ml de hipoclorito de sodio al 3%.
- 1 tubo de ensayo con 10 ml de hipoclorito de sodio al 1.5%.
- 10 tubos de ensayo con 10 ml de caldo nutritivo cada uno.
- 15 cajas de Petri vacías estériles.

- 10 pipetas estériles de 1 ml.
- 300 ml de *Plate Count Agar* fundido a 45°C.
- Incubadora.
- 1 tubo con 10 ml de caldo nutritivo inoculado con bacterias patógenas (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella typhi*.)

2.10.4 Procedimiento

- a. Se preparan varias soluciones de hipoclorito de sodio con concentraciones del 9%, 6%, 3% y 1.5%. Luego, se toman cuatro tubos de ensayo con caldo nutritivo, y a cada uno se le agrega 1 ml de una de las soluciones preparadas. Por ejemplo, a un tubo con caldo nutritivo se le añade 1 ml de hipoclorito al 9% y se agita. Después, se incorpora 1 ml de cultivo bacteriano patógeno disponible, y se agita nuevamente. Este proceso debe realizarse en duplicado.
- b. **Nota importante:** Se debe utilizar el mismo cultivo bacteriano para todas las concentraciones de hipoclorito de sodio.
- c. En el tubo testigo (sin hipoclorito de sodio), se añade 1 ml de caldo nutritivo y 1 ml del cultivo de bacterias patógenas disponible, y se agita igualmente. Este paso también debe hacerse por duplicado.
- d. Después de tres minutos, se toma 1 ml del contenido de cada tubo inoculado (caldo nutritivo + hipoclorito de sodio + cultivo bacteriano) con una pipeta estéril y se coloca en una caja de Petri estéril, usando la técnica de siembra en profundidad con *Plate Count Agar* a 45°C. Se repite este proceso también para el testigo.
- e. Repita el procedimiento anterior a los 5 y 20 minutos.
- f. Incube a 37°C durante 24-48 horas. Luego, cuente las colonias que han crecido en el medio de cultivo, teniendo en cuenta la concentración de hipoclorito y el tiempo de incubación.
- g. Finalmente, compare los resultados de los tubos con diferentes concentraciones de hipoclorito con el tubo testigo (sin hipoclorito de sodio).

2.11 Antibiograma por el Método de Kirby-Bauer

2.11.1 Introducción.

Un antibiótico se define como una sustancia química producida por un microorganismo que tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos. Los antibióticos que han sido modificados químicamente siguen siendo considerados antibióticos. Un agente antimicrobiano es efectivo contra microorganismos y puede ser producido de manera natural por microorganismos o sintetizado en un laboratorio. El término "agente quimioterápico" se utiliza para describir tanto agentes antimicrobianos sintéticos como naturales, y también se refiere a sustancias que actúan sobre células humanas, como los inmunomoduladores y los medicamentos antitumorales. Los términos "agente antiviral" y "agente antimicótico" son más específicos y están incluidos dentro del término general de agentes antimicrobianos (Yang et al., 2019).

El antibiograma es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la sensibilidad de una colonia bacteriana a un antibiótico o grupo de antibióticos (Yang et al., 2019).

El antibiograma, luego de realizado, proporciona la siguiente información:

- El grado de sensibilidad de la colonia bacteriana a un antibiótico específico.
- La variación en la sensibilidad de la colonia a diferentes antibióticos.

Con base en estos datos, el efecto del antibiótico sobre la colonia se clasifica como: Resistente (R), Intermedio (I) o Sensible (S).

2.11.2 Objetivos

- Analizar a través de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos la susceptibilidad de una cepa bacteriana que se cree es la causante de una infección.

2.11.3 Materiales por grupo

- 1 tubo con 20 mL de caldo nutritivo inoculado con bacterias patógenas (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp.)
- Sensidiscos de diferentes antibióticos
- Agar Müeller-Hinton.
- Pinzas estériles.
- Cultivos de bacterias ajustadas a una misma concentración mediante la escala de Macfarland.

2.11.4 Procedimiento

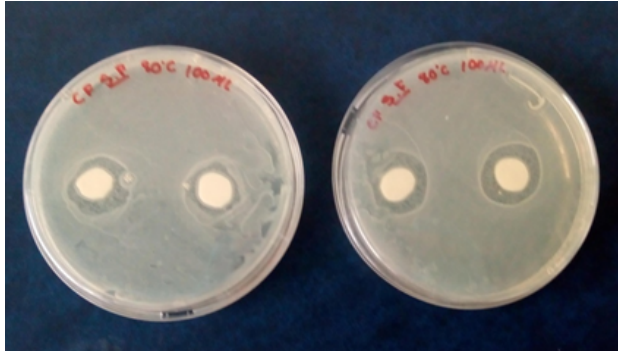
Existen diversos métodos que pueden utilizarse para evaluar "*in vitro*" la susceptibilidad de las bacterias a distintos antimicrobianos. En numerosos laboratorios de microbiología clínica, la prueba de difusión en agar se emplea de manera rutinaria para bacterias de crecimiento rápido y algunas bacterias patógenas difíciles de cultivar (Calpa-Yama et al., 2014).

- Los microorganismos que se van a trabajar deben ser previamente identificados como Gram positivos o Gram negativos y en cultivo puro, libre de contaminaciones, y con una rotulación según de muestra.
- El Agar Müeller Hinton debe ser preparado como mínimo con un día de antelación para un mejor secado de las placas.
- Se seleccionan entre 3 y 5 colonias bien separadas y de morfología uniforme con cultivos de agar. Con un asa, se toma una colonia de la parte superior y se transfiere al interior de un tubo que contiene de cuatro a cinco mililitros de un medio de cultivo adecuado, como el caldo Müeller-Hinton (Calpa-Yama et al., 2014).
- La bacteria en el cultivo se incuba a 36°C hasta que llegue a la turbidez correspondiente al estándar de 0.5 McFarland (generalmente entre dos y seis horas), lo que resulta en una suspensión con aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UCF/mL.

- La turbidez del caldo se ajusta utilizando solución salina estéril o caldo adicional para lograr una turbidez visualmente comparable con el estándar de 0,5 McFarland.
- Dentro de un tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez del inóculo, se sumerge un aplicador de algodón en la suspensión. El aplicador se rota varias veces y se presiona firmemente contra la pared interna del tubo para eliminar el exceso de inóculo (Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI], 2024).
- Luego, el inóculo se rastrilla por el agar Muller-Hinton llevando éste por toda la superficie. El proceso se repite 2 o más veces, rotando la placa unos 60°C después de cada aplicación para asegurar que el inóculo se distribuya de manera uniforme. Finalmente, se pasa sobre los bordes del agar (Espinoza, Y. 2010).
- Las placas pueden mantenerse ligeramente abiertas durante tres a cinco minutos, pero no más de quince, para permitir que el exceso de humedad en la superficie se evapore antes de colocar el disco impregnado con la droga (CLSI, 2024).
- Es importante evitar una alta densidad de inóculo. No se deben usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir o inóculos no estandarizados.
- Los discos deben colocarse sobre la superficie del agar, presionándolos ligeramente para garantizar un buen contacto con el medio. Los discos deben ser distribuidos uniformemente y no colocarse a menos de 24 mm de distancia entre sus centros. No deben colocarse más de 12 discos en placas de 150 mm o más de 5 discos en placas de 100 mm. Dado que algunos fármacos se difunden rápidamente, el disco no debe moverse una vez que ha tocado la superficie del agar (Calpa-Yama et al., 2014).
- Las placas se colocan invertidas y se incuban a 36°C durante 15 minutos después de aplicar los discos. Es importante no incubarlas en un ambiente con CO₂, ya que la interpretación se realiza en aire ambiente, y el CO₂ podría alterar considerablemente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes (CLSI, 2024).

- Los discos empleados en este procedimiento deben seleccionarse en función del tipo de bacteria contra la que se está midiendo la sensibilidad, es decir, si son bacterias Gram negativas o Gram positivas, el lugar de la infección y su origen. También se elegirán los antibióticos representativos de cada grupo de antimicrobianos utilizados en la práctica clínica (CLSI, 2024).
- Tras 16 a 18 horas de incubación, se examina cada placa. Las zonas de inhibición deben ser circulares y homogéneas en una capa uniforme de crecimiento. Si se observan colonias individuales, esto indica que el inóculo estaba demasiado diluido, por lo que la prueba debe repetirse (CLSI, 2024). Se mide el diámetro de la zona de inhibición en mm, pasando por el centro del disco. La placa se coloca a unos pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada (CLSI, 2024).
- El margen de las zonas debe definirse como el área sin crecimiento visible. Si se detecta un crecimiento débil de pequeñas colonias en el borde de la zona de inhibición con una lupa, se debe ignorar. Sin embargo, si se observan colonias dentro de la zona clara de inhibición, éstas deben identificarse y someterse a nuevas pruebas. En el caso de *Proteus sp.*, cualquier capa fina de población en la zona de inhibición debe ser descartada. Para trimetoprim y las sulfonamidas, si se presentan zonas de crecimiento leve, éstas no se toman en cuenta, y se miden los márgenes más claros de la zona para determinar su diámetro. Cuando se usa medio suplementado con sangre para probar *Streptococcus sp.*, se debe tener cuidado de medir la zona de inhibición y no la zona de hemólisis (Calpa-Yama et al., 2014).
- Las dimensiones de las zonas de inhibición se interpretan utilizando las tablas del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), que indican si los microorganismos son susceptibles, intermedios o resistentes a los antimicrobianos evaluados. Estas tablas se actualizan regularmente (ver figura 44).

Figura 44. Anribiograma por la técnica de Kirby Bauer.



2.11.5 Interpretación

Esta sección se realiza de acuerdo a la información del autor Pinheiro, J. (2011).

- **Sensible:** La categoría "sensible" significa que una infección causada por una cepa puede ser tratada de manera efectiva con la dosis recomendada de un agente antimicrobiano específico para ese tipo de infección y especie (ver tabla 3).
- **Intermedio:** La categoría "intermedio" incluye aislamientos de microorganismos que tienen una concentración mínima inhibitoria (CMI) cercana a los niveles que se alcanzan en los tejidos y en la sangre. En estos casos, la respuesta al tratamiento puede ser más lenta en comparación con los aislamientos susceptibles. Este grupo puede ser eficaz en áreas del cuerpo donde el medicamento se concentra fisiológicamente, como en el caso de las quinolonas y los β -lactámicos en la orina, o cuando se pueden usar dosis más altas de un medicamento, como en el caso de los β -lactámicos.
- **Resistente:** Las cepas resistentes no son afectadas por las concentraciones normales de un agente antimicrobiano que se alcanzan con las dosis usuales. Estas cepas pueden tener una CMI dentro de un rango en el que existen mecanismos específicos de resistencia (por ejemplo, para los β -lactámicos) y la eficacia clínica del tratamiento ha sido inconsistente en los estudios realizados.

Lectura

- Con una regla de doble decímetro, se medirá el diámetro de los halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos. Estos deben ser medidos desde el fondo de la placa y los resultados se anotarán para ser comparados con las tablas correspondientes. Se clasificará como sensible, resistente o intermedio. El borde de la zona de inhibición se puede ver a simple vista y generalmente está claramente delimitado. Sin embargo, existen tres excepciones:
 - En el caso de las sulfamidas y el clotrimoxazol, pueden aparecer pequeñas colonias dentro de la zona de inhibición, pero éstas no deben ser consideradas.
 - Cuando se analiza la sensibilidad a la penicilina en *Staphylococcus* productores de penicilinas, puede observarse un borde con dilatación significativa en la zona de inhibición. Este borde es fácil de identificar al compararlo con las cepas testigo, y cualquier tamaño debe indicarse como resistencia.
 - Algunas cepas de *Proteus* pueden dispersarse dentro de las zonas de inhibición, lo que no debe ser tenido en cuenta.

Tabla 3. Interpretación de la sensibilidad de las bacterias

ANTIMICROBIANOS	HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
	S	I	R
Ácido Oxolínico (Oxolinato de Sodio)	>>16	15-14	<<13
Amoxicilina	>20	19-17	<16
Ampicilina + Colisina	>11	10-sept	<8
Josamicina	>16	15-14	<13
Josamicina + Colicina	>12	11-oct	<9
Josamicina + Trimetoprim	>16	15-nov	<10
Oxitetraciclina + Colistina	>12	11-oct	<9
Penicilina	>13	12-nov	<10

VIRBAC do Brasil, Industria e Comercio Ltda. (1998).

2.12 Cultivo y Coloración de Hongos (Lactofenol)

2.12.1 Introducción.

Los hongos forman un grupo de organismos con características distintivas, lo que les permite ser clasificados en un reino independiente, denominado REINO FUNGÍ. Este reino está compuesto por cuatro phylum: *Chytridiomycetes*, *Zygomycetes*, *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*. Las células fúngicas son eucariotas, están compuestas por una pared celular que varía en composición química de acuerdo al grupo taxonómico; algunos de los constituyentes son: celulosa, glucano y quitina (Racioppo & Guerrieri, 2025).

Por otra parte, Benitez-Campo y Bolaños (2018), indican que las levaduras son hongos simples, mientras que los más complejos forman estructuras filamentosas multinucleadas conocidas como hongos filamentosos. Estos filamentos, llamados hifas, son la unidad básica de su cuerpo vegetativo y crecen solo en su extremo, ramificándose periódicamente para formar una red denominada micelio. Los hongos tienen diferentes formas de nutrición: parásitos, simbióticos o heterótrofos. Necesitan materiales orgánicos preformados, los cuales utilizan como fuente de energía y para la síntesis celular.

Algunas características morfológicas, como el color y el patrón de crecimiento, dependen del medio de cultivo empleado. Las observaciones generalmente se realizan en medios como Agar Papa Dextrosa o Agar Sabouraud. A nivel microscópico, los hongos se pueden identificar por su organización celular y las estructuras presentes. Macroscópicamente, un hongo puede ser caracterizado según la forma y color de las superficies de la colonia, así como la altura del micelio, que puede ser algodonosa o aérea, granular o polvosa, afelpada o glabra.

- **Textura algodonosa:** Se distingue por un micelio aéreo denso y alto, con un aspecto similar al algodón (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

- **Textura granular y/o polvosa:** Se caracteriza por la facilidad con que se desmenuza y por la abundante producción de conidias. Aunque estos términos se usan a menudo de forma intercambiable, la textura granular es más rugosa, parecida al azúcar granulada, mientras que la textura polvosa tiene un aspecto similar a la harina o el polvo (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).
- **Textura afelpada:** Se presenta con un micelio aéreo bajo, dando la apariencia de felpa o terciopelo (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).
- **Textura glabra o cerosa:** No forma micelio aéreo, por lo tanto, su superficie es lisa. Este tipo de textura es comúnmente observada en colonias de levaduras (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

La topografía se refiere a las irregularidades en la superficie de la colonia, que usualmente se observan desde el anverso de la caja, ya que el micelio generalmente cubre esta característica. Se describe como verrugosa, cerebriforme, rugosa o lisa.

- **Topografía rugosa:** Tiene pliegues irregulares que irradian desde el centro de la colonia (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).
- **Topografía verrugosa o cerebriforme:** Posee una superficie delgada que se asemeja a la forma de un cerebro.
- **Topografía lisa:** Carece de irregularidades en su superficie.

El examen microscópico es clave para la identificación precisa del hongo. Al observar, es importante considerar el tipo de hifa (septada, aseptada, hialina o pigmentada) y la forma de las estructuras reproductivas en sus estados anamórfico o telemórfico. En la fase anamórfica se observan estructuras como el conidióforo y las conidias, evaluando su tipo, color, tamaño y forma. En la fase telemórfica, se analizan las esporas, las cuales se caracterizan por su forma, tamaño, color y ornamentación, elementos que ayudan a definir el género y/o la especie del hongo (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

2.12.2 Objetivos

- Identificar las diversas estructuras o cuerpos reproductivos de ciertos hongos.
- Familiarizarse con el protocolo estándar para la observación e identificación de hongos.
- Aislar, sembrar y examinar los hongos presentes en diferentes muestras.
- Realizar la tinción con lactofenol para identificar las estructuras de los hongos.

2.12.3 Materiales

- Asas curvas y rectas.
- Cajas de petri con medios de cultivo específico para el crecimiento de hongos (Agar Saboraud).
- Cultivos de hongos diversos.
- Muestras de materiales afectados por hongos.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Azul de lactofenol.
- Frasco para descartar porta y cubreobjetos.
- Mechero.
- Objetos y materiales tomados de la guía de laboratorio de microbiología de los autores Benítez-Campo y Bolaños (2018).

2.12.4 Metodología

Descripción e identificación de las características macroscópicas de los hongos:

Examine las diferentes cajas de cultivo y registre la textura, la topografía y el color observados en el anverso y reverso de cada colonia. Anote estas características en el cuadro proporcionado.

2.12.4.1 Preparación del microcultivo:

Tomado de la OMS (2005):

- 1.** Preparación de reactivos y medios de cultivo: a. Solución glicerinada al 5% (5 mL de glicerina en 100 mL de agua). b. Agar Sabouraud: Prepare el medio según las instrucciones del reactivo.
- 2.** Prepare 6 cajas Petri (por equipo) de la siguiente manera: Coloque una varilla de vidrio en forma de “U” dentro de cada caja, encima de la cual coloque un portaobjetos y dos cubreobjetos, luego cierre la caja.
- 3.** Esterilice las cajas Petri preparadas en una autoclave.
- 4.** Esterilice el medio de cultivo, agua glicerinada, bisturí, pinzas envueltas en papel, cajas Petri y pipetas en la autoclave a 15 lb/plg², durante 15 minutos.
- 5.** Bajo condiciones asépticas, vacíe el agar en dos cajas Petri (por equipo), aproximadamente 20 mL por caja.

2.12.5 Procedimiento para Microcultivo de Hongos.

Recopilado de la OMS (2005).

- 1.** En condiciones estériles, use un bisturí para cortar pequeños trozos de agar de aproximadamente 1 cm x 1 cm.
- 2.** Con las pinzas de disección, coloque un trozo de agar en cada caja Petri sobre el portaobjetos.
- 3.** Inocule los hongos por picadura en los cuatro lados del cuadro de agar (usando la muestra y aquellas proporcionadas por el profesor), utilizando un asa estéril. Coloque un cubreobjetos sobre el agar con la ayuda de las pinzas estériles.
- 4.** Añada agua glicerinada estéril en cada caja Petri hasta cubrir dos tercios de la varilla de vidrio. Luego, cierre las cajas.
- 5.** Incube las cajas a 30°C a temperatura ambiente durante 3 a 7 días, asegurándose de que las cajas mantengan un nivel adecuado de agua glicerinada.

Cultivo de hongos

De acuerdo con García, M. (2015), el Agar Sabouraud es un medio comúnmente utilizado para aislar hongos de animales. Se usa para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubos inclinados. Debido a su composición, favorece el crecimiento exuberante de los hongos y su esporulación. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, aunque no es el más adecuado para estudiar su esporulación (Hageskal et al., 2009).

Según Cañedo & Ames (2004), el objetivo de la siembra es aislar o replicar los hongos para su uso inmediato o para mantenerlos viables a corto plazo. El aislamiento en cultivo puro implica permitir que el hongo seleccionado crezca bajo condiciones que favorezcan su desarrollo y esporulación (ver figura 45).

Figura 45. Cultivo de Penicillium sp. en agar Saboraud.



Si es necesario, se acidifica el medio y se coloca una pequeña cantidad del hongo que se va a sembrar. Ésto se hace con una aguja o un asa, ya sea mediante un toque sencillo o un rayado continuo. Para la siembra, generalmente se utilizan placas, tubos y frascos. Después de sembrar, se sellan las placas, tubos y frascos, se registra la fecha y se incuban durante el tiempo necesario hasta que el hongo haya crecido y esté esporulando (Hageskal et al., 2009).

En el caso de las levaduras, se inoculan mediante estrías cruzadas sobre la superficie de las cajas de Petri con agar Sabouraud, de forma similar a como se inoculan las bacterias.

Montaje de colonias de hongos con la técnica de la cinta adhesiva.

- a.** Coloque una gota de azul de lactofenol en el centro del portaobjetos.
- b.** Tome aproximadamente 8 cm de cinta adhesiva transparente entre los dedos pulgar e índice, con el adhesivo hacia fuera.
- c.** Presione suavemente el lado adhesivo de la cinta sobre la superficie de una caja con crecimiento micelial.
- d.** Coloque la cinta con el lado adhesivo hacia abajo y pegada sobre el portaobjeto con el colorante.
- e.** Observe el microscopio con los objetivos 10X y 40X.
- f.** Realizar este procedimiento para cada uno de los hongos entregados para la práctica.
- g.** Esquematice.

Montaje directo de micelio

- Ponga una gota de azul de algodón con lactofenol en el extremo de un portaobjetos. Con un asa de punta recta estéril, tome una pequeña porción de micelio de la zona más externa y colóquela sobre la gota de azul de lactofenol. Luego, coloque el cubreobjetos y observe al microscopio (ver figura 46 y 47, tabla 4).

Figura 46. Microcultivo de hongos en agar Saboraud.

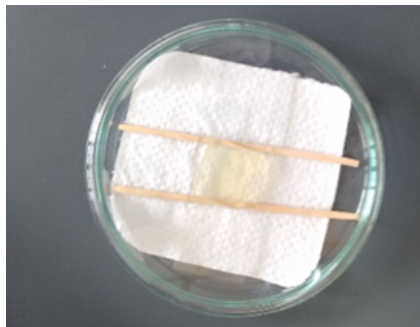
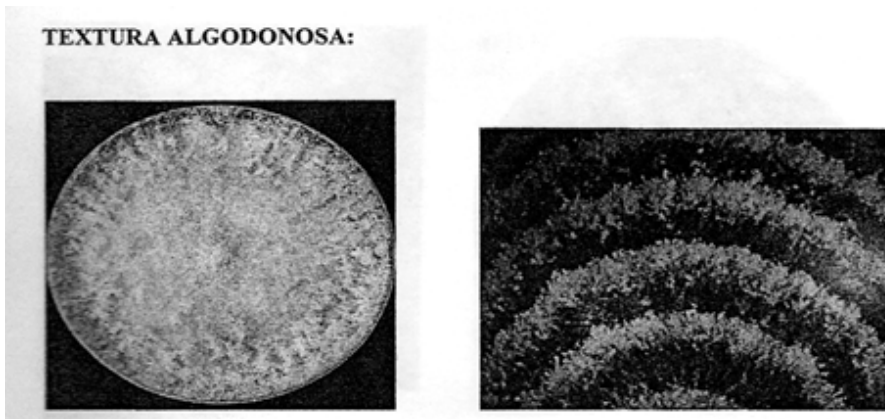


Tabla 4. Interpretación de la sensibilidad de las Bacterias

Aspecto macroscópico	Aspecto microscópico	Esquema
Textura:	Tipo de hifa:	
Topografía:	Tipo de conidia:	
Color:	Otros:	

Figura 47. Textura algodonosa



Fuente: Bernal et al. (2008)

Los alimentos se caracterizan por poseer un alto contenido de agua y una elevada actividad acuosa, condiciones que facilitan la colonización por diversos microorganismos que pueden alterar rápidamente sus propiedades nutricionales y sensoriales. En el contexto de la zootecnia, es imperativo comprender que la calidad de los productos de origen animal y sus derivados depende directamente de su carga microbiológica.

El control microbiológico riguroso es la herramienta fundamental para garantizar la inocuidad alimentaria, permitiendo identificar agentes patógenos que representan un riesgo para la salud pública y animal. A través de las metodologías descritas en este capítulo, se busca que el estudiante y el profesional puedan evaluar de manera precisa la presencia de bacterias, hongos y otros contaminantes en matrices alimentarias complejas

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 2.

PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL

Los conceptos de asepsia, desinfección, la esterilidad y de las prácticas de saneamiento ambiental que se realizan en el Laboratorio de Microbiología Zootécnica, tanto en la preparación de medios de cultivo, esterilización de materiales y equipos y en general, el cuidado en las diferentes técnicas de siembra de microorganismos, han permitido tener un conocimiento adecuado del control de los microorganismos, siendo la esterilidad necesaria y permitiendo el control de cepas de microorganismos resistentes.

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA**

CAPÍTULO 3.

**Microbiología de alimentos
de origen zootécnico**



3.1 Análisis Microbiológico General

Los alimentos se caracterizan por tener un alto contenido de agua, con una elevada actividad de la misma, por lo que los microorganismos tienden a colonizar fácilmente este producto y alterar de forma rápida su contenido (Weber & Schieber, 2023).

Objetivos

- Determinar la calidad microbiológica de los productos alimenticios de origen animal y sus derivados.

Las siguientes pruebas y procedimientos de esta sección se realizan en base a la información tomada de los autores Carrillo y Audisio (2007).

3.1.1 Identificación de bacterias Gram-positivas.

Las bacterias Gram-positivas se clasifican por el color que adquieren después de aplicarles un proceso químico denominado tinción de Gram. Las bacterias Gram-positivas retienen la tinción azul-violeta, mientras que las bacterias Gram-negativas se decoloran y se tiñen de rojo. Este fenómeno se observa como consecuencia de diferencias en la pared celular de la bacteria que permite la retención de la tinción en su interior (Choi et al., 2024).

Materiales y equipos

- Asa de siembra.
- Cultivo bacteriano.
- Placa de Petri con agar chocolate.
- Microscopio.
- Papel secante.
- Alcohol 96°.
- Agua destilada.
- Colorantes de Gram (Cristal violeta, lugol, alcohol-acetona 1:1, safranina).
- Cristalizador y varillas de tinción.
- Portaobjetos.

Procedimiento

Como recomendación, la cepa bacteriana debe ser preparada 24 horas antes con el fin de tener una colonia nueva para su identificación. De igual manera, el ambiente de trabajo debe estar estéril, con el fin de evitar la contaminación cruzada.

1. Se realiza un frotis del microorganismo, para ello se toma una gota pequeña de agua destilada y sobre ella con un asa que previamente fue inoculada con la bacteria a evaluar se realiza un extendido sobre el portaobjetos.
2. Luego se fija la muestra mediante calor a través del secado del agua, teniendo en cuenta no exceder el mismo.
3. Enseguida se realiza la coloración de Gram.
4. Finalmente se observan las bacterias al microscopio. Las bacterias teñidas de color violeta son Gram positivas y las que tiñen de color fucsia serán Gram negativas.

3.1.1.1 Prueba de catalasa. La prueba se fundamenta en la enzima catalasa, presente en la mayoría de las bacterias aerobias. Esta enzima tiene la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La formación de burbujas debido al oxígeno liberado indica un resultado positivo en la prueba (Jurado e Insuasty, 2021).

Materiales

- Peróxido de hidrógeno al 3%.
- Microorganismo en estudio (agar nutritivo).
- Portaobjetos.

Procedimiento

1. Se toma una pequeña muestra del microorganismo y se coloca sobre un portaobjetos.
2. Se añaden 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno.
3. Si se forman burbujas, la prueba es positiva, como en el caso de *Staphylococcus* sp., y negativa, por ejemplo, para *Streptococcus* sp.

3.1.1.2 Prueba de coagulasa. Se lleva a cabo en cocos Gram positivos y catalasa positivos, permitiendo así diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras cepas de *Staphylococcus*.

Materiales

- Plasma de conejo con EDTA
- Microorganismo en estudio (agar nutritivo)
- Caldo BHI

Procedimiento

1. Se extraen 5 mL de plasma de conejo.
2. Se añaden 5 mL del cultivo puro.
3. La mezcla se incuba a 37°C durante 4 a 24 horas.
4. Si después de la incubación se forman coágulos, la prueba es positiva para *S. aureus*; si no se forma coágulo, se considera *S. epidermidis*.

3.1.1.3 Coliformes. Se pueden dividir en Coliformes totales y fecales. Están presentes en diversos hábitats como el agua, el suelo, e incluso el tracto intestinal de los animales. En la industria alimentaria pueden usarse como indicador de problemas sanitarios de bebidas y alimentos (Larrea-Murrell et al., 2013).

El primer paso es la dilución de la muestra, ya que el elevado y acelerado crecimiento poblacional dificulta la interpretación de los resultados. Al respecto, la NTC 4491-1 (2005), indica la forma correcta de realizar este procedimiento.

Preparación del diluyente

Materiales y equipos

- Erlenmeyer de 1000 mL
- Mezclador
- Agua peptonada

Reactivos

- Peptona 1.0 g

- Cloruro de sodio 8.5
- Agua destilada desionizada 1000 mL

Procedimiento. Todos los reactivos se mezclan hasta obtener una mezcla homogénea, en algunas ocasiones es necesario calentar el contenido para obtener una dilución completa.

Luego de preparar el diluyente, se procede a realizar las respectivas diluciones, desde 10^{-1} hasta 10^{-3} , por ejemplo.

Materiales y equipos

- Micropipetas esterilizadas de 1000 μ L de volumen variable
- Puntas de micropipetas estériles
- Tubos de ensayo de tapa rosca estériles

Reactivos

- Agua peptonada al 0.1%

Procedimiento

1. La muestra debe estar en refrigeración desde el momento de su muestreo con el fin de evitar un incremento de los microorganismos presentes.
2. Todo el material a utilizarse debe estar previamente esterilizado.
3. Dado que se realizará tres diluciones, se preparan 3 tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada. Estos deben rotularse de acuerdo con la dilución respectiva 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
4. Como recomendación deben realizarse los procedimientos en un tiempo menor a 20 minutos.
5. Se toma un (1) mL de muestra, de acuerdo con el tipo de alimento a utilizarse, y se deposita en el tubo rotulado como 10^{-1} .
6. Del primer tubo (10^{-1}) se toma 1 mL y se deposita en un segundo tubo, el cual fue rotulado como 10^{-2} . Posteriormente se realiza el mismo procedimiento, utilizando el tubo 10^{-2} y se deposita en el tubo 10^{-3} .
7. A partir de las anteriores diluciones se harán los análisis microbiológicos respectivos.

Flujograma

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO



La muestra debe estar en refrigeración desde el momento de su muestreo



Todo el material a utilizarse debe estar previamente esterilizado



Usar 3 tubos de ensayo con 9 mL de agua peptonada y deben rotularse de acuerdo con la dilución respectiva 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}



Recomendación: deben realizarse los procedimientos en un tiempo menor a 20 minutos



Se toma un (1) mL de muestra, de acuerdo con el tipo de alimento a utilizarse, y se deposita en el tubo rotulado como 10^{-1}



Del primer tubo (10^{-1}) se toma 1 mL y se deposita en un segundo tubo, rotulado como 10^{-2} . Posteriormente, se realiza el mismo procedimiento, utilizando el tubo 10^{-2} y se deposita en el tubo 10^{-3}



A partir de las anteriores diluciones se harán los análisis microbiológicos respectivos



Realizar la determinación de Coliformes Totales y Fecales

Determinación de coliformes totales y fecales. El procedimiento se realiza de la siguiente manera:

Materiales y equipos

- Tubos de ensayo tapa rosca esteriles.
- Tubos Durham invertidos.
- Incubadora.

Reactivos

- Caldo verde bilis brillante.

Procedimiento (presuntivo)

- 1.** Se añaden 9 mL de caldo verde bilis brillante a 9 tubos de ensayo, colocando un tubo Durham invertido dentro de cada uno.
- 2.** Se pipetea 1 mL de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), repitiendo el proceso por triplicado, lo que da lugar a 3 muestras por dilución.
- 3.** Los tubos se incuban durante 48 horas a 37°C.
- 4.** Después de la incubación, se observa la producción de gas dentro de los tubos Durham, lo que indica que la muestra es positiva para coliformes totales.

Luego de este procedimiento, se realiza una prueba confirmativa para Coliformes Fecales de la siguiente manera:

Materiales

- Tubos de ensayo tapa rosca estériles.
- Tubos Durham invertidos.
- Incubadora.

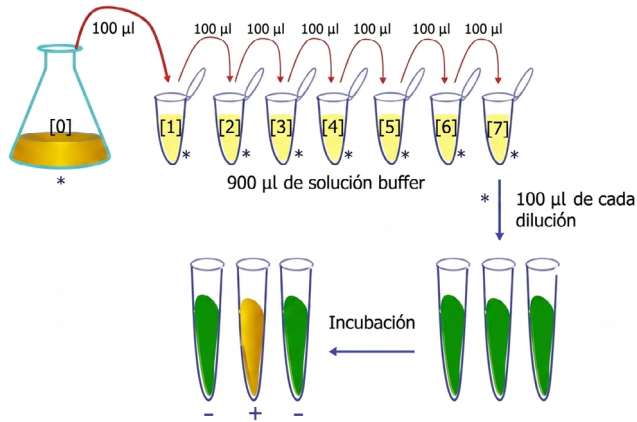
Reactivos

- Caldo verde bilis brillante
- Caldo triptona.
- Reactivo de Kovac's

Procedimiento

- 1.** Se seleccionan los tubos positivos de la prueba presuntiva para Coliformes totales. De los cuales se toman 3 a 5 gotas de cada uno de ellos y se las deposita en caldo verde bilis brillante y en caldo triptona. Es importante rotular los tubos con la dilución respectiva que se está trabajando.
- 2.** Los tubos se incuban en baño maría a 44.5 °C durante 24 horas para el caldo verde bilis brillante y a 37°C para el caldo triptona.
- 3.** Después de la incubación, se identifican los tubos que presenten producción de gas.
- 4.** Se registran los tubos con producción de gas y se revela el caldo triptona utilizando el reactivo de Kovac's. Luego, se agita suavemente y se observa la formación de un anillo rojo en la superficie si el tubo es positivo; si el tubo es negativo, no se observa ningún cambio (Calpa-Yama et al. 2014).

Figura 48. Prueba presuntiva para coliformes totales



Fuente: Magallanes et al. (2016)

Interpretación

Se consulta la tabla del NMP (Número Más Probable) para obtener el resultado basado en la cantidad de tubos positivos, tanto para los coliformes totales, conforme al resultado de la prueba confirmatoria, como para los coliformes fecales, según el caldo brillante y el caldo triptona incubados a 44.5°C (ver Tabla 5).

- La lectura se realiza en función del NMP de la tabla. Para calcular el NMP de los microorganismos por gramo o mililitro, se emplea la siguiente fórmula:

$$NMP/g \text{ ó } mL = \frac{NMP \text{ de la tabla} * \text{factor de dilución intermedio}}{100}$$

Fuente: The International Commission on Microbiological Specification for Food (ICMSF).

- a. Los tubos positivos de la prueba confirmativa, se deben sembrar por estría, tomando una asada de cada uno de los tubos en la superficie de la placa de agar EMB (Eosina azul de metileno).
- b. Llevar a incubación las cajas de petri en forma invertida a una temperatura de 37°C por 24 horas.

- c. Después de este periodo, se realizan las mediciones de las colonias habituales de coliformes, las cuales muestran un resplandor verde metálico.
- d. Finalmente se aíslan las colonias con estas características y también mediante la comprobación por coloración de Gram para realizar su identificación bioquímica de género y especie.

Tabla 5. Número más Probable (NMP).

A			NMP	A			NMP
0	1	0	0,18	5	0	0	2,3
1	0	0	0,2	5	0	1	3,1
1	1	0	0.40	5	1	0	3,3
2	0	0	0,45	5	1	1	4,6
2	0	1	0.68	5	2	0	4,9
2	1	0	0.68	5	2	1	7.0
2	2	0	0.93	5	2	2	9,5
3	0	0	0,78	5	3	0	7,9
3	0	1	1,1	5	3	.1	11
3	1	0	1.1	5	3	2	14.0
3	2	0	1.4	5	4	0	13
4	0	0	1.3	5	4	1	17.0
4	0	1	1,7	5	4	2	22
4	1	0	1.7	5	4	3	28
4	1	1	2.1	5	5	0	24
4	2	0	2.2	5	5	1	35
4	2	1	2.6	5	5	2	54.0
4	3	0	2.7	5	5	3	92.0
				5	5	4	160 0

Food & Drug Administration Center for Food Safety & Applied Nutrition (2000).

3.1.2 Recuento de mesófilos aerobios

Microorganismos que reflejan el grado de contaminación de los alimentos como consecuencia de problemas en el proceso de elaboración y manipulación. El procedimiento se basa en la norma técnica colombiana NTC 4519.

Para ello, se utilizan las diluciones observadas en el procedimiento anterior:

1. Transferir 1 mL de cada una de las diluciones 10^{-1} a 10^{-3} en duplicado a cajas de Petri estériles, previamente etiquetadas.
2. Inmediatamente, verter el agar cuenta gérmenes fundido (Plate Count Agar) en las cajas, manteniéndolo a una temperatura de 45°C.
3. Luego, mezclar el inóculo con el medio fundido; la forma más adecuada de realizar esta operación es moviendo suavemente la caja en un movimiento circular en diferentes direcciones (en el sentido de las agujas del reloj, en sentido contrario a ellas y, finalmente, de arriba hacia abajo hasta que el medio se solidifique).
4. Invertir e incubar las cajas de Petri a 37°C durante 24 horas.

Los resultados se expresan de la siguiente manera: se realiza en una dilución de 10^{-2} y el resultado fue de 148 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mililitro o por gramo de alimento), el recuento será de $14800 = 1.48 \times 10^4$. Si el recuento fue 234, se expresaría así: $23400 = 2.34 \times 10^4$.

5. De igual manera, existen comercialmente pruebas para una detección rápida de mesofilos aerobios como lo son las placas Peel Plate o Petrifilm® permiten un recuento rápido y preciso de las UFC/mL o g, de diferentes alimentos incluyendo muestras de agua.

3.1.3 La familia *Enterobacteriaceae*

De acuerdo con Jurado e Insuasty (2021), esta familia es crucial para la industria de alimentos, pues facilita la identificación del

nivel de contaminación de un producto. Este grupo incluye a *E. coli*, uno de los microorganismos más estudiados por su capacidad para causar enfermedades en ciertas cepas y que se encuentra en los alimentos, incluyendo los derivados cárnicos. A continuación, se describe el procedimiento para identificar a esta familia de microorganismos (Jurado-Gómez et al., 2019).

Prueba de TSI

Materiales

- Agar TSI (Triple Sugar Iron o Triple Azúcar Hierro).
- Cultivo del microorganismo a evaluar.

Procedimiento

6. Preparar el agar TSI según las indicaciones del fabricante y distribuirlo en tubos estériles de 16 x 10 mm con tapa rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y luego inclinar los tubos.
7. Inocular el microorganismo en estudio usando un asa recta, puncionando el medio en el centro hasta el fondo del tubo y realizando estrías en la superficie. Incubar durante 24 horas y luego proceder con la interpretación.

Movilidad

Materiales

Medio SIM (H₂S - Indol - Motilidad)

1. Se prepara el medio de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial y se inocula con el cultivo a investigar.
2. Se lleva a incubación por 24 horas a 37°C.
3. Se lleva a cabo un examen macroscópico del medio, observando una área de crecimiento difuso que se extiende desde la línea de inoculación, lo cual se interpreta como una prueba positiva de movilidad.

Descarboxilasas

Materiales

- Medio LIA Descarboxilasa de Mueller
- Cultivo a evaluar

Procedimiento

1. Se prepara el medio siguiendo las indicaciones del fabricante, se distribuye en tubos con tapa rosca, se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y luego se inclina.
2. El medio debe incubarse con el cultivo de microorganismos, realizando una doble punción y estriando la superficie, para luego incubarlo entre 18 y 24 horas a 37°C.
3. La reacción positiva se observa como descarboxilación, indicándose con el resultado K/K.

Ureasa

Materiales

- Medio LIA Descarboxilasa de Mueller
- Cultivo a evaluar

Procedimiento

1. Preparar el medio conforme a las indicaciones del fabricante, agregar el indicador y distribuirlo en tubos con tapa rosca.
2. Esterilizar los tubos a 121°C durante 15 minutos y luego inclinarlos.
3. Inocular el medio con un asa del cultivo a estudiar y llevar a incubación por 18 a 24 horas a 37°C.

Indol

Materiales

- Medio SIM
- Reactivo de Kovac's

Procedimiento

1. Preparar el medio siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Inocular el cultivo utilizando un asa recta.
3. Incubar durante 18 a 24 horas a 37°C, y luego añadir 5 gotas del reactivo de Kovac's.
4. La formación de un anillo rojo indica un resultado positivo para indol.

Producción de ácido sulfhídrico (H₂S)

Materiales

- Medio SIM
- Medio TSI
- Medio LIA
- Cultivo de microorganismos

Procedimiento

1. Se preparan todos los medios siguiendo las indicaciones del fabricante y se inoculan con los cultivos a evaluar.
2. Se incuban durante un período de 18 a 24 horas a 37°C.
3. La ausencia de ennegrecimiento en los medios se interpreta como una producción de H₂S negativa.

Utilización de Citrato

Materiales

- Agar Citrato de Simmons
- Cultivo de microorganismos

Procedimiento

1. El medio Agar Citrato de Simmons se prepara siguiendo las indicaciones del fabricante, se distribuye en tubos con tapa de rosca, se esteriliza a 121°C durante 15 minutos y se coloca en posición inclinada.

2. La inoculación del medio se realiza con el cultivo utilizando un asa recta, seguida de una incubación a 37°C por un periodo de 24 horas.

Rojo metilo

Materiales

- Caldo Rojo de Metilo (RM)
- Cultivo de microorganismos en estudio

Procedimiento

1. Se elabora siguiendo las indicaciones del fabricante.
2. Se dispensa en tubos con tapa de rosca y se somete a esterilización a 121°C durante 15 minutos.
3. El caldo se inocula con los microorganismos en estudio y se incuba entre 18 y 24 horas a 37°C.
4. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se añaden 4 gotas del indicador rojo de metilo.
5. Al incorporarse el indicador, el medio adquiere un color rojo, lo que señala un resultado positivo para la Prueba de Rojo de Metilo.

Prueba de Rojo de Metilo Voges Proskauer (RMVP)

Materiales

- Caldo RM/VP
- Alfa Naftol 5%
- KOH 40%
- Cultivo de microorganismos

Procedimiento

1. El caldo se prepara siguiendo las instrucciones del fabricante.
2. Se inocula con el microorganismo en estudio y se incuba a 37°C por un periodo de 18 a 24 horas.

3. Al concluir la incubación, se transfiere 1 mL del caldo a un tubo estéril, luego se añaden 0.6 mL de alfa-naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40%, permitiendo su exposición al oxígeno atmosférico.
4. Se considera negativo el test si no adquiere un tono rojo a los 15 minutos de añadir el reactivo.

Prueba de oxidasa. La evaluación de la oxidasa se emplea como un rasgo fenotípico para identificar cepas de bacterias aeróbicas o facultativas aeróbicas. Esta prueba establece si la bacteria genera citocromo oxidasa (y, en consecuencia, emplea oxígeno en la cadena de transmisión de electrones).

Materiales y equipos

- Tiras con BACTIDENT OXIDASA (Dicloruro de nindimetil 1,4 fenil endiamonio 1-naftol).
- Cultivo de microorganismos

Procedimiento

1. Se toma una muestra de la bacteria y se extiende sobre el borde de la tira reactiva. Luego, se espera durante 60 segundos.
2. El resultado se considera positivo si la tira adquiere una coloración púrpura, mientras que se considera negativo si no se observa ningún cambio de color.

3.1.4 Identificación de *Escherichia coli*.

La OMS (2005) manifiesta que es un huésped común del intestino de los humanos y de los animales y que, en ocasiones, por mala higiene en los alimentos, puede presentar problemas toxi-alimentarios. El incremento de problemas por este tipo de microorganismos corresponde a una alerta en la salud pública. Por ello, es importante su verificación en los alimentos. Para su identificación se utiliza la prueba de Peel Plate® o Petrifilm (Agrolechero, 2018).

Materiales y equipos

- Prueba Microbiana Peel Plate® EC

Procedimiento

1. Se toma la prueba y se retira la etiqueta superior.
2. Se maceran 10 g de la muestra y se colocan en un vaso de precipitados con 10 mL de agua destilada.
3. Se pipetea 1 mL de la muestra.
4. La prueba se sella nuevamente con la etiqueta.
5. Se incuba a 35°C durante 40 horas.
6. El conteo de colonias se realiza de la siguiente manera: los puntos rojos indican la presencia de coliformes, mientras que los de color azul, púrpura o negro corresponden a *E. coli*.

3.1.5 *Staphylococcus aureus*.

Este microorganismo es muy importante para la industria alimentaria, con mayor presencia en aquellos productos cárnicos que requieren mayor manipulación en su preparación (Salina et al. 2018). En los últimos años ha tomado mayor importancia este microorganismo por los problemas de salud pública (Jurado, et al., 2021). Uno de los procedimientos que puede utilizarse en su identificación se basa en la metodología propuesta por Agrolechero (2018).

Materiales

- Prueba Peel Plate®.

Procedimiento

1. Se toman 5 g de carne, se maceran y se mezclan con 5 mL de agua destilada. Luego, se extrae 1 mL de la mezcla y se deposita en la prueba de platos (Peel Plate).
2. La prueba se incuba a 38°C durante 24 horas.
3. La evaluación consiste en identificar la presencia de colonias en el medio de cultivo, las cuales presentan un color violeta con un centro blanco, indicando un resultado positivo.

Esta prueba se lleva a cabo utilizando Peel Plate®, un método basado en agar selectivo de Baird Parker y sustratos enzimáticos colorimétricos múltiples, que favorecen el crecimiento e identificación visual de *Staphylococcus aureus*.

3.1.6 *Salmonella* sp.

Tiene una alta capacidad de transmisión para el ser humano, por lo que se considera un problema de salud pública. El reservorio de esta especie son las aves de corral, los bovinos y los cerdos, por lo que es importante su evaluación en este tipo de carnes y productos derivados (Ehrhardt et al., 2023).

Materiales y Equipos

- Caldo Rappaport-vassiliadis con soja (caldo RVS).
- Agar xilosa lisina desoxicolato.
- Agua peptonada.
- Caldo Muller Se deben seguir las instrucciones del laboratorio para su preparación.
- Agar nutritivo (AN)
- Agar triple sugar iron (TSI)
- Agar urea (según Christensen)
- Caldo lisina decarboxilasa
- Reactivo para la detección de β -galactosidasa (o discos siguiendo las instrucciones del fabricante)
- Reactivos para la reacción de Voges-Proskauer (VP)
- Reactivos para la reacción de Indol
- Agar nutritivo semisólido
- Solución salina fisiológica 6
- Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Salmonella* spp. (ej. Galería API 20 E, bioMerieux)
- Sueros: existen distintos tipos de sueros disponibles que contienen anticuerpos para uno o varios antígenos O.
- Estufa de esterilización
- Autoclave

- Horno o cabina de secado, ventilada por convección, capaz de operar entre 37°C y 55°C
- Estufa de incubación a 37°C ± 1°C
- Baño de agua o estufa de incubación a 41.5°C ± 1°C
- Baño de agua capaz de operar entre 44 a 47°C
- Baño de agua a 37°C ± 1°C
- Ansa de platino o níquel de aprox. 3 mm de diámetro o 10 µl.
- Potenciometría calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH a 20°C a 25°C.
- Pipetas graduadas o automáticas de 10 mL y 1 mL de capacidad nominal, graduadas en 0.5 mL y 0.1 mL respectivamente.
- Tubos o frascos de capacidad apropiada.
- Placa de Petri de vidrio o plástico de 90 a 100 mm de diámetro y de 140 mm de diámetro.

Procedimiento

- 1. Preenriquecimiento.** Se usa agua peptona bufferda (BPW) como suspensión inicial. Si la cantidad a analizar es mayor de 25 mL se realiza el ajuste con regla de tres.
 - **Enriquecimiento selectivo.** Transferir 0.1 mL del cultivo a un tubo con 10 mL de caldo RVS e incubar a 41.5°C ± 1°C por 24 horas. Después, transferir 1 mL del cultivo a un tubo con 10 mL de caldo MKTTn e incubar a 37°C durante 24 horas.
- 2. Aislamiento e identificación.**
 - a.** Tomar una muestra de los cultivos previos (RVS y MKTTn) y hacer estrías en placas de agar XLD.
 - b.** Utilizar placas de Petri grandes o dos de tamaño pequeño, usando la misma asa. Incubar las placas de XLD a 37°C durante 24 horas y el segundo agar selectivo según las instrucciones del fabricante (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).
 - c.** Después de la incubación, examinar las placas para identificar la presencia de colonias típicas de *Salmo-*

nella y posibles colonias atípicas que podrían corresponder a *Salmonella* (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

- **Nota:** las colonias típicas de *Salmonella* en el agar XLD son transparentes, del mismo color que el medio, con un centro negro. Las colonias de *Salmonella* H²S negativo (por ejemplo, *S. Paratyphi* A) en el XLD son rosadas con un centro rosa oscuro, mientras que las colonias de *Salmonella* lactosa positivas son de color amarillo, con o sin centro negro (Benitez-Campo y Bolaños, 2018).

3.1.7 Esporas de *Clostridium* sulfito reductor

Este microorganismo se encuentra principalmente en el suelo y los intestinos de humanos y de animales. Puede causar diferentes tipos de enfermedades en distintos grados de severidad. Los brotes de esta enfermedad se deben en su mayoría al consumo de carnes y sus derivados, aunque pueden contaminar otros alimentos (Rodríguez-Arzave et al., 2018). El procedimiento se encuentra basado en las guías de la secretaría de salud del departamento del Meta (2004).

Materiales y equipos

- Incubadora a 35°C ±1°C
- Tubos tapa rosca de 150 x 15 mm estériles
- Jarra de anaerobiosis.
- Baño María 80°C
- Medios de cultivo y reactivos
- Agar SPS (Agar Sulfito- Polimixina - Sulfadiazina)
- Kit de generación de condiciones de anaerobiosis Anaerogen™ (Oxoid).
- Cepa de Referencia (*Clostridium perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 25922)

Procedimiento

Controles y curvas de calibración

- **Control positivo:** Se inocula la cepa *Clostridium perfringens*

ATCC 13124 en Agar Plate Count. Luego, con un asa estéril, se toma una muestra y se inocula mediante punción en un tubo con Agar SPS (Agar Sulfito-Polimixina-Sulfadiazina). Posteriormente, se incuba en una cámara de anaerobiosis a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24, 48 y 72 horas.

- **Control negativo:** Se sigue el mismo procedimiento descrito anteriormente, con la diferencia de que la cepa utilizada es *E. coli* ATCC 25922.

Preparación de la muestra

1. Se realizan diluciones seriadas hasta 10^{-2} en una cabina de flujo laminar.
2. Se pipetea 1 mL de cada dilución en tubos estériles y se colocan en un baño de María a 80°C durante 10 minutos. Luego, se retiran y se enfrían rápidamente con agua corriente.
3. Se añaden 9 mL de Agar SPS a los tubos mediante siembra en profundidad, se agitan y se dejan solidificar.
4. Se incorpora una segunda capa de medio y se deja solidificar nuevamente.
5. Los tubos se colocan en una cámara de anaerobiosis y se incuban a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Lectura de resultados

- a. Se recomienda observar los tubos a las 24, 48 y 72 horas, ya que los microorganismos pueden producir H_2S (ácido sulfhídrico) a las 24 horas, lo que oscurece el medio de cultivo y dificulta su lectura.

3.1.8 Identificación de *Listeria sp.*

La *Listeria monocytogenes* es un problema para la industria alimentaria como consecuencia de la ubicuidad y resistencia que tiene a los distintos tratamientos, ya sean físicos, químicos o biológicos. Junto a lo anterior, tienen la capacidad de desarrollarse en distintas superficies lo que incrementa la capacidad de contaminar los alimentos (Jurado Gámez & Fajardo Argoti, 2017).

Materiales

- Tiras de *Listeria*
- Cultivo de *Listeria*
- Medio enriquecedor

Procedimiento

Preparación del medio

1. Se prepara el medio de cultivo para *Listeria* disolviendo 53 g del medio específico y 1 g de suplemento en 1 L de agua estéril a 30°C. Este medio puede utilizarse hasta 5 horas después de su preparación y, si se mantiene refrigerado, hasta 24 horas.
2. Se pesan 25 g de muestra en una bolsa Stomacher, se añaden 225 mL del medio preparado a 30°C, se agita durante 30 segundos y se incuba durante 40 horas a 30°C.
3. Para prolongar su vida útil, los medios pueden ser esterilizados en autoclave y conservarse refrigerados hasta por 2 semanas.

Enriquecimiento de la Muestra

1. Se pesan 25 g de la muestra en una bolsa Stomacher.
2. Se agregan 225 mL del medio previamente calentado a 30°C.
3. Se agita la bolsa en el Stomacher durante 30 segundos.
4. Se incuba a 30°C durante 40 horas.
5. Se coloca la tirilla de detección y se procede a la lectura.
6. La presencia de una doble línea en la tirilla indica un resultado positivo para *Listeria*.

3.2 Antibióticos en Carne

Determinación de Antibióticos. La presencia de antibióticos en los alimentos es un problema constante para los sistemas de producción animal, dado que el mal uso de estos medicamentos trae como consecuencia un incremento en la resistencia de los microorganismos. A pesar de prohibirse su uso en muchos

países, su utilización fuera de la norma hace que se continúe evaluando su presencia en los alimentos, con el fin de garantizar productos de alta calidad.

Para el caso de los cárnicos una alternativa es el kit Kidney Inhibition Swab (KIS), que es una prueba de inhibición simple para analizar una serie de antibióticos (Agrolechero, 2018). A continuación, se presenta su uso Charm Sciences (2015):

Materiales y equipo

- Test KIS
- Lector de antibióticos
- Termómetro
- Riñón o hígado (20 g)

Procedimiento

1. Se toma el Test KIS y se desenrosca la tapa que se encuentra en la parte superior.
2. Al visibilizarse el hisopo, este se impregna con la muestra (riñón o hígado).
3. El test (con el hisopo impregnado) es introducido en el lector de antibióticos que viene diseñado especialmente para todos.
4. En forma paralela, se debe colocar el lector (equipo) debe ponerse a calentar antes de colocar la muestra.
5. El lector debe precalentarse hasta alcanzar una temperatura de 64°C, la cual debe confirmarse con un termómetro externo.
6. El test se coloca en el lector y se deja durante un período de 2 horas y 30 minutos.
7. La prueba se considera finalizada cuando el hisopo cambia de color.
8. El color puede variar de color café oscuro hasta violeta, entre mayor el color violeta más presunción de la presencia de antibióticos.

3.3 Antibióticos en leche.

Los antibióticos son un tema preocupante para la industria láctea, debido a un mal uso de este tipo de productos. La ciencia ha demostrado que la presencia de antibióticos en la leche se encuentra asociada de forma positiva con la presencia de mastitis en los sistemas de producción, dado que estos medicamentos son utilizados para su control (Jurado-Gómez et al., 2019).

Técnica Beta s.t.a.r. Es un test basado en un receptor para la determinación rápida de antibióticos β -lactámicos (penicilina, ampicilina, etc.) en leche, utilizados de manera extensiva en la prevención y tratamiento de enfermedades del ganado de industrias lácteas, especialmente la mastitis (Sánchez et al., 2016). El test consiste en un receptor de β -lactámicos ligado a partículas de oro.

La incubación principal del receptor con leche que contiene antibióticos dará como resultado la interacción de los antibióticos con el receptor. En una segunda fase, la solución es transferida a un medio inmunocromatográfico. La primera banda de este medio capturarán todos los receptores, que no han interactuado con ningún antibiótico durante la primera incubación (Agrolechero, 2018).

La segunda banda del medio inmunocromatográfico sirve con una tira de referencia (tira control).

Materiales

- Equipo Rosa incubators

Procedimiento

Segun Sánchez et al., (2016):

1. Saca el kit del frigorífico.
2. Retirar un vial individual con el receptor y golpear suavemente la base del vial contra una superficie dura para que el contenido se desplace hacia el fondo del vial.
3. Quitar el sello y el tapón de goma del vial del receptor.

4. Poner una punta limpia en la jeringuilla.
5. Bajar completamente el embolo de la jeringuilla e introducir la punta de ésta 1 cm en la muestra de leche, para tomar 0.2 mL de leche.
6. Transferir la leche de la jeringuilla al vial bajando lentamente el émbolo. Asegurarse de la total transferencia. Se coloca el tapón y se agita de forma suave hasta disolver el material sólido.
7. Poner el vial en el incubador pre-calentado. Incubar durante 3 minutos a 47.5°C.
8. Tras 3 minutos de incubación, abrir el envase blanco, tomar una tira de lectura y colocarla dentro del vial, asegurándose de que las flechas de la tira apunten hacia la parte inferior del vial en incubación. Continuar la incubación a 47.5°C y cerrar el envase blanco.
9. Después de una incubación adicional durante 2 minutos, sacar la tira del vial y realizar la lectura inmediatamente. La tira puede ser guardada.
10. Si la primera banda tiene una intensidad cercana o menor que la banda de referencia, la muestra es interpretada como **positiva**. Si no aparece la primera banda, la muestra es interpretada como altamente **positiva** (ver figura 49).

Figura 49. Determinación de antibióticos en leche.



Recuento de Células Somáticas (RCS/mL). La leche, tanto por animal como por hato, puede analizarse determinando el RCS. La literatura indica que recuentos mayores a 200.000/mL sugiere una prevalencia de mastitis en el hato (Charms, 2019). Los valores de RCS son un indicador de la inflamación de la ubre, por lo que el valor de recuento citado anteriormente puede ser modificado por otras características como la edad del animal y el estatus sanitario del hato. Por ello, la industria ha creado un kit de fácil manejo y rápida obtención de resultados (ver figura 43). En el presente texto colocamos a su consideración su metodología. Aunque se debe recalcar que el Gold Standar de la determinación es el citómetro de flujo, y el método que proponemos es rutinario para facilitar el manejo, dado que el anterior tiene mayores costos que el productor no puede asumir (Agrolechero, 2018).

Materiales

- Kit Porta PortaSCC®
- Lector digital marca PortaSCC®

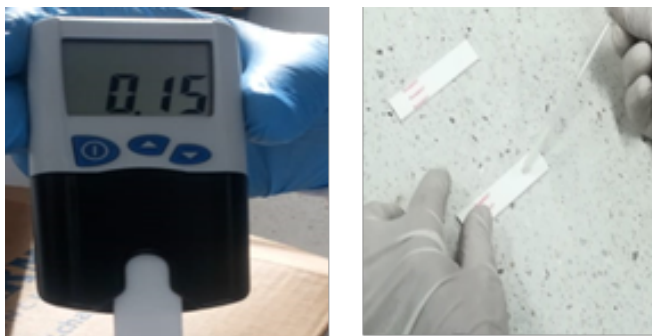
Procedimiento

- 1.** Con ayuda de una pipeta se toma una muestra de leche y se agrega una gota en el pocillo de la tirilla hasta que la absorba totalmente. La tirilla se lleva a un lugar con restricción de luz.
- 2.** Finamente se espera 45 minutos y se procederá a realizar la lectura con el lector digital.

Interpretación

Luego de transcurridos los 45 minutos se estima el número de células somáticas contrastando con la carta de color o se observa el lector digital.

Figura 50. Prueba para recuento de células somáticas.



3.3 Determinación de Vomitoxinas

De acuerdo con Arroyo-Manzanares et al. (2019), el Dioxinivalenol o Vomitoxina es otra micotoxina del grupo de los Tricotricos y, al igual que la zearalenona, es un metabolito de *Fusarium graminearum* y por *Fusarium culmorum*. El dioxinivalenol es también conocido como vomitoxina, debido a que causa un sabor rancio en los granos y en alimentos balanceados, lo cual induce vómito y diarrea en los animales que lo consumen. Los cerdos son particularmente vulnerables a la vomitoxina, y es frecuente que rechacen ingerir alimentos con altos niveles de contaminación. La vomitoxina afecta también a los vacunos, aves, perros, gatos y humanos.

Procedimiento

Procedimiento : en base los autores Arroyo-Manzanares et al. (2019).

1. Pesar 10 g o 50 g de alimento concentrado y macerarlo de tal manera que quede en forma de polvo.
2. Se deposita esta cantidad en un recipiente de tapa-rosca y se adiciona 50 mL de agua destilada o desionizada para una cantidad de 10 g de concentrado. Si la cantidad a utilizar es de 50 g de alimento concentrado adicionar 250 mL de agua destilada o desionizada.

- 3.** Se debe agitar todo este contenido en el recipiente de taparrosa por espacio de 1-2 minutos.
- 4.** Se deja en reposo todo este contenido por un espacio de 2 minutos.
- 5.** Enseguida se procede a filtrar utilizando un tamiz o papel filtro para obtener el sobrenadante de la mezcla del alimento concentrado con el agua destilada o desionizada. Si este sobrenadante presenta residuos sólidos se recomienda centrifugar a 3.000 r.p.m. por espacio de 3 minutos. Para esto se debe depositar 1 mL del sobrenadante en un tubo eppendorf o 10 mL en un tubo de ensayo.
- 6.** A continuación se toma 0.1 mL (100 microlitros - μ L-) en un tubo eppendorf y se adiciona 1 mL de la solución DON DILUTION BUFFER. Se agita y se mezcla.
- 7.** Conectar el lector de las pruebas de vomitoxina para alimentos concentrados.
- 8.** Esperar hasta que la temperatura marque los 46°C, lo cual se evidencia porque aparece en el interior del lector un cuadro de color negro el cual cambia a un color café alrededor del valor de la temperatura deseada (46°C).
- 9.** Para comprobar la temperatura del lector se recomienda colocar un termómetro en una ranura que para tal fin dispone el equipo lector.
- 10.** Posteriormente se toma con la micropipeta que trae el kit para detección de la vomitoxina la cantidad de 0.3 mL (300 microlitros - μ L-) del contenido total en el tubo eppendorf.
- 11.** Se depositan estos 0.3 mL (300 microlitros - μ L-) en la tirilla utilizando la micropipeta.
- 12.** Se tapa el equipo y se deja por un espacio de 3 minutos, que se verifica porque el lector emite un sonido que indica que la prueba está lista para realizar la lectura.
- 13.** Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

Interpretación visual:

- **Negativa:** <5 ppm DON o Vomitoxina. La muestra es negativa si en la tira la línea T (Test) es más oscura o igual en intensidad que la línea control (T).
- **Positiva:** ≥ 5 ppm DON o Vomitoxina. La muestra es positiva si en la tira la línea T (Test) es más clara en intensidad que la línea control (T).

3.4 Recuento de Hongos y Levaduras.

La presencia de estos organismos se debe principalmente a contaminación ambiental, muchas veces durante el empaque, la manipulación o un mal almacenamiento del producto.

Materiales

- Cajas de Petri

Reactivos

- Agar Saboraud

Procedimiento

1. Se realiza las diluciones como se describe en el apartado de coliformes totales.
2. Transferir en duplicado 1 mL de cada una de las diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) a cajas de Petri estériles previamente etiquetadas (Jurado et al., 2021)
3. Verter inmediatamente el agar Saboraud fundido, mantenido a 45°C , y mezclar con suavidad.
4. Dejar que el medio se solidifique.
5. Invertir las cajas y proceder a incubar a temperatura ambiente durante 5 a 8 días.
6. A partir de este punto, el procedimiento continúa de la misma manera que en el recuento de mesófilas.

3.4.1 Prueba de la reducción de colorantes (azul de metileno).

Esta sección se basa en Jurado - Gámez et al., (2019)

Los tests para la reducción de colorantes se han utilizado durante años como indicadores de la calidad microbiológica de la leche y otros productos alimentarios. Este procedimiento se basa en evaluar la actividad metabólica de las bacterias, dado que muchas de ellas poseen enzimas deshidrogenasas, que transfieren hidrógeno de un sustrato a un aceptor biológico, provocando su reducción. Sin embargo, se debe señalar que este método ha caído en desuso debido a problemas de exactitud (Jurado-Gámez et al., 2019).

Materiales

- Tubos de ensayo
- Baño agua fría
- Estufa
- Gradillas metálicas (resistente al calor).

Reactivos

- Azul de metileno

Procedimientos

- 1.** Agregar 1 mL de solución de azul de metileno en un tubo estéril.
- 2.** Verter 10 mL de leche en el tubo que contiene el azul de metileno, sin mezclar. Rotular el tubo.
- 3.** Durante la preparación de las muestras, los tubos pueden permanecer en un baño de agua fría (0-5°C), pero no por más de dos horas.
- 4.** Los tubos preparados se colocan en un baño maría a 36°C, junto con un tubo testigo (leche sin indicador). Cuando la temperatura de la muestra alcance los 36°C ± 1°C, se deben invertir los tubos lentamente dos o tres veces para mezclar su contenido.

5. El nivel del agua debe estar por encima del nivel de la leche. Cubrir los tubos con tapa para evitar que la luz entre. Revisar los tubos cada 30 minutos para observar cualquier cambio de color.
6. En el tubo testigo, agregar 10 mL de leche y 1 mL de agua corriente, luego llevarlo a un recipiente con agua hirviendo durante 3 minutos. Después, colocar el tubo en el baño con los demás tubos a 37°C. El tubo testigo ayudará a determinar cuándo la decoloración es completa.
7. Los tubos se examinan después de media hora. La leche se considera decolorada cuando toda la columna de leche se visualice completamente decolorada o lo está hasta 5 mm por debajo de la superficie. En este caso se debe registrar el resultado “tiempo de reducción 30 minutos”.
8. Si la prueba se prolonga, los tubos deben ser examinados con intervalos de 30 minutos. Los tubos que se van decolorando se retiran del baño. Estos resultados se pueden interpretar de acuerdo con la siguiente tabla (tabla 6).

Tabla 6. Interpretación de los resultados de la prueba de azul de metileno.

Tiempo en decolorarse	Microorganismos/mL (aproximadamente)	Calidad
Cinco horas o más	menor a 500.000	Excelente
Dos horas o más	Entre 500.000 y 4'000.000	Buena
Veinte minutos o más	Entre 4 y 20 millones	Mala
Menor a veinte minutos	Mayor a 20 millones	Muy mala

3.4.2 Prueba de la resazurina.

En 1929 el indicador de resazurina fue introducido en Alemania como un sustituto del azul de metileno para pruebas de reducción en leche, desde entonces esta prueba se ha venido utilizando cada vez por requerir menos tiempo (Jurado-Gómez

et al., 2020).

Materiales

- Tubos de ensayo
- Baño agua fría
- Estufa
- Gradillas metálicas (resistente al calor)

Reactivos

- Resazurina

Procedimiento.

1. El procedimiento es igual al descrito en azul de metileno, las únicas diferencias radican en que se cambia la cantidad de azul de metileno por la resazurina, el tiempo en baño maría es de 1 hora y la interpretación se coloca en la tabla 7.

Tabla 7. Interpretación de los resultados de la prueba de azul de metileno.

Color	Calidad
Azul celeste	Excelente
Violeta azulado	Buena
Violeta rojizo	Aceptable
Rojo-Rosa	Mala
Incoloro	Muy mala

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 3.

MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ZOOTÉCNICO

Los alimentos se caracterizan por tener gran cantidad de nutrientes, muchos de ellos fácilmente disponibles para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, que además, de las condiciones de pH, potencial de oxido-reducción, humedad relativa y una elevada actividad de agua, determina que los microorganismos tienden a colonizar fácilmente estos productos y alterar de forma rápida su contenido y por lo tanto, ser un factor determinante de muchas toxiinfecciones y enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS).

CAPÍTULO 4.

Procesos biotecnológicos aplicados a la Microbiología Zootécnica



4.1 Reconstitución, Conservación, Siembra y Cultivos de Bacterias Ácido Lácticas.

Como primera medida, se deben obtener bacterias puras, para lo cual se recurre a laboratorios certificados, para garantizar la pureza de las bacterias. En muchas ocasiones los investigadores utilizan la referencia ATCC (American Type Culture Collection), aunque se debe aclarar que no es la única.

La reconstitución se realiza de acuerdo a las instrucciones del fabricante y en un medio específico para las bacterias con el fin de optimizar su crecimiento y recuperación. La metodología ha sido adaptada por Fajardo-Argoti et al. (2021).

Luego de 24 horas de reconstituida la cepa, se debe confirmar su crecimiento y desarrollo, además debe realizarse repique en cajas de agar MRS comercial y en tubos con caldo MRS. Posteriormente, las cepas se incuban por 24 horas a 37°C. El procedimiento de repique se realiza en cámara de flujo laminar tipo II. Luego de finalizada la incubación, se revisa nuevamente su crecimiento en los agares y caldos, y para constatar su morfología macroscópica se utiliza coloración de Gram, lo que permite confirmar su pureza. Este procedimiento se realizará cada 12 días para mantener una viabilidad adecuada de las cepas.

Para determinar los parámetros de crecimiento, el cultivo se inocula de la siguiente manera: se toma una asada del cultivo, y se la introducen en un Erlenmeyer que contenga 40 mL de caldo MRS comercial estéril. Se incuba por 24 horas a 37°C. Nuevamente se realiza un repique del incubado anterior, para ello se toman 4 mL y se depositan en 40 mL de caldo MRS comercial y se lleva a incubación bajo las mismas condiciones descritas anteriormente (ver figura 44).

De acuerdo con Fajardo-Argoti et al. (2021) mencionan que cuando hay un crecimiento elevado, que impide un correcto conteo de las bacterias. Crueger y Crueger (1993), hacen un ajuste en porcentaje de 10% v/v, para iniciar la fermentación. Transcurrido este tiempo, se procederá a calcular el número de bacterias por mL. Se toma 1 mL del caldo MRS comercial y se mezcla con 9 mL

de solución peptonada. Cuando se presente mayor población de la establecida, se adicionará caldo estéril, teniendo en cuenta el siguiente cálculo matemático de proporcionalidad de acuerdo con Guerrero et al. (2002), citado por Montes et al. (2003), y ajustado por Fajardo et al. (2021).

M₁= población o densidad celular que se debe ajustar

M₂= 0,125 densidad óptica equivalente a $1,50 \times 10^8$ UFC/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V₁= 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90)

X₁= cantidad que contiene M₂

V₂= lo que se agrega a 1 mL para ajustar a $1,50 \times 10^8$ UFC/mL

V₃= 100 mL cantidad total del inóculo

X₂= cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V₃ para ajustar la población el valor de M₂

Se encuentra entonces X₁;

$$M_1 \rightarrow M_2$$

$$M_2 \rightarrow M_1$$

$$X_1 = \left(\frac{M_2 * V_1}{M_1} \right)$$

Se encuentra entonces V₂;

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X₂;

$$V_1 \rightarrow V_2$$

$$V_3 \rightarrow V_2$$

$$X_2 = \left(\frac{V_3 * V_2}{V_1} \right)$$

El valor de X_2 , es la cantidad que se debe agregar para ajustar la población.

Figura 51. Reconstitución de la cepa láctica.



4.2 Cinéticas de fermentación de bacterias lácticas.

4.2.1 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/mL

La técnica de conteo en placa proporciona información sobre el número de células viables durante el proceso, expresado en términos de UFC/ μ L, lo que permite evaluar la evolución de la producción de biomasa. Para realizar los conteos, se diluye 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1% y se preparan diluciones decimales. De cada dilución, se transfiere 0,1 mL (100 μ L) de la muestra a cajas Petri con medio MRS que contiene azul de anilina para siembra en superficie. Las cajas se incuban a 32°C y se observan entre las 24 y 48 horas. Se consideran válidos los conteos de UFC/ μ L entre 30 y 300 UFC. El número de colonias se multiplica por el inverso de la dilución y por 10 para obtener las UFC/ μ L formadas de acuerdo a lo establecido por Lanara (1981).

4.2.2 Determinación de pH

La variación del pH se comprobará mediante la medición con un potenciómetro.

4.2.3 Determinación de proteínas:

Método de Lowry modificado (Jurado Gámez & Fajardo Argoti, 2017). Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para formar un complejo de color azul, resultado de la interacción del cobre alcalino con las proteínas. La intensidad del color está determinada por la cantidad de aminoácidos y enlaces peptídicos presentes, y variará según el tipo de proteína. La solución azul presenta una absorbancia máxima a 750 nm, con un rango lineal de 0-300 mg/L. Se ajustarán 1 mL de los patrones de la curva estándar y se prepararán las muestras por duplicado. Luego, se añadirá 0,5 mL de NaOH 2N a todos los tubos, los cuales se colocarán en un baño maría a ebullición durante 10 minutos, se deben dejar enfriar en un baño de agua fría, luego se agrega 0,5 mL de H₂SO₄ 2.6 N. Después de añadir 0,9 mL de solución A, se coloca en baño maría a 50°C durante 10 minutos y luego se deja reposar nuevamente en agua fría. Posteriormente, se añade 0,1 mL de solución B, y se deja en la oscuridad durante 10 minutos. Mientras tanto, se prepara la solución C y, a continuación, se adicionan 3 mL de esta solución.

Las soluciones se prepararán de la siguiente forma (Fajardo, I. 2022):

- **Solución A:** Diluir 0.5 g de tartrato de sodio potasio, 25 g de carbonato de sodio y 125 mL de hidróxido de sodio 1 N en 125 mL de agua destilada.
- **Solución B:** Disolver 2 g de tartrato de sodio potasio y 1 g de sulfato de cobre en 10 mL de hidróxido de sodio 1 N.
- **Solución C:** Preparar una solución de agua destilada y reactivo de Folin-Ciocalteu en una proporción de 14:1 (preparada justo antes de usar).
- **Solución estándar de seroalbumina bovina:** Disolver 15 mg de seroalbumina en 50 mL de agua destilada, y almacenar el resto en el congelador. La concentración final será de 300 mg/L.

4.2.4 Determinación de Consumo de Azúcares Totales

La cuantificación de azúcares permite medir su consumo para el crecimiento de los microorganismos y establecer la relación entre consumo y crecimiento celular. Los azúcares se determinarán mediante el método de Dubois et al. (1951), conocido como el método de Antrona. Se debe preparar previamente una curva estándar con diferentes concentraciones de solución patrón de glucosa; los valores de densidad óptica (D.O.) a 525 nm se graficarán en función de la concentración en mg/L para obtener la ecuación de la recta. La dosificación de los azúcares presentes en las muestras se realizará sobre 2.5 mL de muestra diluida en agua destilada, a la que se le añadirán 5 mL de Antrona preparada en ácido sulfúrico. Los resultados obtenidos se calcularán usando la ecuación de la recta de la curva estándar y se multiplicarán por el factor de dilución (Fajardo, I. 2022).

4.3 Determinación de producción de acidez.

La acidez se determinará por titulación con hidróxido de sodio (NaOH) mediante el procedimiento descrito en la Norma técnica (NTC, 4978).

Materiales

- Hidróxido de sodio 0.1 N
- Fenolftaleína al 1%
- Bureta
- Beaker
- Pipetas
- Varilla de vidrio

Procedimiento

La bureta será llenada con hidróxido de sodio 0.1 N; por otra parte, se tomará 9 mL de la muestra, la cual será depositada en un Beaker. A la muestra se le agregará 3-5 gotas de fenolftaleína al 1% y mediante movimientos del Beaker se realizará el mezclado con la leche. Enseguida, se realizará la titulación de la muestra a evaluar con hidróxido de sodio, permitiendo que descienda de

manera lenta sobre la muestra, este procedimiento se realizará hasta que se obtenga a medida poco a poco hasta lograr un color rosa. Luego de obtenido el color se determinará la cantidad de hidróxido gastada para la titulación.

4.4 Crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de NaCl

La supervivencia a concentraciones de NaCl se hace acorde con Song et al. (2016). La cepa aislada se reactiva en tubos con medio MRS a 37°C durante 24 h. Se preparan soluciones de NaCl al 3,5 y 6,5 % (p/v) utilizando tubos con 9 mL de caldo MRS y ajustando este medio de cultivo a las concentraciones indicadas de NaCl. A cada tubo se adiciona 1 mL de cada cepa reactivada y se lleva a incubación por 24 horas a 37°. Finalmente, los cultivos se agitarán en vortex y se medirá la viabilidad de los microorganismos tal como se especifica en el apartado de recuento de células viables (Fajardo, I. 2022)..

4.5 Evaluación de la producción de biomasa.

Los resultados obtenidos permitirán determinar si las cepas resultaron ser las más adecuadas en términos tiempo-tasa de crecimiento durante el proceso de fermentación para establecer el tiempo de duración en la producción de biomasa. Los cálculos de fermentación para las cinéticas serán los definidos por Crueger y Crueger (1993) y Rodríguez et al. (2003). La velocidad específica de crecimiento se determinará por la ecuación tiempo de duplicación celular. Velocidad específica de crecimiento definida por la ecuación:

$$v_{\max} = \frac{d \ln X}{dt}$$

El tiempo de duplicación celular:

$$td = \frac{\ln 2}{\nu}$$

De acuerdo a Madigan et al. (2009), se calculará el tiempo que tarda en duplicarse la población o tiempo de generación (g):

$$g = \frac{0,693}{\mu}$$

De igual manera, se calculará el inverso del tiempo de generación se le denomina velocidad de crecimiento (K) y sus dimensiones son generaciones/hora (K):

$$K = \frac{1}{g}$$

También se calculará en la fase estacionaria la cosecha máxima. Donde la cosecha máxima es la biomasa máxima obtenida. Su cálculo se realizará mediante la expresión siguiente:

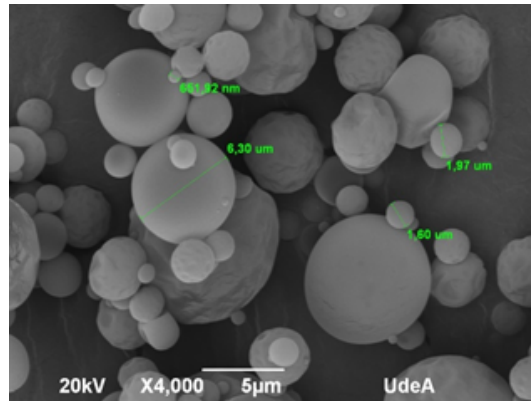
$$M = Mt - Mo$$

Siendo, Mt la biomasa en el tiempo t y se calculó en el momento de la fase estacionaria en el que el número de células es más elevado y Mo la biomasa del inóculo. El resultado se expresará en Ln UFC/ μ L.

4.6 Microencapsulación de las bacterias ácido lácticas.

Luego de obtenido el inóculo, la microencapsulación debe realizarse de acuerdo con Rodríguez et al. (2016). Para ello, uno de los procedimientos podría ser preparar 400 mL de la bacteria láctica al 15% p/v (60 g de Maltodextrina y 60 g de Inulina en 280 mL de inóculo bacteriano previamente ajustado), los cuales se agitan hasta homogenizar. Para la microencapsulación se emplea un secador por aspersión Secador Spray Bilon 6000s®, con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida de 65 a 67°C, realizando un ciclo completo de 2 horas y 30 minutos. El material resultante (microencapsulado) se envasa finalmente en envases plásticos oscuros que han sido previamente esterilizados y se almacena a temperatura ambiente (20 \pm 2 °C) (ver figura 52) (Fajardo, I. 2022).

Figura 52. Microfotografía del microencapsulado



4.7 Evaluación del microencapsulado

4.7.1 Estudio de supervivencia y estabilidad

Esta sección es realizada en base a Fajardo, I. (2022).

Para evaluar el impacto de los materiales microencapsulantes (maltodextrina e inulina) sobre la viabilidad de los microorganismos encapsulados, se seguirá la metodología propuesta por Montes-Ramírez (2013) y Rodríguez-Barahona et al. (2015). Los criterios de estabilidad incluirán: la viabilidad de las BAL evaluada durante el almacenamiento ($>10^8$ UFC/g), la caracterización física (actividad de agua, humedad relativa, solubilidad, eficiencia de microencapsulación, humectabilidad e higroscopicidad) y la caracterización estructural (morfología y tamaño de las microcápsulas). Estos parámetros se medirán por duplicado a los 8, 15, 20, 30 y 45 días de almacenamiento bajo condiciones ambientales ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) (Fajardo, I. 2022).

4.7.1.1 Higroscopicidad

La higroscopicidad será determinada de acuerdo con lo propuesto por Fritzen-Freire et al. (2012), para ello se tomará un gramo de polvo de microencapsulado el cual será ubicado sobre una malla de poro fino para evitar la fuga del material. Este montaje se colocará sobre un recipiente de vidrio hermético con solución

saturada de NaCl (75,3% de HR) a 25°C. Después de 1 semana, las muestras se deberán pesar. La higroscopicidad se expresará como gramos de humedad adsorbida por 100 g de sólidos secos ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$).

Para esta determinación se tendrá en cuenta lo establecido por Serna-Jiménez (2015) de esta manera se medirá la adhesión de la bacteria ácido-láctica a las células de la mucosa intestinal de forma cualitativa, para lo anterior se utilizarán láminas con tejido de mucina humana Sigma-Aldrich (Mucin Tissue - Trol TM, AR-Med LTD- Runnymed Malthouse- TW20 9BD U.K) siguiendo las instrucciones del fabricante y/o proveedor. Las bacterias empleadas como controles positivos de adhesión serán *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*. El ensayo se desarrollará en etapas: (i) Activación de cepas. La activación de *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* se realizará en caldo Trypticase de Soya (TSB). El cultivo se llevará a incubación a 37,0 °C por 24 horas. Para una segunda activación, se transferirán 100 μl del caldo anterior a 5,0 mL de un nuevo caldo TSB. Las concentraciones celulares deberán tener una concentración celular de 10^8 - 10^9 UFC/mL, esta concentración se verificará mediante recuento en placa. Para la cepa BAL en estudio se realizará el procedimiento establecido en el numeral 1. (ii) Obtención y purificación de células. La obtención y purificación de las células bacterianas se llevará a cabo por centrifugación a 9055,0 g por 10 minutos a 4,0 °C. Posteriormente se extraerá el sobrenadante generado, y al pellet recuperado se le adicionará 1,0 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) para diluir la muestra. (iii) Preparación de muestras. Para verificar la concentración celular de las muestras, se tomarán 80 μL de la muestra y se fijarán con mechero a una lámina portaobjetos. La lámina se incubará a 37 °C por 30 minutos y posteriormente se llevará a colorear con cristal violeta filtrado (1 minuto). La lámina se llevará a enjuagar con PBS y se llevará al microscopio para conteo en 10 campos y verificación de la pureza.

4.7.1.2 Caracterización estructural: morfología y tamaño de microcápsulas

La morfología y tamaño de las microcápsulas serán determina-

das mediante un microscopio electrónico de barrido FEG (Field Emission Gun), para lo anterior las muestras serán enviadas a laboratorios de referencia.

4.7.1.3 Eficiencia de la microencapsulación de *Lactobacillus gasseri*.

De acuerdo con lo descrito por Gonzales et al. (2015), para evaluar la eficiencia de la microencapsulación, la suspensión de microcápsulas será centrifugada a 5000 r.p.m por 15 minutos con el fin de separar las células libres de *L. gasseri*. Posteriormente se determinará la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculará la eficiencia de encapsulación (%EE) con la siguiente formula:

$$EE (\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Donde A es la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y B es la concentración de la bacteria después de micro encapsular encontrada en el sobrenadante.

La adhesión a las células de la mucosa intestinal se evaluará transfiriendo 80 μ L de la muestra de las células bacterianas sobre la lámina con mucina (Sigma-Aldrich). Las láminas inoculadas se dejarán secar a 37 °C por 30 minutos y luego se incubarán en cámara húmeda o de anaerobiosis durante 24 horas a 37 °C. Después de la incubación las láminas se lavarán con PBS, para retirar las bacterias que no se unieron a las células de la mucosa adheridas a las láminas. Luego se colorearán con cristal violeta filtrado por 1 minuto y se lavarán nuevamente con PBS. Finalmente, las láminas se observarán en el microscopio para analizar si las células bacterianas se adhirieron al tejido intestinal. Este procedimiento se debe repetir para las bacterias control (*Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis*) y para la BAL. Como controles negativos se utilizarán las láminas (Sigma-Aldrich) teñidas con cristal violeta, pero sin adición de células bacterianas. Los resultados se clasificarán de acuerdo con el tipo de adhesión obtenida: se considerará como adhesión negativa, cuando no se observan células bacterianas en las láminas, igual que lo ocurrido en los controles negativos; y se considerará

como adhesión positiva cuando los resultados obtenidos sean similares a los presentados en los controles positivos (alto porcentaje de células bacterianas en las láminas).

4.7.2 Viabilidad.

Siguiendo lo establecido por Rodríguez-Barahona et al. (2015), se realizará el recuento de células viables a partir de 1 g de material encapsulado, que se rehidratará a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona tamponada al 0.1% p/v (pH 7.2 ± 2), el cual se homogenizará en un vórtex y se dejará reposar durante 30 minutos para facilitar la liberación del microorganismo. Se sembrará 150 μ L de la dilución en superficie sobre medio MRS con azul de anilina y se incubará en condiciones aerobias a 37°C durante 48 horas. Los recuentos se realizarán por duplicado y se expresarán como UFC/g en base seca, según cada condición experimental y siguiendo el método de Trevedi et al. (2010). El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculará usando la ecuación (1).

$$\%Viabilidad = \left(\frac{N}{N_0}\right) * 100 \quad (1)$$

Donde N_0 representa la cantidad de bacterias por mL de solución previo al procedimiento y N representa la cantidad de bacterias por mL de solución tras la fase de secado.

4.7.3 Humedad

Para determinar la humedad, se tomarán 2 g de material microencapsulado y se analizarán en un determinador de humedad KERN DBS 60-3 (Balingen, Alemania) a una temperatura de 105 °C, con una resolución de 0,001 g (0,01%). El resultado se expresará como porcentaje en base seca (% bs).

4.7.4 Actividad de agua

La actividad de agua (A_w) se medirá utilizando un termohigrómetro Hygrolab Rotronic (Nürnberg, Alemania), que previamente será calibrado. El resultado se presentará en porcentaje en base seca (% bs).

4.7.5 Solubilidad

Según el método descrito por Cano-Chauca et al. (2005), la solubilidad se calculará disolviendo 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada. La solución se mantendrá durante 5 minutos a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, agitando a 120 r.p.m. en una placa de calentamiento. Luego, la suspensión se centrifugará a 3000 r.p.m durante 5 minutos. Se tomará una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante, que se transferirá a una caja Petri previamente pesada. Esta se colocará en una estufa a 105°C por 5 horas hasta obtener peso constante. Los sólidos recuperados se pesarán tras el secado (mf) y se calculará el porcentaje de solubilidad usando la diferencia de pesos mediante la ecuación (2), donde m_i es 0,25 g.

$$\text{Solubilidad} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) 100\% \quad (2)$$

4.7.6 Humectabilidad

El tiempo de humectación de los polvos microencapsulados será determinado por el método de humectación estática (Freudig et al., 1999) modificada (Ceballos et al., 2012) y Rodríguez-Barahona et al. (2015) y adaptada por los autores. Para este procedimiento se empleará un beaker de 100 mL con dimensiones de 5 cm por 7 cm. Se colocará una cantidad de material microencapsulado (1 g) en una placa extraíble que cubrirá un recipiente con agua. Al retirar la capa de polvo sin alteraciones, esta entrará en contacto con el agua. El tiempo de humectación, medido en minutos, es el tiempo necesario para que 1 g de polvo, depositado cuidadosamente sobre 100 mL de agua a 20°C , se sumerja por completo.

4.7.7 Eficiencia de la microencapsulación

Según lo indicado por González-Tello et al. (2007), para evaluar la eficacia de la microencapsulación, la suspensión de microcápsulas será sometida a centrifugación a 5000 r.p.m durante 15 minutos, con el objetivo de separar las células libres de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), como *L. plantarum* y *L. gasseri*. Luego, se medirá la concentración bacteriana en el sobrenadante y se calculará la eficiencia de encapsulación (%EE) utilizando la siguiente fórmula:

$$EE (\%) = \left(\frac{A - B}{A} \right) \times 100$$

Donde A es la concentración bacteriana antes de la microencapsulación y B es la concentración de la bacteria después de micro encapsular encontrada en el sobrenadante.

4.8 Pruebas *in vitro*.

4.8.1 Resistencia a diferentes niveles de temperatura.

Este método se basa en lo propuesto por Cai (1999). Primero, se toma una muestra de la bacteria láctica cultivada en caldo MRS durante 24 horas. Luego, se realizan pruebas de viabilidad en agar MRS durante 48 horas a 37°C, seleccionando las cajas de Petri que presenten viabilidades entre 30 y 300 UFC/150 µL y con valores de dilución de 10⁷ UFC/mL o mayores. La incubación se lleva a cabo a las temperaturas requeridas.

4.8.2 Producción de gas

Para verificar la producción de gas a partir de glucosa, se emplea caldo MRS con 5% de glucosa usando tubos Durham para verificar la presencia de gas siguiendo el método de Dahl et al. (1988).

4.8.3 Actividad de catalasa.

Se añadirá una gota de peróxido de hidrógeno sobre una gota que contenga colonias de bacterias lácticas; si se forman burbujas como resultado de la reacción, se considerará un resultado positivo, según lo indicado por González-Tello et al. (2007).

4.8.4 Crecimiento de la BAL a diferentes concentraciones de NaCl.

Las concentraciones de ácido láctico producidas por la cepa bacterianas se cuantifica siguiendo el método propuesto por Xu et al. (2020). Primero se construye una curva de calibración con patrones de ácido láctico a concentración conocida, y solución

de cloruro de hierro (0,2%) que se prepara así: Se coloca 0,3 g de cloruro de hierro en un matraz volumétrico de 100 mL y se aforará hasta la marca con agua, se agita hasta la disolución completa de la sal. Para la curva se añadirá 50 µL de cada patrón de ácido láctico a 2 mL de la solución al 0,2% de cloruro de hierro y se agita. La absorbancia se mide a 390 nm en un espectrofotómetro.

Como blanco se usa 2 mL de solución al 0,2% de cloruro de hierro. La absorbancia de las soluciones coloreadas versus las concentraciones de ácido láctico se usa para la obtención de la ecuación lineal. Cada una de las cepas se cultiva toda la noche en caldo MRS y se centrifugarán a 4500xg durante 10 min, se usa los sobrenadantes para medir la concentración de ácido láctico. El sobrenadante se diluye 10 veces con agua desionizada. El ácido láctico en cada muestra se determinará de la misma forma en la que se construyó la curva patrón de ácido láctico y cloruro de hierro. Finalmente, el tipo de ácido láctico producido L ó D se determinará mediante el uso del kit de ensayo rápido (Megazyme) para L-/D- ácido.

4.8.5 Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas.

Para evaluar la resistencia del material microencapsulado a condiciones gastrointestinales, se realizarán pruebas utilizando bilis y sales biliares bovinas (Sigma) a concentraciones de 0.3 y 1% para las sales biliares, y 0.3 y 0.5% para la bilis, a diferentes niveles de pH (3.0 para la fase gástrica, y 5.0 y 7.0 para la fase intestinal). Siguiendo las directrices de Crueger y Crueger (1993), se tomará el 10% del material microencapsulado para las determinaciones, además de las indicaciones de Bruschi y Záchia (2011), citadas por Gonzales Cuello et al. (2015). Las microcápsulas de bacterias lácticas (BAL), como *L. gasseri* y *L. plantarum* (2 g), se mezclarán con 18 mL de caldo MRS y el porcentaje correspondiente de bilis y sales biliares, ajustados a los pH correspondientes. Luego, se incubarán a 37°C durante 48 horas para permitir la liberación y establecimiento del material microencapsulado. Posteriormente, se realizará la prueba de viabilidad siguiendo el protocolo de Cai (1999), con el objetivo de determinar la viabilidad de las BAL microencapsuladas, expresada en concentraciones de al menos 10⁹ UFC/mL (Unidades

Formadoras de Colonias por mililitro).

La presencia de sales biliares y su actividad enzimática inhibe un buen porcentaje de microorganismos durante el paso por el tracto digestivo. “Con la verificación de la viabilidad de los microorganismos después de ser sometidos a diferentes concentraciones de sales biliares, se puede predecir si son resistentes a las condiciones de circulación por el tracto digestivo”, como lo señala C. Chen et al. (2024). Por otra parte, la tolerancia a pH bajo es una importante característica probiótica para la supervivencia y crecimiento de las bacterias en el tracto digestivo. Una importante propiedad de los probióticos es que pueden sobrevivir a condiciones adversas generadas en el TGI, según Pandey et al. (2015), éstos pueden resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas y a los bajos valores de pH (1.8-3.2) prevalentes en el estómago, así como también a la concentración de bilis, jugos pancreáticos y mucus presentes en el intestino delgado. La tolerancia a los diferentes niveles es medida siguiendo lo recomendado por Cai, (1999). Además, se evaluará la resistencia a la lisozima según el método descrito por Rodríguez-Gonzales (2009), en el que las cepas lácticas se exponen a diferentes concentraciones de lisozima: (i) 0.6 µL de cultivo con 0.60 µg de lisozima, (ii) 0.6 µL de cultivo con 120 µg de lisozima, y (iii) 0.6 µL de cultivo con 180 µg de lisozima. Las muestras se incubarán durante 24 horas a 37°C, y luego se inocularán en cajas Petri. Se considerarán resistentes a la lisozima aquellas muestras que presenten un crecimiento igual o superior a 300 UFC/mL.

4.8.6 Análisis de resistencia y liberación a jugos gástricos e intestinales.

Para realizar este análisis se usará el método de (Çabuk & Tellioglu Harsa, 2015), al cual se realiza las siguientes modificaciones. Primero, el jugo gástrico simulado (JGS) se preparará teniendo en cuenta el método de (Mao et al., 2019). Luego se toma la pepsina y se disuelve en solución de NaCl (0,2% p/v) llegando a una concentración de 3 g/L con un pH ajustado a 2.0 usando HCl 0,1 M para ello. Enseguida, se esterilizará filtrando el contenido a través de membrana estéril de 0,22 µm. Para el caso de los jugos intestinales simulados (JIS) se disolverá tripsina en solución de

NaCl (0,2% p/v) a una concentración de 1 g/L, a este preparado se adicionará sales biliares en concentración de 0,45% (p/v); se debe tener un pH de 8, para lo que se usará NaOH al 0,1 M.

La viabilidad de la cepa probiótica microencapsulada se evalúa en cada uno de los dos jugos simulados. 1,0 g de la cepa probiótica microencapsulada se suspende en 9,0 mL de solución de sal estéril JGS y se incuba a 37 °C bajo agitación orbital a 160 rpm durante 3 h. Después de la incubación, se extrae la muestra de la solución y se calcula el porcentaje de supervivencia acorde a la (Çabuk & Telliöğlu Harsa, 2015).

$$\text{Tasa de supervivencia (\%)} = \left(\frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \right) \times 100$$

Donde N_1 es el número de células viables en microcápsulas después del tratamiento con JGS y N_0 es el número de células viables en microcápsulas antes del tratamiento con JGS.

Para los JIS se suspende 1,0 g de bacterias microencapsuladas en 9,0 mL de jugo intestinal simulado y se incuba a 37 °C bajo agitación orbital a 160 rpm durante 24 h. Se toma muestras a 1, 2, 4, 6, 10, 12 y 24 h y se enumera las bacterias viables en JIS por recuento en placa. La tasa de liberación (%) se calcula de acuerdo con la ecuación.

$$\text{Tasa de liberación (\%)} = \left(\frac{\log UFC N_1}{\log UFC N_0} \right) \times 100$$

Donde N_1 es el número de células viables liberadas de las microcápsulas en JIS y N_0 es el número de células viables en microcápsulas agregadas a JIS.

La cinética para la tasa de liberación de la cepa probiótica microencapsulada se modela como la población de células viables liberadas de las microencapsuladas en función del tiempo de exposición a los JIS. Las muestras recolectadas en el lapso de 1 a 24 h se diluyen en 9 mL de agua de peptona estéril (0,2%, w/v). Se toma 1 mL de la suspensión celular y se siembra por profundidad en placa de agar MRS, el recuento de células viables se hará como se describió previamente en el ítem de recuento

de células viables y se expresa como UFC/mL de JIS. Con la ecuación mostrada a continuación se determina el orden de la cinética de liberación de la cepa probiótica de las microcapsulas (Ağçam et al., 2018). Después de determinado el orden de la cinética se aplica el modelo correspondiente y se estima la tasa de liberación en los JIS.

$$\ln\left(-\frac{d[A_0]}{dt}\right) = \ln k + n_c \ln([A_0])$$

Donde: n_c es el orden de la tasa de liberación y $[A]$ es la viabilidad de la cepa probiótica expresada como UFC/g, k es la tasa de liberación (Perry's & Perry's, 1999).

4.8.7 Verificación de producción de exopolisacáridos (EPS)

Para esta determinación se inocula la bacteria láctica en un medio de cultivo (Caldo MRS + sacarosa 5%) por 24 h a 37°C. Posteriormente, de acuerdo a lo descrito por Elinalva et al. (2012), se utilizan discos de papel de filtro estéril (5 mm) impregnados con 5 µL de cultivo láctico en placas Petri con agar MRS para observar la producción de EPS (Guimarães et al., 1999). El ensayo se realiza bajo las siguientes condiciones tales como, diferentes niveles de pH ($6,0 \pm 0,2$ ó $7,5 \pm 0,2$) y la temperatura (28 ± 2 °C, 35 ± 2 °C y 42 ± 2 °C), y las muestras se incubarán durante 7 días, con 48 horas a las temperaturas correspondientes. Al finalizar la incubación, la producción de EPS se evaluará observando la formación de una colonia mucoide alrededor de los discos. Además, se confirmará la producción de este biopolímero mezclando una porción de la sustancia mucoide con 2 mL de alcohol absoluto; si ocurre una precipitación, se confirmará la presencia de EPS (Fajardo, I. 2022).

Adicionalmente de acuerdo con lo propuesto por Vallejo et al. (2018), la producción de exopolisacáridos (EPS) de las cepas se evalúa de manera cualitativa en agar cerebro-corazón (BHI) adicionado con sacarosa 50 g/L y 0.8 g/L de rojo Congo. Posteriormente se lleva a incubación a 37°C durante 24 h y el resultado se interpretará como positivo cuando se observen colonias de color negro.

4.8.8 Detección de capacidad amilolítica.

Métodos

4.8.8.1 Hidrolisis puntual del almidón.

Para evaluar la actividad amilolítica del microorganismo, se inocula con asa de punta, una colonia por punción puntual en el centro de un plato de Agar MRS almidón (Soluble, Prolabo) 20 g/L. Incube a 30 °C por 72 h.

Se revela la hidrolisis del almidón con la exposición de las cajas de cultivo sólido a vapores de todo bisublimado. El yodo al reaccionar con el almidón varía su color a un complejo café-azulado dejando visualizar ampliamente las zonas o halos de hidrólisis de algodón. Tenga la precaución de no respirar los vapores ya que estos son tóxicos.

4.8.9 Ensayo de antagonismo bacterial

Mediante pruebas de antagonismo se puede demostrar que los microorganismos probióticos son totalmente viables para ejercer su acción inhibitoria del crecimiento cuando son cocultivados simultáneamente con enteropatógenos *in vitro*. Para probar el efecto antagónico se pueden utilizar dos métodos.

El ensayo de Tagg et al. (1976), o de los micropocillos. Este detecta la inhibición del crecimiento de una cepa indicadora, pasiva, causada por la cepa examinada, activada.

El ensayo de Visser et al. (1986), utiliza discos de agar con la cepa examinada inoculados invertidos sobre la cepa indicadora de inhibición tabla 8.

Tabla 8. Bacterias Indicadoras de Inhibición

Microorganismos	Fuente
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC *
<i>Vibrio cholerae</i>	INS **
<i>Shigella boydii</i>	INS **
<i>Escherichia coli</i>	INS **

*ATCC: American Type Culture Collection

**INS: Instituto Nacional de Salud-Colombia

La variante del método de Tagg et al. (1976), consiste en sembrar el fermento láctico de final de fase logarítmica, en pozos de 7 mm de diámetro, sellado en su fondo hechos en puntos de MRS (Difco, Laboratories). En cada uno de los pozos se toma 50 µL y se lleva a incubación a 30 °C por 1 h. Inmediatamente después cubra con una capa de agar tripticasa de soya con la cepa indicadora, preparada adicionando 0.25 mL de un caldo de 12 h de incubación previa, a 10 mL del agar. La mezcla a 40°C se vierte suavemente sobre las cajas de agar MRS con los pozos previamente inoculados e incubados. Todo lo anterior se lleva a incubación a 30 °C por 24 h en un ambiente aeróbico para permitir el crecimiento de ambas cepas. Utilice tripticasa de soya agar para las cepas indicadoras, a excepción de *V. cholerae*, bacteria que se cultiva en su respectivo medio selectivo. (Ver tabla 9).

Tabla 9. Microorganismos y sus medios de cultivo.

Bacterias	Medios de cultivo
<i>Salmonella typhimurium</i>	Todd Hewitt (BBL) TSA (BBL) Hecktoen (Merck)
<i>Shigella boydii</i>	Todd Hewitt TSA Hecktoen

<i>Yersinia enterocolitica</i>	Todd Hewitt TSA Hecktoen
<i>Escherichia coli</i>	Todd Hewitt (BBL) TSA (BBL)

Manual de Microbiología Clínica. Instituto Nacional de Salud. Colombia (2010)

4.8.10 Capacidad de adherencia al epitelio intestinal – ensayos *Ex Vivo*.

Se usa un modelo *Ex Vivo* siguiendo la metodología descrita por (Serna-Cock et al., 2018), utilizando biomasa lavada procedente de las cepas seleccionadas, y explantes de duodeno, yeyuno e íleon. Los explantes se obtienen de los animales a evaluar en los ensayos.

Las cepas con actividad antimicrobiana se propagarán dos veces en 10 mL de caldo MRS (37 °C, 12 h). Para obtener la biomasa lavada, cada fermentado se centrifugará a 4000 rpm, 10 min, y 4°C, se descarta el sobrenadante, la biomasa se lavará con 5 mL de solución salina (NaCl al 0,9%), se agita en vórtex, y se centrifuga nuevamente a 4000 rpm, 10 min, y 4 °C. Este proceso se realiza por duplicado. Finalmente, cada biomasa se resuspenderá en PBS, ajustando la concentración de biomasa a 1×10^9 microorganismos/mL (Fajardo, I. 2022).

Para obtener los explantes los animales deberán ser sacrificados con el fin de obtener de la manera más aséptica su sistema digestivo. Posteriormente, con base al protocolo descrito por (Maidana et al., 2017), se toma secciones de 5 cm del duodeno, yeyuno e íleon de cada animal, que se suspenden en PBS a 4 °C durante 30 min. Las secciones de tejido se lavan una vez con alcohol antiséptico al 70% y dos más con solución salina. Finalmente, a cada explante se le adiciona PBS para su posterior uso. De cada explante se toma submuestras de tejido de 8 mm² que se sumergirán en soluciones de PBS que contienen las biomasa resuspendidas de cada una de las cepas crioconservadas. Como tratamientos control se sumergirán los explantes en soluciones de PBS sin adición de biomasa bacteriana. Las muestras

de tejido se incuban a 37 °C durante 2 h; posteriormente, cada muestra se lava cinco veces por inmersión en solución estéril PBS. Finalmente, se realiza por triplicado el recuento de las células adheridas mediante diluciones. El porcentaje de adhesión de cada cepa (%Ad), a los explantes se calcula utilizando la siguiente ecuación (Serna-Cock et al., 2018).

$$\%Ad = \left(\frac{\text{Log concentración bacteriana final}}{\text{Log concentración inicial bacteriana}} \right) \times 100$$

4.8.11 Evaluación in vivo

4.8.11.1 Inclusión y viabilidad en la ración de *Lactobacillus* sin microencapsular.

Inicialmente se realizará un ajuste del inóculo de *Lactobacillus casei* (siguiendo el procedimiento previamente descrito).

Posteriormente, el inóculo será adicionado por aspersión sobre el alimento balanceado, el cual se distribuirá de manera homogénea en bandejas y se incubará a 37 °C durante 30 minutos para su secado. Luego, el alimento será empacado en bolsas al vacío con el fin de minimizar su deterioro (Ver figura 53). Se trabajará con una cantidad de inóculo probiótico adicionado (relación v/p) del 20%, conforme a lo recomendado por Ramírez (2005).

Figura 53. Aspersión del concentrado e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con *L. casei*.



4.8.11.2 Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración.

Una vez microencapsulado, el probiótico se suministrara en la ración diaria de los pollos, mezclado de manera homogénea en

una porción de alimento de la primera comida de la mañana en una cantidad de 2 gramos por comedero (7 pollitos), con el fin de que sea consumido en su totalidad y garantizar que no se humedezca el preparado (figura 54).

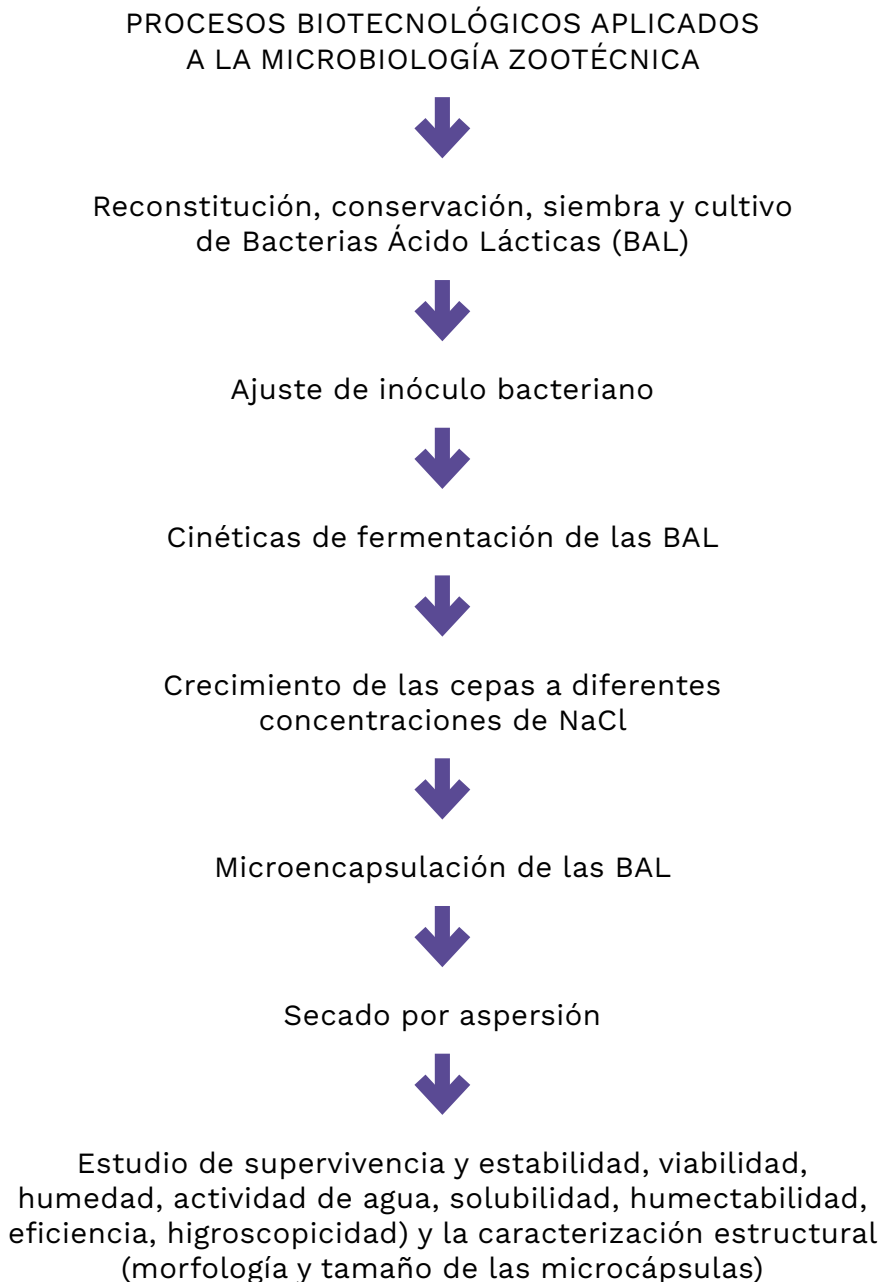
Figura 54. Microencapsulado de Lactobacillus.



4.8.12 Simulación *in vitro* del tránsito gastrointestinal.

Este procedimiento se realiza con el fin de simular el paso de la bacteria a través del tracto gastrointestinal de un mamífero no rumiantes, para ellos se toma 1 g de la bacteria liofilizada que se coloca en un tubo de ensayo que contiene 10 mL de jugo gástrico simulado (3 g/L pepsina en una solución de cloruro de sodio 0.5 % p/v a pH 2 ajustado con HCl), el preparado se lleva a incubación a 37°C durante 240 min (Brusch y Záchia, 2011). Al finalizar, se toma una muestra del preparado y se inocula varias cajas de Petri con agar MRS y se lleva a incubación por 24 ha a 37°C, luego se realiza conteo de recuento en placa para determinar el crecimiento. Para el segundo paso que es la simulación de sales biliares y bilis, una muestra neutralizada del procedimiento anterior se incuba en caldo MRS durante 24 y 48 horas probando concentraciones de 0,5 ,1 y 3 % de sales biliares p/v, utilizando bilis bovina (Sigma), para finalmente efectuar la prueba de viabilidad como en el caso anterior (Cai, 1999).

Flujograma





Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas y
Verificación de producción de exopolisacáridos (EPS)



Capacidad de adherencia al epitelio intestinal –
ensayos *Ex Vivo* y Cultivos Celulares CaC02



Evaluación *In vivo* y en matrices alimenticias

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 4.

Procesos biotecnológicos aplicados a la Microbiología Zootécnica

Es importante obtener bacterias puras, para lo cual se recurre a laboratorios certificados, para garantizar la pureza de las mismas. En muchas ocasiones los investigadores utilizan la referencia ATCC (American Type Culture Collection), aunque se debe aclarar que no es la única. También, se debe tener en cuenta, los ajustes de inóculo bacteriano para determinar la concentración bacteriana, las cinéticas de fermentación, los procesos de microencapsulación por técnicas como el secado por aspersion, así como, el uso de herramientas como la microscopía electrónica de barrido y de transmisión.

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA**

CAPÍTULO 5.

**Microbiología de alimentos
balanceados y el agua**



5.1 Microbiología de alimentos balanceados

Para el desarrollo de esta sección se toma información de los autores Uribe, A. et al.,(2012), en donde afirma que es importante

Es importante para un adecuado análisis microbiológico de un alimento balanceado tener en cuenta los siguientes aspectos:

- Mesófilos aerobios.
- Mohos y levaduras.
- Coliformes totales y fecales.
- Esporas de *Clostridium* sulfito reductor.
- Presencia o ausencia de *Salmonella* sp. y *Clostridium perfringens*.

Los valores encontrados en cada uno de estos análisis se deben comparar con los parámetros dados por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) (1999), es este aspecto, se señala que el valor máximo permitido para cada uno de los microorganismos son los siguientes:

» Recuento de Mesófilos Aerobios:	50 x 10 ³ UFC/ml.
» Recuentos de Coliformes totales:	10 x 10 ² .
» Determinación <i>Escherichia coli</i> :	Negativo.
» Recuento de esporas sulfito reductor:	cero.
» Determinación de <i>Salmonella</i> sp.:	Negativo.
» Recuento de Mohos y Levaduras:	50 x 10 ² .
» Recuento de <i>Clostridium</i> sulfito reductor:	10x10 ¹ .
» Determinación de <i>Clostridium perfringens</i> :	Negativo (Uribe, A. et al., 2012).

Procedimiento

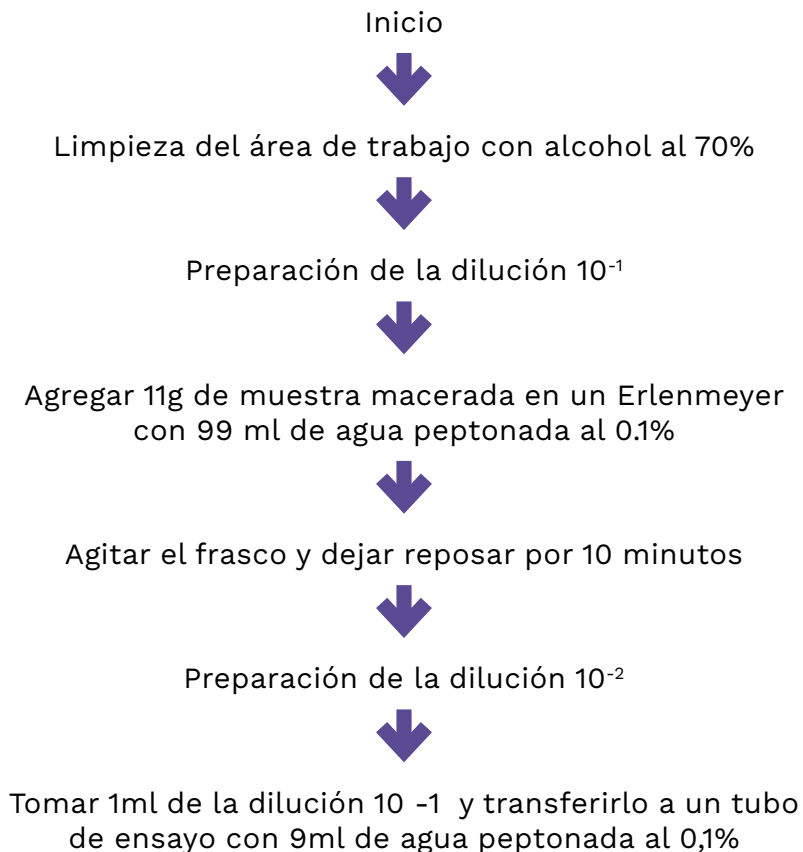
Preparación y dilución de las muestras

- Limpiar con alcohol al 70% el área donde se extraerá la muestra.
- Realizar la dilución 10⁻¹ de las muestras según el criterio es-

tablecido para cada una.

- Para las muestras líquidas, preparar la dilución 10^{-1} agregando 11 g de la muestra macerada y mezclada en un frasco Erlenmeyer con 99 mL de agua peptonada al 0,1%.
- Agitar el frasco y dejar reposar durante 10 minutos.
- Para la dilución 10^{-2} , transferir 1 mL de la dilución 10^{-1} a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1%. Agitar con cuidado para evitar derrames.
- Para la dilución 10^{-3} , transferir 1 mL de la dilución 10^{-2} a otro tubo con 9 mL de agua peptonada.

Flujograma: Preparación y dilución de las muestras (Uribe, A. et al., 2012)





Agitar con cuidado



Fin

Recuento de Esporas *Clostridium* Sulfito Reductor

- **Preparación de la muestra y diluciones correspondientes**
- Pipetear 1 mL de cada dilución en tubos estériles.
- Calentar los tubos con las diluciones a 80°C durante 10 minutos y enfriar rápidamente bajo agua corriente.
- Añadir 10 ± 2 mL de agar SPS (Agar Sulfito Ciclosenina).
- Verter la segunda capa de agar SPS. • Incubar a 35°C durante 72 horas.
- Observar diariamente los tubos para detectar la formación de color negro (indicativo de presencia de H₂S).
- Realizar la lectura de los tubos que presenten entre 5 y 50 colonias negras.
- Calcular el número total de colonias.

Flujograma: Recuento de Esporas *Clostridium* Sulfito Reductor



Recuento de esporas *Clostridium* sulfito reductor



Preparación de la muestra y diluciones correspondientes (Uribe, A. et al, 2012)



Pipetear 1ml de cada dilución en tubos estériles



Calentar los tubos con las diluciones a 80°C durante 10 minutos y enfriar rápidamente bajo agua corriente



Verter la segunda capa de agar SPS



Incubar a 35°C durante 72 horas



Observar diariamente los tubos para detectar la formación de color negro (Indicativo de presencia de H₂S)



Realizar la lectura de los tubos que presenten entre 5 y 50 colonias meggras



Calcular el número total de colonias

- **Recuento de *Clostridium perfringens***
- Preparar la muestra y realizar las diluciones correspondientes.
- Pipetear 1 mL de cada dilución en cajas de Petri por duplicado.
- Añadir 15 mL de agar SPS y mezclar como se indicó.
- Colocar las cajas de Petri en una cámara anaeróbica.
- Incubar a 35°C durante 48 horas.

Flujograma: Recuento de *Clostridium perfringens* (Barbosa, A.2019):



Recuento de *Clostridium perfringens* (Barbosa, A. 2019)



Preparar la muestra y realizar las diluciones correspondientes



Pipetear 1ml de cada dilución en cajas de Petri por duplicado



Añadir 15ml de agar SPS y mezclar como se indica



Colocar las cajas de Petri en una cámara anaeróbica



Incubar a 35°C durante 48 horas

5.2 Microbiología del agua

Los análisis microbiológicos se deben efectuar teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones Bartley et al. (2019):

- Coliformes totales y fecales según la Norma Técnica Colombiana NTC 4939 (sustrato enzimático - NMP).
- *Pseudomonas aeruginosa* según la Norma Técnica Colombiana NTC 4949 (sustrato enzimático - NMP).

Para la determinación de coliformes totales y fecales se utilizará la siguiente metodología: Se empleará el medio de cultivo caldo fluorocult, el cual permite identificar ambos grupos de microorganismos en 24 horas. Este medio se caracteriza por contener dos sustratos: el X-Gal, que reacciona específicamente

con la enzima β -D glucoronidasa, propia de los coliformes totales, y el fluorogénico MUG, que reacciona con la enzima β -D galactosidasa, característica de *E. coli*, generando un compuesto fluorescente bajo luz ultravioleta a 366 nm. Además, el medio contiene triptófano para realizar la prueba de indol, a la cual se le añade 0.5 mL del reactivo de Kovac's.

Para la determinación de *Pseudomonas aeruginosa* se tendrá en cuenta la siguiente metodología: En el caso de la prueba presuntiva se puede usar Caldo Asparragina (doble y simple concentración), y de igual manera, que la técnica para coliformes. Se realiza una incubación a 36°C/48 horas (Bartley et al., 2019). Las correspondientes lecturas se harán en espectrofotómetro a 357 nm (positivos, los tubos que presenten pigmento verde o fluorescencia).

Luego, se realizará siembra por estrías del contenido de los tubos positivos de la prueba presuntiva en Agar Cetrimida (41,5°C durante 24 horas). Se seleccionarán las colonias típicas (de color verde azulado y fluorescentes bajo luz UV) y se transferirán a placas de Petri con Agar Tripticosa de Soya (TSA), incubándose a 35°C durante 24 horas (Bartley et al., 2019).

En la fase final, se realizarán evaluaciones enzimáticas para catalasa y oxidasa, seleccionándose aquellas colonias que muestren reactividad positiva en ambos ensayos. Sobre las cepas que exhiban actividad enzimática positiva, se ejecutarán pruebas bioquímicas adicionales, incluyendo:

- Capacidad de desarrollo en rangos térmicos de 4°C a 41,5°C.
- Metabolismo de nitratos (prueba de reducción).
- Síntesis de piocianina como marcador metabólico.

Luego, para las cepas que cumplan con estos criterios, se utilizará el método del Número Más Probable (NMP) para determinar la densidad de *Pseudomonas aeruginosa* en la muestra, expresando la concentración como NMP por cada 100 ml.

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 5.

Microbiología de alimentos balanceados y agua

El control microbiológico en los alimentos balanceados y el agua es fundamental para garantizar la seguridad, la calidad y la inocuidad en los procesos productivos, especialmente en la industria alimentaria y pecuaria. Este control permite prevenir la proliferación de microorganismos patógenos que pueden afectar la salud animal y, por extensión, la salud humana a través de la cadena alimentaria. Además, contribuye a mantener la eficiencia nutricional de los alimentos y la pureza del agua, evitando pérdidas económicas y mejorando la productividad. Implementar prácticas rigurosas de control microbiológico no solo es una medida preventiva, sino una responsabilidad esencial para proteger la salud pública y asegurar la sostenibilidad de los sistemas de producción.

CAPÍTULO 6.

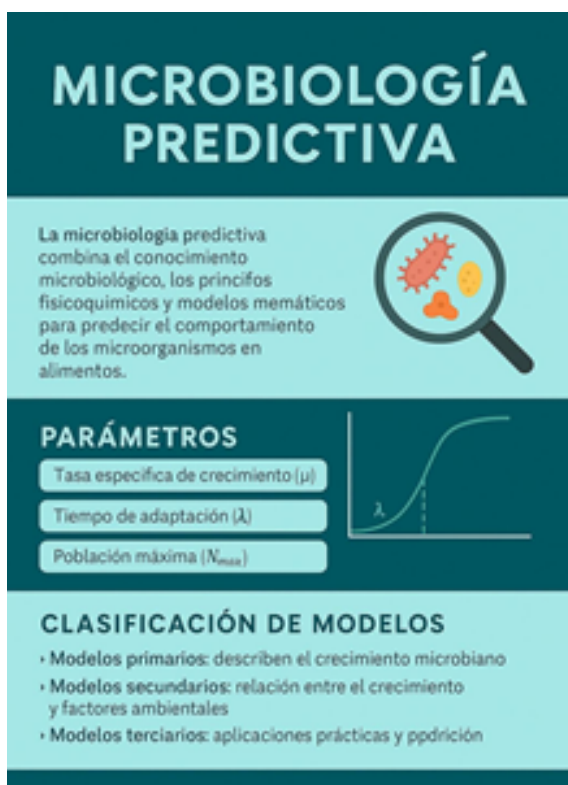
Microbiología predictiva



Introducción a la Microbiología Predictiva

La microbiología predictiva es una disciplina que combina los principios de la microbiología, la estadística y la modelización matemática para predecir el comportamiento microbiano en los alimentos. Esta rama de la ciencia ha adquirido una importancia significativa en los últimos años debido a la necesidad de garantizar la seguridad alimentaria y prolongar la vida útil de los productos de origen animal, manteniendo su calidad (Łobacz et al., 2022) (Ver figura 55).

Figura 55. Microbiología predictiva



6.1. Conceptos Clave

La microbiología predictiva utiliza modelos matemáticos para conocer el desarrollo poblacional de microorganismos importantes para la seguridad alimentaria; ésto lo realiza bajo diferentes situaciones ambientales y distintos tipos de alimentos. La creación de modelos ayuda a predecir parámetros como: la velocidad de crecimiento, la inactivación y la supervivencia de los microorganismos; para ello tiene en cuenta las variables temperatura, pH, actividad del agua (AW), entre otros (Koseki et al., 2021).

De acuerdo con Baranyi *et al.* (2024): la microbiología predictiva tiene como elemento importante el modelo matemático. Al respecto, los modelos son considerados representaciones más simples de la realidad que se estudia, para ello, busca la relación entre distintas variables. Como se mencionó anteriormente los modelos pueden ser de diferentes tipos, entre los que podemos encontrar:

- **Modelos empíricos.** Basados en la observación directa de los datos experimentales. Estos modelos describen las relaciones entre las variables sin necesariamente comprender los mecanismos subyacentes.
- **Modelos Mecanísticos.** Basados en el conocimiento de los mecanismos biológicos y fisicoquímicos que afectan el crecimiento microbiano. Estos modelos intentan representar la realidad de una manera más detallada y precisa.
- **Modelos Probabilísticos.** Utilizan principios estadísticos para describir la variabilidad y la incertidumbre inherente en los procesos microbianos. Estos modelos son útiles para evaluar el riesgo y la seguridad alimentaria.
- **Parámetro de crecimiento microbiano.** Los parámetros comunes utilizados en la microbiología predictiva incluyen la tasa de crecimiento específico (μ), que describe la velocidad a la que una población microbiana aumenta; el tiempo de lag (λ), que es el periodo de adaptación antes de que comience el crecimiento

exponencial; y la población máxima (N_{max}), que es el límite superior al que puede llegar la población microbiana en un entorno dado (Eren & Banfield, 2024).

6.1.1 Importancia en la Seguridad Alimentaria

La seguridad alimentaria es un tema que nos afecta a todos, y la microbiología predictiva juega un papel clave en su gestión. Los microorganismos presentes en los alimentos pueden producir toxinas, causar enfermedades y deteriorar los productos, por lo que es fundamental anticipar cómo las condiciones de almacenamiento y procesamiento pueden influir en su desarrollo (Baranyi et al., 2024).

Uno de los usos más importantes de la microbiología predictiva es ayudar a determinar la vida útil de los alimentos. Para los fabricantes, es crucial saber cuánto tiempo un producto puede mantenerse seguro y en buen estado antes de volverse inapropiado para el consumo. Gracias a modelos predictivos, es posible estimar esta duración bajo distintas condiciones, lo que permite a las empresas optimizar sus procesos y reducir el desperdicio de alimentos (Katsini et al., 2022).

Además, esta disciplina es esencial para evaluar riesgos en la industria alimentaria. Los modelos predictivos pueden analizar la posibilidad de que patógenos como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* se multipliquen en ciertos alimentos y condiciones de almacenamiento. Con esta información, los fabricantes y las autoridades reguladoras pueden tomar decisiones informadas sobre qué medidas implementar para minimizar los riesgos de enfermedades transmitidas por alimentos (Katsini et al., 2022).

La microbiología predictiva también contribuye a mejorar los procesos de conservación. Por ejemplo, permite diseñar tratamientos térmicos que eliminan microorganismos peligrosos sin comprometer el sabor, la textura o el valor nutricional de los alimentos. Así, esta herramienta no solo protege nuestra salud, sino que también asegura que los productos sigan siendo atractivos y de calidad.

6.1.2 Aplicación Práctica en la Industria Alimentaria

En el día a día de la industria alimentaria, la microbiología predictiva se ha vuelto una aliada indispensable, ayudando en diversas etapas de la producción y distribución de alimentos. De acuerdo con Srivastava (2024), se explica algunas de las aplicaciones más destacadas:

Diseño de nuevos productos. Cuando se desarrollan alimentos innovadores, los modelos predictivos permiten anticipar posibles riesgos microbiológicos antes de que lleguen al mercado. Esto es especialmente útil para productos que incorporan ingredientes o procesos poco tradicionales, garantizando su seguridad desde el principio.

Control de calidad. Durante la fabricación, estos modelos ayudan a los productores a ajustar parámetros para asegurar que los alimentos cumplan con los estándares de calidad y seguridad. Por ejemplo, se pueden optimizar las condiciones de almacenamiento o los tratamientos térmicos para prolongar la vida útil sin poner en riesgo la salud de los consumidores.

Reacción rápida ante brotes. En caso de que ocurra un brote de enfermedad relacionada con alimentos, la microbiología predictiva puede ser clave para identificar el origen del problema y anticipar su posible propagación. Esto facilita tomar medidas rápidas y efectivas para proteger la salud pública.

Evaluación de métodos de conservación. Cuando se trata de conservar alimentos, esta herramienta resulta fundamental para analizar qué tan efectivas son distintas estrategias, como refrigeración, pasteurización o envasado con atmósferas modificadas. Los modelos permiten prever cómo estas técnicas combinadas impactan en la supervivencia de microorganismos, asegurando un equilibrio entre seguridad y calidad.

6.2 Modelos Predictivos en Microbiología de Alimentos

La microbiología predictiva se fundamenta en el uso de modelos matemáticos para predecir el comportamiento de microorganismos en alimentos bajo diversas condiciones. Estos modelos son herramientas esenciales para la industria alimentaria, permitiendo anticipar el crecimiento, la inactivación, y la supervivencia de microorganismos en función de factores como la temperatura, el pH, la actividad de agua (a_w), y la presencia de conservantes.

6.2.1. Tipos de Modelos Predictivos

Existen varios tipos de modelos predictivos en microbiología de alimentos, actualmente los modelos se pueden clasificar principalmente en: Primarios, secundarios y terciarios (ver tabla 10).

6.2.1.1. Los modelos primarios. Al respecto, Martínez-García (2016), en microbiología predictiva son herramientas básicas que describen cómo varía el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en función del tiempo bajo diferentes condiciones experimentales. Su propósito principal es determinar la dinámica de crecimiento de los microorganismos utilizando el menor número posible de parámetros, lo que permite evitar cálculos complejos que puedan comprometer la precisión. Estos modelos proporcionan información esencial sobre las características de los microorganismos estudiados, como el tiempo de generación (t_0), la duración de la fase de adaptación o latencia (λ), la velocidad máxima de crecimiento (μ_{Max}) y el momento en que inicia la producción de toxinas. Entre los enfoques más comunes para desarrollar estos modelos se encuentran la ecuación de Gompertz y la ecuación de Baranyi, ampliamente utilizadas por su capacidad para describir las curvas de crecimiento microbiano.

6.2.1.2. Los modelos secundarios. García y Zurera (2004), mencionan que los modelos secundarios consisten en ecuaciones diseñadas para explicar cómo los parámetros de los modelos primarios, como la tasa de crecimiento o la duración de la fase de adaptación, varían en función de uno o más factores am-

bientales, como temperatura, pH, actividad de agua (aw) o composición de la atmósfera gaseosa. Ejemplos comunes incluyen ecuaciones basadas en la fórmula de Arrhenius o el modelo de la raíz cuadrada (Skinner et al., 1994), especialmente cuando la temperatura es el principal factor que regula el crecimiento. Estos modelos han sido adaptados para considerar otros factores como el pH y la actividad de agua. Además, si se incorporan variables adicionales, como la concentración de ácidos orgánicos o nitritos, se pueden emplear ecuaciones de regresión polinómicas. Estas últimas son altamente flexibles al incluir términos cuadráticos, cúbicos e interacciones, aunque presentan una menor capacidad para interpretar mecanismos biológicos en comparación con los modelos anteriores.

6.2.1.3. Los modelos terciarios. Para este grupo, también Martínez-García (2016), menciona que, los modelos terciarios consisten en la integración de uno o más modelos primarios y secundarios en herramientas informáticas diseñadas para el usuario final. Estas aplicaciones simplifican el uso de ecuaciones matemáticas, facilitando su implementación práctica. En la actualidad, existen diversos paquetes de software dedicados a la modelización microbiana, que van desde hojas de cálculo con ecuaciones simples hasta sistemas expertos y programas avanzados para simulación y estimación de riesgos. Una ventaja significativa es que los usuarios no requieren conocimientos avanzados en técnicas de modelización predictiva, lo que convierte a la microbiología predictiva en una herramienta accesible y potente para investigadores y profesionales de la industria alimentaria.

Tabla 10. Clasificación Modelos predictivos

Modelos Primarios	Modelos Secundarios	Modelos Terciarios
Función de Gompertz	Modelo Belehradek (Modelo de Raíz Cuadrada)	PMP USDA
Gompertz Modificada	Modelo Ratkowsky (Modelo de Raíz Cuadrada)	Micromodelo de Alimentos
Modelo Logístico	Modelo de Arrhenius	Predicor de Pseudomonas
Modelo Baranyi	Modelo Modificado de Arrhenius (Davey o Schoolfield)	Sistema Experto
Modelo de Primer Orden	Modelos Probabilísticos	
Modelo de Primer Orden Modificado	Valores Z	
Valores D de Inactivación Térmica	Polinomiales o Respuesta	
Modelo de Declinación de Crecimiento de Whiting y Cygnarowicz	Modelos de Superficie	
Modelo Lineal de Tres Fases	Modelo de William-Landel Ferry	

Fuente: Baranyi et al. (2024)

6.3. Desarrollo y Validación de Modelos Predictivos

Al respecto, Baranyi et al. (2024), plantea que el desarrollo y validación de modelos predictivos en microbiología de alimentos es una actividad esencial para mejorar la seguridad alimentaria. Estos modelos proporcionan herramientas que permiten estimar el comportamiento microbiano bajo diversas condiciones

ambientales y de procesamiento, ayudando a prevenir la proliferación de patógenos y el deterioro de los alimentos. Este capítulo se centrará en los pasos involucrados en la creación de modelos predictivos y los métodos para validar su precisión y aplicabilidad en la industria alimentaria.

6.4. Fundamentos del Desarrollo de Modelos Predictivos

El desarrollo de un modelo predictivo comienza con la comprensión profunda de los principios biológicos que rigen el crecimiento, inactivación o supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Se deben tener en cuenta una serie de factores intrínsecos (pH, actividad de agua, nutrientes) y extrínsecos (temperatura, atmósfera de almacenamiento) que afectan la dinámica microbiana (Srivastava, 2024).

6.4.1. Recolección de Datos Experimentales

La recolección de datos precisos y relevantes es el primer paso en el desarrollo de modelos predictivos. Estos datos deben reflejar las condiciones bajo las cuales se espera que el modelo sea aplicado (Pérez-Rodríguez et al., 2013).

- **Diseño experimental:** Un diseño experimental sólido es fundamental para generar datos fiables. Esto incluye la selección de condiciones experimentales representativas de situaciones reales de procesamiento y almacenamiento.
- **Variables a monitorear:** Es importante identificar y medir las variables críticas que afectan el crecimiento o inactivación microbiana, como temperatura, pH, actividad de agua, y la presencia de conservantes o competidores microbianos.
- **Replicación:** La replicación de los experimentos es esencial para asegurar la reproducibilidad y precisión de los datos, lo que aumenta la confiabilidad del modelo final.

Los datos recolectados se utilizan para construir y ajustar los modelos matemáticos que describen el comportamiento microbiano bajo diferentes condiciones.

6.5. Construcción de Modelos Primarios

Los modelos primarios describen cómo cambian las poblaciones microbianas en función del tiempo bajo condiciones constantes. Estos modelos son la base para predecir el comportamiento microbiano en escenarios específicos.

6.5.1. Curvas de Crecimiento Microbiano

Como lo indica Kumar et al. (2024), El crecimiento microbiano suele seguir una curva sigmoidea, caracterizada por varias fases:

- **Fase lag:** Es el período de adaptación de los microorganismos al nuevo entorno. La duración de esta fase depende de factores como la temperatura y la disponibilidad de nutrientes.
- **Fase exponencial:** En esta fase, los microorganismos se multiplican rápidamente, y la tasa de crecimiento es máxima y constante.
- **Fase estacionaria:** En esta fase, la tasa de crecimiento disminuye debido a la limitación de nutrientes y la acumulación de productos de desecho.
- **Fase de muerte:** Finalmente, la población microbiana disminuye a medida que las condiciones se vuelven insostenibles para el crecimiento.

Modelos matemáticos como el modelo de Gompertz modificado o el modelo de Baranyi son comúnmente empleados para describir estas etapas del crecimiento.

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 6.

Microbiología Predictiva

La microbiología predictiva se ha convertido en una herramienta clave para garantizar la seguridad de los alimentos que se consume, esta área combina conocimientos de microbiología, principios de química y procesos matemáticos, que permiten anticipar el comportamiento de bacterias en distintos tipos de alimentos. Para ello, realiza análisis de parámetros de interés como velocidad de crecimiento microbiano, tiempo de adaptación al medio, fase exponencial, entre otros. Con la anterior información se crea modelos que permite estudiar el comportamiento microbiano desde diferentes enfoques, lo que facilita la toma de decisiones informadas en cada etapa del proceso productivo, desde el diseño del alimento hasta su almacenamiento y distribución. Además, la construcción de modelos predictivos con datos experimentales confiables y validados, ha permitido un mayor alcance de estas herramientas a profesionales desarrollados son intuitivos y fáciles de usar. De esta manera, se aporta de manera importante al consumidor y toda la cadena de procesamiento de los alimentos.

CAPÍTULO 7.

Cultivos Celulares



El cultivo celular es un proceso en el que se cultivan células (ya sean procariotas, eucariotas o vegetales) en condiciones controladas, el término "cultivo celular" se utiliza para describir el cultivo de células aisladas de eucariotas multicelulares, especialmente células animales. Los cultivos celulares se definen como un sistema compuesto por células de un órgano o tejido, ya sea normal o tumoral, que se mantienen en medios de cultivo con una composición química específica y bajo condiciones controladas de temperatura, pH, aireación y humedad. Esto garantiza su supervivencia y multiplicación, preservando sus funciones metabólicas de manera similar a como se comportaban en el organismo original (Bi et al., 2023).

7.1 Ventajas del cultivo celular

De acuerdo con Bi et al. (2023), las principales ventajas del cultivo celular son las siguientes:

- 1. Control del entorno:** El cultivo celular posibilita un control exacto de las condiciones físico-químicas (pH, temperatura, presión osmótica, concentración de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂)), así como de las condiciones fisiológicas, las cuales deben permanecer estables para garantizar el desarrollo adecuado de las célula.
- 2. Uso de suplementos:** Muchas líneas celulares requieren suplementos en el medio de cultivo, como el suero, que aporta hormonas y otras sustancias reguladoras esenciales para su crecimiento.
- 3. Eficiencia en el uso de reactivos:** Los cultivos celulares permiten la aplicación de concentraciones bajas y específicas de reactivos, lo que facilita un acceso directo a las células y reduce el uso de reactivos en un 90% en comparación con la inyección in vivo. Esto minimiza la necesidad de administrar, excretar y distribuir los reactivos en los tejidos del organismo.
- 4. Consideraciones éticas y económicas:** Aunque los estudios in vivo pueden ser más económicos en algunos casos, los

aspectos legales, morales y éticos relacionados con el uso de animales en experimentación a menudo hacen que los cultivos celulares sean una opción preferible. Por otra parte, con los cultivos se puede estudiar el transporte y uso de metabolitos de manera más controlada.

7.2 Desventajas del cultivo celular

Al respecto, Bi et al. (2023) mencionan que las técnicas de cultivo celular presentan varias desventajas:

- 1. Requisitos de asepsia estrictos.** Las células animales crecen más lentamente que otros microorganismos con las levaduras, las bacterias y los hongos, por lo que es fundamental mantener condiciones de asepsia rigurosas para evitar contaminaciones.
- 2. Necesidad de suplementos.** Las células animales necesitan medios más complejos a los cultivos básicos, esto hace que sea necesario añadir diferentes suplementos, entre los que se tienen fluidos intersticiales, plasma y sueros intersticiales para crear un entorno lo más parecido posible al que tendrían en un organismo vivo.
- 3. Altos costos y esfuerzo.** La producción de células en cultivo requiere una inversión significativa de esfuerzo y recursos. Los costos asociados con el cultivo celular pueden ser diez veces mayores que los del uso de tejido animal, debido a la necesidad de realizar numerosos ensayos y procedimientos preparativos para estandarizar el proceso y optimizar la manipulación, volúmenes de muestra y tiempos de centrifugación.
- 4. Dificultad en la correlación funcional.** Las células cultivadas a menudo muestran propiedades diferentes a las células del tejido del que se originan, lo que dificulta la comparación directa. Para abordar esto, se utilizan marcadores celulares que ayudan a verificar que las células en cultivo son las mismas que las originales.
- 5. Inestabilidad genética.** Los cultivos celulares pueden experimentar inestabilidad genética con el tiempo, especialmente

durante múltiples pases, esto lleva a una heterogeneidad en el crecimiento y diferenciación de las células.

7.3 Usos y aplicaciones de los cultivos celulares

Estas aplicaciones destacan la versatilidad y el impacto fundamental de los cultivos celulares en la investigación científica, así como en el desarrollo de nuevas tecnologías y tratamientos. Los cultivos celulares de células animales son esenciales en una amplia gama de investigaciones y han sido clave para numerosos avances en las ciencias biomédicas. Según Bi et al. (2023), entre sus aplicaciones más destacadas se incluyen:

- 1. Análisis a nivel celular:** Estas metodologías brindan herramientas para examinar las funciones intrínsecas de las células, abarcando procesos como el intercambio energético (metabolismo), la regulación de las fases de división celular, la manipulación de la actividad de los genes, técnicas de replicación artificial (clonación), así como estudios vinculados a la oncogénesis y métodos de detección temprana.
- 2. Dinámica del desarrollo biológico:** Ofrecen plataformas para diseñar modelos que expliquen cómo se generan los tejidos especializados en un organismo adulto a partir de una única célula inicial (cigoto). En este campo, se investigan activamente cultivos celulares con capacidad de maduración controlada en laboratorio, los cuales permiten simular etapas clave de la especialización celular.
- 3. Investigación con animales transgénicos:** El cultivo celular es fundamental para insertar genes en células receptoras, un proceso clave en la creación de organismos transgénicos que expresan nuevos genes.
- 4. Aplicaciones en biología celular y bioquímica:** Incluyen el estudio de procesos intracelulares, como la transcripción del DNA y la síntesis de proteínas, así como el flujo y movimientos de RNA y proteínas.
- 5. Farmacología y toxicología:** La industria farmacéutica utiliza cultivos celulares para desarrollar y probar nuevos fármacos.

Además, se emplean en la producción de anticuerpos, hormonas y técnicas diagnósticas para enfermedades, incluido el diagnóstico prenatal y el cáncer.

- 6. Ecología celular:** Investiga las necesidades nutricionales de las células, las infecciones, la conversión celular provocada por sustancias químicas o virus, y la cinética de los grupos celulares.
- 7. Interacciones celulares:** Examina la colaboración metabólica, la inhibición por contacto o la adhesión, y las interacciones celulares.
- 8. Virología:** Establece condiciones para cultivar virus de origen animal y vegetal.
- 9. Inmunología:** Esta área se centra en la generación de anticuerpos monoclonales y en el estudio de la genética a nivel celular, explorando aspectos como la composición y regulación genética.
- 10. Ingeniería de proteínas:** Involucra la síntesis dirigida de proteínas mediante el empleo de líneas celulares modificadas o adaptadas para optimizar procesos biosintéticos.
- 11. Dinámica celular en diferenciación y desarrollo:** Proporciona metodologías para investigar los receptores y las rutas de señalización que regulan la maduración y especialización de las células, clave para comprender procesos como la formación de tejidos.

7.4 Medios de cultivo

De acuerdo con Pan et al. (2024), para el cultivo celular, se emplean placas que contienen medios líquidos diseñados para aportar los elementos esenciales que las células necesitan para sobrevivir y multiplicarse, como sales, glucosa, aminoácidos y vitaminas. Además, muchos de estos medios incluyen macromoléculas en forma de suero fetal bovino, equino o extractos embrionarios, aunque su composición exacta no siempre está definida. Esto dificulta determinar las necesidades específicas de un tipo celular particular.

Para abordar esta limitación, se han desarrollado medios químicamente definidos o "libres de suero", los cuales, además de los componentes básicos, incorporan proteínas específicas como factores de crecimiento, necesarios para la supervivencia y proliferación celular. Estos avances han permitido identificar moléculas extracelulares clave para regular procesos celulares esenciales como el desarrollo y la proliferación.

Los medios de cultivo suelen incluir tampones que mantienen un pH cercano a 7,4 y, a menudo, indicadores como el rojo fenol, que varía de color en respuesta al metabolismo celular. También se añaden antibióticos y antimicóticos para prevenir contaminación por microorganismos. Los cultivos celulares se realizan en recipientes de plástico o vidrio diseñados para facilitar la adhesión celular, mantenidos en incubadoras a 37 °C bajo una atmósfera controlada con 5% de CO₂ y 95% de aire.

7.5 Fases del cultivo

En un cultivo celular se pueden distinguir cuatro etapas o fases como lo indica (Fajardo-Argoti et al., 2021):

- 1. Fase de latencia (período lag):** Es el período en el que las células se adhieren al sustrato y comienzan a prepararse para el ciclo celular. Durante esta fase, el crecimiento de la bacteria es muy lento, casi nulo, como consecuencia de la adaptación de esta al sustrato y su colonización.
- 2. Fase de crecimiento exponencial:** En esta fase, el crecimiento permite que se dupliquen las células en cerca de 24 h. se caracteriza por ser el momento de mayor crecimiento poblacional y por consiguiente un mayor consumo de sustrato.
- 3. Fase de confluencia:** es consecuencia directa de una disminución del sustrato que ralentiza el crecimiento y lo mantiene estable durante un periodo de tiempo.
- 4. Fase de muerte:** es el momento sobre el cual el sustrato es consumido en su totalidad por lo que las bacterias empiezan a morir y hay un descenso de la replicación celular hasta ser nulo. (p. 192).

7.6 tipos de cultivos celulares

Los cultivos celulares pueden clasificarse según diversos criterios. Una forma de hacerlo es en función de su capacidad de adherencia a superficies. Dependiendo de si las células pueden adherirse a un sustrato, crecerán en forma de monocapa o se encontrarán en suspensión. Esta forma de crecimiento suele estar relacionado con el origen celular. En general, las células derivadas de órganos tienden a formar monocapas, mientras que algunas células pueden crecer tanto en monocapa como en suspensión (Bi et al., 2023).

Otra manera de clasificar los cultivos celulares es según su origen: Cuando las células se han aislado en forma reciente de un órgano específico o si estas células son modificadas. Los cultivos iniciales se pueden obtener de células disgregadas de tejidos de los órganos del sacrificio de un animal. Cuando estos cultivos primarios se someten a transformaciones que les permiten multiplicarse de manera indefinida, se les denomina líneas celulares. Aunque teóricamente se puede obtener un cultivo primario de cualquier tipo de tejido, los tejidos embrionarios y tumorales suelen ser los más efectivos debido a su menor grado de diferenciación y mayor capacidad de división (Doyle et al., 2024).

Al respecto, los cultivos se deben establecer a partir de suspensiones celulares, que se han obtenido por disgregación de tejidos. Se debe tener en cuenta que una gran variedad de células de tejido no sobrevive en suspensión, como lo hacen las bacterias, ya que requieren una superficie sólida para crecer y dividirse. Esta superficie suele ser la base de una placa o frasco de plástico, aunque en algunos casos se necesita recubrir el plástico con componentes de la matriz extracelular, como colágeno o laminina, para proporcionar el soporte necesario para el crecimiento celular.

7.6.1. Cultivos en monocapa

Un grupo de células que se cultivan en monocapa presentan un comportamiento característico en el cual su proliferación se ve

inhibida al entrar en contacto unas con otras. Este fenómeno permite que las células formen una monocapa que recubre la zona para crecer asignada. Aquellas células que se obtienen de un cultivo primario suelen florecer bajo estas circunstancias gracias a su estructuras genéticas estables y su característica diploide habitual.

Los contenedores utilizados para los cultivos celulares en monocapa comprenden frascos con tejidos cultivado (T-75 o T-24) y placas de Petri, que pueden ser fabricados en plástico o vidrio tratado. La transmisión de células a superficies más amplias se efectúa a través de la aplicación de agentes proteolíticos, como la tripsina. Para escalas mayores de producción, es esencial extender las áreas de crecimiento, siendo óptima la utilización de botellas en rotación (roller). Este sistema permite que las células se adhieran a toda la superficie interna de la botella mediante una rotación lenta; por ejemplo, una botella de 1 litro con 100 ml de medio ofrece una superficie de crecimiento de aproximadamente 500 cm² (Doyle et al., 2024).

7.6.2 Cultivos en suspensión

Una línea celular derivada de un cultivo primario que inicialmente requieren anclaje a superficies pueden adaptarse para crecer en suspensión tras un período de ajuste. Se ha demostrado experimentalmente que los cultivos cuando se suspenden necesitan de una macromolécula o matriz que funcionan como escudos de protección para el exterior de la célula. Estas macromoléculas, presentes en el suero, en conjunto con el medio de cultivo, constituyen el medio de cultivo, contribuyen a proporcionar un entorno equilibrado de nutrientes. Entre estas matrices se encuentra el Methocel, que es crucial para el crecimiento de cultivos en suspensión (Srivastava, 2024).

Mientras que el cultivo en monocapa es bueno cuando con un producto extracelular, se prefiere los cultivos en suspensión cuando se busca obtener productos intracelulares o cuando se enfrenta dificultades relacionadas con la capacidad de anclaje de ciertos tipos de células. El cultivo continuo presenta ventajas económicas significativas, como la utilización de equipos más

avanzados y una menor manipulación, lo que resulta en una mayor eficiencia para la producción a gran escala.

7.6.3 Cultivos primarios

Los cultivos primarios presentan características distintivas en comparación con las líneas celulares establecidas. Estas características incluyen la conservación de la morfología inicial de las células del órgano de origen, un número cromosómico diploide ($2n$), un limitado crecimiento en condiciones *in vitro* e inhibición al contacto.

Debido a su proximidad a las células originales, los cultivos primarios mantienen una actividad y funcionalidad más cercanas a su entorno natural. Esto se traduce en una mayor sensibilidad a cepas virales en comparación con las líneas celulares establecidas. Además, los cultivos primarios son preferidos para la producción de vacunas debido a su menor propensión a transformarse en malignos. No obstante, presentan la desventaja de tener alta probabilidad de contener virus latentes o adventicios, esto requiere el uso de tecnologías avanzadas para asegurar un mejor manejo de la calidad.

En un cultivo primario se puede comenzar con o sin un proceso previo de fraccionamiento para aislar diferentes formas celulares. En este tipo de cultivos, se conserva las características originales de la célula, aunque su capacidad de proliferación es restringida. Además, las células pueden ser retiradas del recipiente de cultivo para iniciar cultivos secundarios (Nguyen et al., 2024).

7.6.4 Cultivos secundarios

En los cultivos secundarios, las células tienden a proliferar hasta cubrir la totalidad de los bordes del contenedor, estableciendo una monocapa, que es una capa de células de un solo espesor. La proliferación celular se detiene temporalmente cuando las células entran en contacto entre sí, hasta que se realiza el subcultivo, o las células se pasen, a un nuevo contenedor con cultivo nuevo. Bajo estas condiciones, las células pueden man-

tenerse y subcultivarse durante semanas o meses. Durante esta fase, las células a menudo presentan características diferentes según su origen (Srivastava, 2024).

7.6.5 Cultivos tridimensionales

Los cultivos tridimensionales están diseñados para preservar la estructura y organización del tejido en condiciones *in vivo*. Este tipo de sistema ayuda en la comprensión de la proliferación y la morfología epitelial, así como sus interacciones entre una célula y otros tejidos (conectivo). Además, los cultivos tridimensionales facilitan la evaluación de cómo diversas sustancias pueden influir en las interacciones entre células (Srivastava, 2024).

7.6.6 Cultivos continuos o líneas celulares

Los cultivos continuos están compuestas por células que han adquirido diferencias genéticas y morfológicas respecto a las células originales de las que derivan. Estas células pueden originarse de tumores o mediante la transformación de cultivos primarios a través de técnicas como oncogénesis por transferencia o el manejo con agentes carcinogénicos, lo que resulta en la adquisición de un nuevo fenotipo.

Los cultivos continuos, o líneas celulares, se caracterizan por ser aneuploides, carecer de inhibición por contacto y presentar un crecimiento indefinido. El proceso de convertir un cultivo primario en una línea celular se denomina transformación. Esta transformación puede ser inducida fisiológicamente mediante hormonas como la hidrocortisona o mediante inductores no fisiológicos como el dimetilsulfóxido (DMSO) (Srivastava, 2024).

Bajo condiciones normales, una mayor número de células en los vertebrados ya no se replican después de un número establecido de división, un fenómeno denominado senescencia celular. Al respecto, en el ser humano, un fibroblasto normal solo se parte cerca de 25 a 40 veces antes de cesar su proliferación. Esta capacidad limitada de división se debe al acortamiento progresivo de los telómeros, que son secuencias de ADN ubicadas en los extremos de los cromosomas. En las células somáticas, el gen

que codifica la enzima telomerasa, responsable de mantener la longitud de los telómeros, se encuentra "silenciado". Como resultado, los telómeros se acortan con cada división celular.

Sin embargo, los fibroblastos humanos, al igual que otras células, pueden ser inducidos a proliferar indefinidamente si se les introduce el gen que codifica para la telomerasa. De este modo, las células pueden mantenerse en cultivo como una línea celular continua.

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 7.

Cultivos celulares

El uso de cultivos celulares en el estudio con probióticos es fundamental para comprender sus mecanismos de acción, evaluar su viabilidad y determinar su seguridad antes de su aplicación en organismos vivos. Este modelo experimental permite analizar, de manera controlada y reproducible, las interacciones entre los probióticos y las células huésped, así como sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Además, el empleo de cultivos celulares contribuye a reducir la necesidad de ensayos *in vivo* en las etapas iniciales, optimizando tiempo, recursos y cumpliendo con principios éticos. Por lo tanto, los cultivos celulares representan una herramienta clave para el desarrollo y la validación científica de probióticos eficaces y seguros.

El uso de cultivos celulares en la investigación microbiológica es una herramienta fundamental que permite estudiar de manera controlada las interacciones entre microorganismos y células huésped. Este modelo facilita la comprensión de los mecanismos de patogenicidad, la evaluación de la eficacia de tratamientos antimicrobianos y el análisis del comportamiento de probióticos, entre otros aspectos relevantes. Además, los cultivos celulares contribuyen a reducir el uso de modelos animales en las etapas iniciales de la investigación, optimizando recursos y cumpliendo con principios éticos. Por lo tanto, su aplicación es clave para avanzar en el conocimiento microbiológico y desarrollar estrategias efectivas para la prevención y el tratamiento de enfermedades.

CAPÍTULO 8.

Probióticos en la industria alimentaria



En las últimas décadas, la industria alimentaria ha experimentado una transformación significativa, pasando de un enfoque centrado únicamente en la cobertura de necesidades nutricionales básicas hacia la producción de alimentos funcionales. Dentro de esta categoría, los probióticos han surgido como uno de los componentes más prometedores debido a su capacidad para interactuar positivamente con la microbiota del huésped y promover la salud sistémica.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor. En el contexto de la zootecnia y la tecnología de alimentos, su aplicación no se limita solo a la salud humana, sino que representa una herramienta biotecnológica clave para la seguridad alimentaria y la eficiencia productiva en especies de interés zootécnico.

El presente capítulo aborda la importancia de los probióticos desde una perspectiva microbiológica, analizando los criterios de selección que garantizan su viabilidad y funcionalidad. Se explorarán los principales géneros bacterianos utilizados, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, así como los retos tecnológicos que enfrenta la industria para mantener la estabilidad de estos microorganismos durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Asimismo, se discutirá el papel de estos microorganismos en la prevención de enfermedades entéricas y su impacto en la calidad final de los productos de origen animal.

8.1 Historia de los probióticos y prebióticos

Elie Metchnikoff postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) eran buenas para la salud y podían promover la longevidad. Sugirió que la "autointoxicación intestinal" y el envejecimiento resultante podrían suprimirse modificando el microbiota intestinal y sustituyendo los microbios proteolíticos -que producen sustancias tóxicas como fenoles, indoles y amoníaco a partir de la digestión de proteínas- por microbios sacarolíticos. Desarrolló una dieta con leche fermentada con una bacteria a la que llamó "bacilo búlgaro"(Garner y Gandhi, 2019)

Los mismos autores mencionan que, a este concepto le siguieron otros desarrollos iniciales. Los trastornos del tracto intestinal se trataban a menudo con bacterias no patógenas viables para cambiar o sustituir el microbiota intestinal. En 1917, antes de que Sir Alexander Fleming descubriera la penicilina, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* de las heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no desarrolló enterocolitis durante un brote grave de shigelosis. La cepa resultante de *Escherichia coli* Nissle 1917 es un ejemplo de probiótico no BAL. Por su parte, Henry Tissier (del Instituto Pasteur), aisló una *Bifidobacterium* de un lactante amamantado con el objetivo de administrársela a los niños que sufrían diarrea. Su hipótesis era que desplazaría a las bacterias proteolíticas causantes de la diarrea. En Japón, el Dr. Minoru Shirota aisló la cepa Shirota de *Lacticaseibacillus paracasei* para combatir los brotes diarreicos. Desde 1935 se comercializa un producto probiótico con esta cepa. Estos fueron los precursores de un campo científico que ha florecido.

Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, son beneficiosos para la salud del hospedero (Hill et al., 2014). Los lactobacilos, junto con las especies de *Bifidobacterium*, han sido históricamente probióticos comunes. En 2020, el género *Lactobacillus* sufrió una importante reestructuración para abordar mejor la amplia gama de microbios asignados al género. Se definieron 23 nuevos géneros, incluidos algunos con especies probióticas bien estudiadas. También se utilizan la levadura *Saccharomyces boulardii* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus*. Entre los nuevos probióticos se encuentra el *Clostridium butyricum*, recientemente aprobado como nuevo alimento en la Unión Europea.

El concepto de prebiótico, propuesto por primera vez por Gibson y Roberfroid (1995), es más reciente que el de probiótico. Los aspectos clave de un prebiótico son que no es digerible por el hospedero y que produce beneficios para la salud del consumidor al ejercer una influencia positiva sobre los microbios beneficiosos residentes. La administración o el uso de prebióticos o probióticos pretende influir en el entorno intestinal, habitado por billones de microbios, en beneficio de la salud humana. Se ha demostrado que tanto los probióticos como los prebióticos

tienen efectos beneficiosos que se extienden más allá del intestino, pero estas directrices se centrarán en los efectos intestinales. Los prebióticos suelen consistir en polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos, aunque se están estudiando otras sustancias como candidatos a prebióticos, como el almidón resistente, el ácido linoleico conjugado y los polifenoles. La mayoría de los prebióticos se utilizan como ingredientes alimentarios, en alimentos como galletas, cereales, chocolate, cremas para untar y productos lácteos. Los prebióticos más conocidos son:

- Oligofruktosa (fructooligosacáridos, FOS)
- Inulina • Galactooligosacáridos (GOS)
- Lactulosa
- Oligosacáridos de la leche materna (oligosacáridos de la leche humana o HMO) (Guarner et al., 2024).

8.2 Aplicación de los probióticos en productos alimentarios

8.2.1 Probióticos en lácteos

La relación entre el hombre, los efectos benéficos y los microorganismos probióticos sobre la salud intestinal, cuando se consume leches fermentadas que tiene bacterias lácticas, ha sido observada desde hace mucho tiempo, los registros sobre el uso de productos lácteos se encuentran en pinturas rupestres fermentadas. Distintos organismos se encuentran en los alimentos fermentados en este grupo podemos observar *S. thermophilus*, *Lactococcus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*, *L. kefir*, *L. kefiranoformans* y cepas del grupo *L. casei*.

8.2.2 Yogures y leches fermentadas

De acuerdo con Aragno y Verstraete (2011), mencionan que las bacterias probióticas tienen una larga historia asociada a productos lácteos como principal vehículo alimenticio, son numerosas las razones que hicieron que las leches fermentadas, como

el yogur, hayan sido uno de los primeros, y más exitosos comercialmente, vehículos de bacterias probióticas. Por otra parte, Kanbe (1992), menciona que muchos probióticos participan de los nichos ecológicos, en los cuales se encuentran las bacterias lácticas, a lo que se concluye que “bacterias cercanas podrían funcionar bien en una misma matriz alimentaria”. A pesar de observarse combinaciones exitosas, algunas, no muestran efectos benéficos para el huésped. Al respecto, el yogur se considera un alimento saludable por el tipo de combinaciones que presente. Junto a lo anterior, la popularidad del yogurt entre las personas ha hecho que éste se mantenga en la dieta del ser humano; entre sus características más sobresalientes están la variedad de sabores disponibles, un bajo costo, la presentación del producto y las facilidades para transportarlo, almacenarlo y consumirlo.

Cuando se quiere producir yogur con microorganismos probióticos, se suele emplear los métodos industriales tradicionales usados en la elaboración de los yogures, incorporando bacterias probióticas al inicio de la fermentación (junto con las bacterias acidificantes). En el primer caso, la ventaja es que operativamente son menos pasos, pero la desventaja es que la cepa probiótica estará expuesta a temperaturas no óptimas durante la fermentación y expuesta a la acidez láctica generada por las bacterias lácticas, lo que podría impactar negativamente en la viabilidad del probiótico (Souza et al., 2012), los mismos autores afirman que, el caso del agregado del probiótico luego de la fermentación, éste se puede aplicar a yogures batidos (en el caso de yogures set o firmes el probiótico debe agregarse antes de la fermentación), y la desventaja podría ser la sensibilidad al oxígeno incorporado durante el batido, principalmente si se emplean bifidobacterias. Hay numerosos estudios sobre el agregado de probióticos a leches fermentadas y su adecuada viabilidad durante la vida de estante (Kailasapathy, 2006).

Sin embargo, tan pronto como estos desarrollos comenzaron a aparecer, otros estudios advirtieron sobre pérdidas de viabilidad celular en forma cepa y producto dependiente (Donkor et al., 2007), principalmente debido a la acción inhibitoria de la acidez láctica, a factores del proceso o a otros compuestos químicos que forman parte de la formulación del producto (Aragno y Verstraete,

2011), así también como a las posibles interacciones negativas entre las bacterias lácticas y probióticas (Aragno y Verstraete, 2011).

La viabilidad de bacterias probióticas en leches fermentadas depende de numerosos factores tales como la cepa en particular, la forma de inoculación (cultivos congelados, liofilizados o con una etapa previa de propagación *in situ* en planta), el momento del agregado a la leche (antes o después de la fermentación), la temperatura de fermentación, la acidez final y la composición química de la matriz, las interacciones con las bacterias lácticas acidificantes, las condiciones de temperatura durante la vida de estante y el oxígeno disuelto, entre otros (Stanton et al., 2003). Los factores mencionados no son exclusivos, dado que se presenten interacción entre los mismos y que aún faltan por ser estudiados. Teniendo en cuenta lo anterior, el pH final del producto y el fenómeno de post-acidificación son importantes para la pérdida de viabilidad celular de bacterias probióticas en productos lácteos fermentados como el yogur (Kanbe, 1992).

8.2.3 Quesos

Aragno y Verstraete (2011), mencionan que mencionan que, el queso ha sido la segunda matriz alimentaria con mayor éxito comercial para la vehiculización de bacterias probióticas. De acuerdo con Kanbe (1992), la incorporación de estos cultivos en variedades de quesos frescos, blandos o semi-blandos representa una opción alentadora para resolver distintos problemas en la viabilidad limitada en aquella leche que se ha fermentado, principalmente la producción de ácido láctico. El queso presenta peaches más altos que el yogur, su matriz es más densa y con menor cantidad de oxígeno, además, de un elevado contenido de grasa que podría funcionar como un protector para el probiótico durante la digestión, algunos métodos caseros requieren ajustes en comparación con el proceso industrial de fabricación de yogures, para garantizar que se cumplan los requisitos de viabilidad de los probióticos.

Es importante tener en cuenta factores como la actividad acuosa, el contenido de sal, la temperatura de cocción de la cuajada y el tiempo de maduración, entre otros, antes de añadir una bac-

teria probiótica al queso. En este contexto, los quesos frescos son perfectos para incorporar probióticos, ya que no necesitan maduración y suelen tener un contenido de sal bajo a moderado. El almacenamiento se realiza a temperaturas de enfriamiento y la durabilidad es relativamente breve o dentro de los períodos previstos para mantener la viabilidad del probiótico (desde unas dos semanas hasta unos pocos meses) (Heller et al., 2003).

Uno de los principales desafíos para incorporar probióticos en los quesos es definir cuándo y cómo incorporarlos en la tina de producción, con el fin de reducir la pérdida de biomasa junto al suero que se extrae tras cortar la cuajada. Para cada queso específico, se debe hallar una solución acorde a su método de producción. Por ejemplo, en el caso del queso cottage, la incorporación se realiza al añadir la crema y la sal (Higuera Marin et al., 2019).

Existen numerosísimos antecedentes de la incorporación exitosa de bacterias probióticas a quesos, la mayoría de ellos experimentales, algunos ejemplos son: Cheddar (Phillips et al., 2006; Ong et al., 2007), Cottage (Fitzgerald, 1998), Gouda (Gomes et al., 1995), Crescenza en Italia (Burns et al., 2008) y Tallaga (El-Zayat & Osman, 2001) en Egipto, de cabra en Portugal [92], Bioqueso Ilolay Vita fresco en Argentina, que llegó al desarrollo comercial y lanzamiento al mercado (Aragno y Verstraete, 2011), y Fior di Latte (Minervini et al., 2012) en Italia, y petit-suisse en Brasil (Cardarelli et al., 2008).

8.2.4 Productos congelados

Productos tales como helados, yogures congelados y postres helados han sido propuestos como vehículos para bacterias probióticas (Ravula & Shah, 1998). Se sostiene que el mayor beneficio de los productos congelados radica en su almacenaje a temperaturas de 5 a 10 °C bajo cero, aunque una mayor durabilidad de estos productos podría impactar de manera adversa en la viabilidad de los probióticos a largo plazo. Hay elementos alimenticios que pueden obstaculizar la viabilidad de estos microorganismos son la actividad acuosa reducida y la potencialmente alta presión osmótica a causa del contenido de sólidos. Se podrían observar simultáneamente cambios en la fluidez de la membrana plasmática y deshidratación intracelular, a causa

de la creación de cristales intracelulares capaces de fracturar las células y provocar la inactivación de los probióticos durante el proceso de congelamiento, dependiendo de las condiciones del mismo (Kanbe, 1992).

No obstante, existen otros factores que podrían favorecer la viabilidad de los probióticos, tales como la presencia de crioprotectores naturales, como la caseína, los azúcares y las grasas. En cualquier caso, la capacidad de un probiótico para perdurar en un producto está determinada, en última instancia, tanto por las características específicas de la cepa como por las propiedades fisicoquímicas del producto en cuestión. Un producto exitoso de este tipo es el helado comercial Biogarde®, que se ha comercializado en Alemania desde la década de los 80 y que incorpora *B. bifidum* y *L. acidophilus* como cultivos probióticos (Kanbe, 1992).

8.3 Probióticos en carne

De acuerdo con Bintsis (2018), las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) se consideran, en su mayoría, seguras y han sido ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores en la conservación industrial de productos cárnicos. Los cultivos iniciadores más comunes son las BAL homofermentativas, tales como *Lactococcus*, *Pediococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*, que generan ácido láctico, el principal metabolito de los carbohidratos. Este proceso no solo favorece el desarrollo y sabor característico de los productos, sino que también desempeña un papel en su conservación. Se ha comprobado que el uso de BAL como cultivos iniciadores reduce el tiempo de fermentación y aumenta la seguridad en la mayoría de los alimentos fermentados, en particular en el procesamiento y conservación de carnes.

Los productos cárnicos son artículos de gran utilidad debido a su propia composición nutricional y características físico-químicas. Dentro de los grupos microbianos más relevantes que causan su modificación se hallan las bacterias ácido lácticas como *Lactobacillus* spp. y *LeuconOSTOC* spp. modifican las características organolépticas del producto (Pothakos et al., 2015). La aplicación de antimicrobianos químicos, tales como los nitrí-

tos, ha sido un método frecuentemente empleado para prevenir la alteración de la carne y sus derivados. La creciente necesidad del consumidor de productos naturales y más beneficiosos para la salud ha fomentado la investigación de antimicrobianos naturales, como los aceites esenciales (Bangar et al., 2022).

Las BAL han recibido numerosos estudios debido a su habilidad para potenciar la preservación y la calidad sensorial de los productos cárnicos, su papel en la bioconservación y su influencia en las características organolépticas de la carne han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años. Las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) tienen un efecto notable en el aroma y el sabor de los alimentos cárnicos, al generar compuestos volátiles como ácidos orgánicos, aldehídos, alcoholes y cetonas. Estos compuestos son responsables del cambio sensoriales característicos de productos fermentados como embutidos y salchichones (Gandhi & Shah, 2014). La fermentación de las BAL también genera cambios en la textura, mejorando los productos cárnicos. La actividad enzimática de las BAL contribuye a la degradación de proteínas y lípidos, resultando en una textura más tierna y jugosa (Talpur, 2014). En cuanto al color, la fermentación de las BAL también influye en la estabilidad del color rojo característico de la carne por la producción del ácido láctico y otros metabolitos, previniendo la oxidación de la mioglobina (Zhou et al., 2014).

Las BAL tienen diferentes formas de interacción con otros microorganismos presentes en los productos cárnicos, ya sea de manera antagónica, sinérgica o competitiva. Estos microorganismos se enfrentan a otros organismos dañinos y modificadores de nutrientes vitales. Esta competencia es uno de los mecanismos más relevantes mediante los cuales las BAL impiden la proliferación de microorganismos indeseables. En un estudio, se observó que *Lactobacillus sakei* compite eficazmente contra *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, reduciendo significativamente su proliferación (Bassi et al., 2015).

Las bacteriocinas producidas por la bacteria *Lactiplantibacillus plantarum* permiten la inhibición de otros microorganismos, teniendo un espectro de acción que abarcar desde bacterias

Gram-positivas hasta Gram-negativas, demostrando una fuerte actividad inhibidora contra patógenos como *Staphylococcus aureus* en productos cárnicos (Diop et al., 2018). La fermentación de las BAL facilita la disminución del pH de la comida y genera condiciones adversas para numerosos patógenos y bacterias modificadoras. Un pH bajo, junto con la producción de otros ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno y compuestos volátiles, permite la inhibición de microorganismos como *Escherichia coli* y *Salmonella* (Keller et al., 2014).

Por otra parte, Las BAL producen estructuras multicelulares llamadas biofilms, capaces de resguardarlas y facilitar una acción más eficaz con otros microorganismos perjudiciales. Los biofilms en las BAL pueden contener diversas especies de bacterias, generando una comunidad de microorganismos que puede eliminar a patógenos y bacterias modificadoras (Ren et al., 2019). En ciertas situaciones, las BAL interactúan sinérgicamente con otros microorganismos benéficos. Como muestra, la co-cultivación de las BAL con levaduras ha demostrado una mejora en la vida útil y la calidad sensorial de los productos fermentados. La combinación de *Lactobacillus sakei* y *Debaryomyces hansenii* mejora el sabor y la textura de salchichones fermentados (Benito et al., 2016).

La efectividad antimicrobiana de las BAL depende del alimento y las circunstancias particulares de procesamiento y almacenamiento. En alimentos fermentados, como salchichones y chorizos, las BAL resultan fundamentales tanto para la fermentación como para su preservación. Las BAL, en su mayoría ácido láctico, generan metabolitos que disminuyen el pH del producto, generando un entorno hostil para microorganismos dañinos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* (Leroy & De Vuyst, 2016). Además, las bacteriocinas producidas por BAL, como la sakacina y la pediocina, han demostrado ser efectivas contra una amplia gama de bacterias indeseables (Hu et al., 2016).

Las BAL se emplean como cultivos de protección en carnes frescas y refrigeradas para extender la vida útil y potenciar la calidad microbiana. El uso de *Lactobacillus sakei* en carnes frescas disminuye considerablemente la proliferación de *Pseudomonas* spp. y *Enterobacteriaceae*, dos familias bacterianas

vinculadas con la degradación de la carne (Spano et al. 2014). En algunos productos cocinados como la salchicha y el jamón, las BAL también aportan beneficios gracias a su actividad antimicrobiana. Añadir *Lactobacillus curvatus* a los productos cárnicos cocidos no solo incrementa la seguridad microbiana al eliminar patógenos como *Clostridium perfringens*, sino que también ayuda a preservar la calidad sensorial del producto durante su almacenamiento (Aymerich et al., 2019).

En productos cárnicos curados, como el bacon y el jamón serrano, las BAL desempeñan un rol en la inhibición del desarrollo de bacterias halófilas y psicrotróficas. En investigaciones relacionadas con cepas particulares de *Lactobacillus plantarum* se ha demostrado que pueden restringir el desarrollo de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* bajo condiciones de alta concentración de sal, características de los productos curados (Hammes & Hertel, 2015).

En España, la compañía Embutidos Fermín ha llevado a cabo exitosamente la aplicación de BAL en su gama de productos de carne. De acuerdo con una investigación corporativa llevada a cabo en 2013, la inclusión de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus* en productos fermentados como chorizo y salchichón condujo a una disminución del 98 por ciento en la existencia de bacterias patógenas, no alterar el gusto o la suavidad del producto. Este logro ha impulsado a la compañía a implementar el uso de BAL en toda su gama de productos fermentados (Embutidos Fermín, 2016). En el país argentino, la compañía Carnes Argentinas S.A. comunicó un significativo logro en extender la vida útil de productos cárnicos frescos a través de la aplicación de *L. plantarum*. Una investigación de la compañía en 2010 señaló que la duración de los cárnicos crudos se amplió a catorce días, lo que posibilitó una entrega más extensa y disminuyó el derroche de alimentos. Las conclusiones fueron tan favorables que la compañía tiene la intención de ampliar la utilización de BAL a otros productos (Carnes Argentinas S.A., 2017). Últimamente, se ha creado recientes variantes de BAL con mejores características contra microorganismos patógenos. En una investigación se presentó una cepa de *Lactobacillus rhamnosus* con capacidad para producir bacteriocinas de amplio espectro, que fueron efectivas

contra múltiples patógenos alimentarios (García et al., 2019). Esta innovación simboliza un progreso importante en la biotecnología de alimentos, proporcionando nuevos dispositivos que ayudan a la bioconservación de los productos.

8.4 Probióticos en matrices vegetales

En la industria de alimentos la inclusión de cultivos probióticos se ha realizado tradicionalmente en productos lácteos (queso, yogur, helados, entre otros) (Shori, 2016). La investigación en el desarrollo de soluciones alternativas a los productos probióticos derivados de la leche es una opción en crecimiento dentro de la industria de alimentos, especialmente el diseño de bebidas de frutas y/o vegetales como ingrediente principal es una iniciativa factible (Vijaya et al., 2015). Los avances tecnológicos han permitido alterar algunas características estructurales de las matrices vegetales modificando los componentes de estos alimentos de una forma controlada (Lewandowski, 2015), y generando una serie de productos con valor agregado en el mercado de alimentos.

Con el fin de proporcionar los efectos funcionales, las cepas a menudo requieren una matriz específica que permita la supervivencia óptima del cultivo lo largo del tracto gastrointestinal (Vandenplas et al., 2014). El creciente número de personas con intolerancia a la lactosa, la dislipidemia y el vegetarianismo refuerzan la importancia del desarrollo de los productos probióticos no lácteos (Shori, 2016). Estas condiciones han permitido el lanzamiento de nuevos productos que contienen cepas probióticas, particularmente bebidas a base de frutas, verduras, cereales y soja (Corbo et al., 2014).

Microorganismos como *L. acidophilus*, *rhamnosus* *Lactiplantibacillus plantarum*, *L. casei* y *Bifidobacterium lactis* son los más usados en la elaboración de distintos productos hortícolas y frutícolas. Desde el punto de vista del desarrollo tecnológico, la inclusión de diferentes microorganismos para procesos fermentativos es un método biopreservación tradicional para la fabricación de alimentos, que puede ser considerado una herramienta

biotecnológica sencilla, relativamente económica y valiosa para mantener o mejorar la seguridad, propiedades sensoriales y la vida útil de productos hortofrutícolas (Di Cagno & Coda, 2014). La información sobre distintas matrices de origen vegetal que esta disponibles como fuente de aislamiento como lugar de obtención de bacterias probióticas es más baja, que los observados en alimentos derivados de la leche.. Adicionalmente es necesario realizar nuevos estudios sobre microorganismo nativos de alimentos vegetales en relación a supervivencia, frente a los desafíos tecnológicos, criterios de fermentación, uso como cultivos iniciadores y relación ecológicas (Vijaya et al., 2015).

Las matrices vegetales son fuentes fundamentales de agua, vitaminas (vitamina C vitaminas del grupo B, provitamina A), fibra dietaria, minerales y fitoquímicos significativos para la dieta humana y para los cultivos probióticos (Di Cagno et al., 2013). Especialmente las bebidas de fruta son consideradas vehículos de inclusión para estos microorganismos debido a las ventajas funcionales que presentan como fuente de micronutrientes, bajo contenido de alérgenos y su mayor digestibilidad (Vijaya et al., 2015). En la actualidad existe una gran preocupación por el incremento de enfermedades asociadas con la obesidad, motivo por el cual se están considerando los beneficios de los probióticos en bebidas de fruta y/o vegetales en la prevención y el tratamiento de una serie de condiciones de salud (Shahidi & Alasalva, 2016).

La inclusión de estos ingredientes funcionales en matrices de origen vegetal puede ser una alternativa para aumentar el bajo consumo de frutas y verduras que actualmente está presente a nivel mundial, sobre todo en países en vía de desarrollo, según reporta la Organización Mundial de la Salud (OMS), y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (Di Cagno et al., 2013), además de generar un aprovechamiento tecnológico dentro de la cadena agroindustrial evitando pérdidas poscosecha. Sin embargo, en la generación de estos productos se deben considerar retos tecnológicos a nivel de viabilidad (vida útil del producto) y del impacto sensorial (Bernal-Castro et al., 2017).

En general, de acuerdo con los estudios realizados, el crecimiento y la viabilidad de las bacterias probióticas en bebidas de frutas y verduras depende de la especie y cepa de la bacteria utilizada, el pH y la concentración de ácido láctico y ácido acético del producto final, entre otros factores (Shori, 2016). La adición de probióticos en estos productos es más compleja que la formulación en los productos lácteos porque las bacterias necesitan protección de las condiciones ácidas en las bebidas a base de frutas y/o vegetales (Perricone et al., 2015). Sin embargo, algunos estudios recientes han demostrado que algunas cepas son capaces de crecer y sobrevivir a niveles estables (densidad celular superior a 10^7 UFC/mL) en bebidas de fruta generando un aumento en el consumo como vehículos de inclusión para microorganismo probióticos (Lewandowski, 2015).

8.4.1 Probióticos en matrices vegetales

En el mundo se producen una variedad de bebidas tradicionales no lácteas fermentadas, como Boza, Bushera, Mahewu, Pozol, Togwa Hardaliye y Kinema, elaborado a partir de la fermentación de la soya utilizando *Bacillus subtilis* consumido por los habitantes de Nepal (Rai & Bai, 2015). Según Bintsis (2018), las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) son mayormente consideradas seguras y han sido utilizadas de forma extendida como cultivos iniciadores en la conservación industrial de productos cárnicos. Entre los cultivos iniciadores más prevalentes se encuentran las BAL homofermentativas, como *Lactococcus*, *Pediococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*, las cuales producen ácido láctico, principal metabolito derivado de los carbohidratos. Este proceso no solo favorece el desarrollo del sabor característico y la textura de los productos, sino que también contribuye a su conservación. Se ha demostrado que la incorporación de BAL como cultivos iniciadores reduce significativamente el tiempo de fermentación y mejora la seguridad microbiológica en la mayoría de los alimentos fermentados, especialmente en la gestión y conservación de productos cárnicos.

La primera bebida de fruta sin leche con adición de probióticos fue Proviva® lanzada en Suecia en 1994 por la compañía Skane Lácteos (Molin, 2001). Este producto tiene como ingrediente

activo a bacterias ácido-lácticas (*L. plantarum* 299v) que se desarrollan en harina de avena. El resultado final presenta niveles que oscilan entre 5×10^7 y 1×10^{11} UFC/ml. Otros ejemplos de productos disponibles en el mercado son: Rela® (Biogai, Suecia), un jugo de fruta con *L. reuteri* MM53; Geflius® (Valio Ltd., Finlandia) bebida de fruta con 7 semanas de vida útil en refrigeración; Bioprofit® (Valio Ltd.) con *L. rhamnosus* y *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS y Biola® (Tiene BA, Noruega) una bebida con más del 95% de fruta sin adición de azúcar (Corbo, 2014). Diversas frutas y hortalizas como manzanas, naranjas, grosella negra, plátano, arándano, piña, melón, frambuesa, granada, zanahorias y remolacha. han sido utilizadas para el diseño de diferentes productos enriquecidos con probióticos (Martins et al., 2013).

Los factores clave para seleccionar cepas probióticas adecuadas incluyen la habilidad de los microorganismos para sobrevivir durante el procesamiento y almacenamiento, su resistencia al paso por el tracto intestinal y los posibles beneficios para la salud de los consumidores. La selección de cepas de autóctonas de origen vegetal puede ayudar a superar los retos tecnológicos, algunas cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de verduras y frutas fermentadas, se pueden utilizar como probióticos, ya que son capaces de resistir altos niveles de acidez y de sal durante el período de almacenamiento (Rai & Bai, 2015). Varios elementos afectan el crecimiento de los microorganismos, incluyendo: concentración de oxígeno, acidez, pH, tipo de embalaje, temperatura de producción y almacenaje, y tecnologías de preservación como el secado y la congelación. La ácido tolerancia de las bacterias ácido lácticas es un factor tecnológico en el desarrollo de estos productos, las bebidas de frutas tienen un pH inferior a 4, es un aspecto fundamental en la pérdida de viabilidad de los probióticos (Tripathi & Giri, 2014).

Los elementos clave en la elaboración de bebidas frutales probióticas incluyen aspectos como el pH del producto final, el cual debe ser adecuado para garantizar la supervivencia de los microorganismos. La temperatura de almacenamiento también es fundamental, siendo lo ideal mantenerla en condiciones refrigeradas (4°C) para preservar la estabilidad microbiológica,

fisicoquímica y sensorial, evitando la formación de metabolitos que puedan comprometer tanto la viabilidad de los probióticos como el perfil sensorial de la bebida. Además, la temperatura óptima para el crecimiento de los microorganismos debe superar los 45°C.

El impacto sensorial generado por la incorporación de probióticos en productos de origen vegetal es fundamental en la creación de bebidas funcionales. Este parámetro ha sido explorado por algunos autores, por ejemplo, se ha reportado sabores salados, agrios y olores perfumados en bebidas de fruta con adición de probióticos (Perricone et al., 2015). Luckow et al. (2005), en su estudio, aroma, texture and flavour of probiotic fruit juices. Novel blackcurrant juices containing probiotic cultures (*Lactobacillus plantarum* 299v) concluyeron que los jugos de naranja con probióticos (*Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Imunitass®, *Lactobacillus paracasei* NFBC 43338) presentaban por parte de un panel descriptivo perfiles sensoriales poco agradables descritos como sabores medicinales y con toques lácteos, sin embargo estos autores sugieren que la exposición y la familiaridad con las bebidas probióticas ayuda a mejorar la aceptación y el gusto de los consumidores por las características sensoriales de las bebidas de fruta con probiótico (Luckow et al., 2005).

8.5 Probióticos en chocolate

El chocolate es un alimento nutricionalmente completo, con un importante aporte de antioxidantes, los cuales ejercen una acción protectora en la prevención y el desarrollo de diversas patologías identificadas colectivamente como «patologías por estrés oxidativo» (Finkel & Holbrook, 2000). Estas patologías se relacionan con el efecto deletéreo del oxígeno, el que al transformarse en radicales libres en nuestro propio organismo, inicia procesos de oxidación no controlados que dañan funciones celulares, conduciendo potencialmente al desarrollo de una o de varias enfermedades (Nordberg & Arner, 2001). De esta manera, las enfermedades cardio y cerebro vasculares tienen importantes componentes derivados del estrés oxidativo. Algunos tipos

de cáncer, (hepático, gástrico, de colon, próstata) también presentan componentes de estrés oxidativo en su etiopatogenia (Shahidi,2000). Más recientemente, enfermedades del sistema nervioso como Alzheimer y Parkinson, se han identificado como originadas por el desencadenamiento de un estrés oxidativo no controlado a nivel de células neuronales y gliales. Patologías de amplia prevalencia como diabetes tipo 2 y cataratas, también se asocian al estrés oxidativo (Simmons, 2006). De esta forma, el consumo de antioxidantes de origen natural constituye actualmente, una recomendación en la edad adulta y en la senescencia (Valenzuela, Sanhueza & Nieto, 2003).

De acuerdo a Konar et al. (2016), en los estudios donde se han utilizado microorganismos probióticos en productos de chocolate, estos corresponden a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Al respecto, Konar et al. (2018), reportaron el uso del probiótico *Lactobacillus acidophilus* en chocolate blanco y encontraron resultados satisfactorios en cuanto a la viabilidad del microorganismo a los 90 días, alcanzando un contenido de 106 UFC/g (Konar et al., 2018). En otra investigación, Petronijević et al. (2017), aplicaron en diferentes tipos de chocolate (leche, semidulce y oscuro) tres cepas probióticas (*Lactobacillus acidophilus* LH5, *B. breve* BR2 y *S. thermophilus* ST3) microencapsulados con recubrimiento doble, posteriormente demostraron su viabilidad en un tiempo de vida útil de 360 días a 4 °C y 20 °C.

Konar et al. (2018), mencionan que en los productos de chocolate amargo se han aplicado los probióticos: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Bacillus indicus*, *Bacillus lactis* y *Bacillus longum*, en los chocolates con leche: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* subsp. *Lactobacillus coagulans*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus paracasei*; en cobertura de chocolate para recubrir cereales para el desayuno: *Lactobacillus rhamnosus*, en chocolate blanco *Lactobacillus helveticus* y *Bacillus longum*; en mousse de chocolate: *Lactobacillus paracasei* subsp. y *Lactobacillus paracasei*. Los mismos autores manifiestan que la aplicación de estos microorganismos se realizó en diferentes formas, liofilizados (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus lactis*, *Lactobacillus brevis* subsp, *Lactobacillus coagulans*, y *Ba-*

cillus indicus); y microencapsulados (*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* y *Bacillus longum*) a diferentes dosis de inoculación y temperaturas.

De acuerdo con Mintel (2017), en el mercado de los productos de chocolate con probióticos y prebióticos predominan las tabletas amargas y semi amargas bajo las marcas Active D'Lites® y At-tune Foods®, todas distribuidas en Estados Unidos y Australia. La empresa The Happy Sol Food Company® comercializa unos snacks con piezas de chocolate adicionados con probióticos. En el campo de las barras cubiertas con chocolate la empresa Forte Powerfoods® de Estados Unidos ha lanzado productos bajo la marca Truth®. Adicionalmente hay productos de chocolate adicionado con probióticos y prebióticos lanzados en China, Polonia y Reino Unido.

CONCLUSIÓN CAPÍTULO 8.

Probióticos en la industria alimentaria

La aplicación de probióticos en diferentes matrices alimentarias es esencial para diversificar las opciones de consumo y facilitar la incorporación de estos microorganismos beneficiosos en la dieta diaria. Al adaptar los probióticos a distintas presentaciones como productos lácteos, bebidas, cereales, y alimentos fermentados, se amplía su alcance y se favorece la aceptación por parte de diferentes grupos de consumidores. Esta versatilidad permite mantener la viabilidad y funcionalidad de los probióticos, asegurando su efecto positivo sobre la salud intestinal, el sistema inmunológico y el bienestar general. Por ello, el desarrollo de alimentos probióticos en diversas matrices representa una estrategia innovadora y efectiva para fortalecer la salud pública a través de la alimentación.

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOTÉCNICA**

Referencias bibliográficas



- Acosta-Gnass, S. I., y de Andrade Stempliuk, V. (2008). *Manual de esterilización para centros de salud. Organización Panamericana de la Salud*. https://www.paho.org/sites/default/files/amr_manual_esterilizacion.pdf
- Ağçam, E., Akyıldız, A., & Dündar, B. (2018). Thermal Pasteurization and Microbial Inactivation of Fruit Juices. En B. K. Tiwari (Ed.), *Fruit Juices* (pp. 309–339). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00017-5>
- Agrolechero. (2018). *Pruebas microbianas en placa pelable*. Charm, Sciences INC.
- Aguirre-Medina, J. F., Ley-De Coss, A., Velazco-Zebadúa, M. E., & Aguirre-Cadena, J. F. (2015). Crecimiento de *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit inoculada con hongo micorrízico y bacteria fijadora de nitrógeno en vivero. *Quehacer Científico En Chiapas*, 10(1), 15–22.
- Amézquita-Tovar, J. C., y Carvajal-Ahumada, L. A. (2022). Generalidades sobre métodos de desinfección mediante radiación UV. *Revista RETO*, 10(1), 9–21. <https://doi.org/10.23850/reto.v10i1.5463>
- Anchante, H. (2010). *Gestión del programa de bioseguridad en laboratorios*. Material académico / capacitación en bioseguridad.
- Aragno, M., y Verstraete, W. (2011). *Applied microbial ecology. Frontiers in Microbiology*, 2, 70. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00070>
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.07.013>
- Arce-Gil, Z., & Asalde-Ramos, R. (2012). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo - Chiclayo. *Revista Del Cuerpo Médico Del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 5(1), 33–35.
- Asociación Internacional de Transporte Aéreo (IATA). (2025). *Reglamentación sobre mercancías peligrosas (DGR)* (66.ª ed.). IATA.
- Ballesteros-Trujillo, M., Hernández-Barriel, M., Rosa-Gómez, I., Mañón-Salas, M., & Carreño-De León, M. (2018). Crecimiento microbiano en pilas de compostaje de residuos orgánicos y biosólidos después de la aireación. *Revista Centro Azúcar*, 45(1)1–10.

- Ballesteros, V. L., Cuadros Urrego, Y., Botero Botero, S., & López Arango, Y. (2009). *Factores de riesgo biológicos en recicladores informales de la ciudad de Medellín, 2005*. Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 26(2), 1–9.
- Baranyi, J., Rockaya, M., & Ellouze, M. (2024). From data to models and predictions in food microbiology. *Current Opinion in Food Science*, 57, 101177. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2024.101177>
- Bartley, P. S., Domitrovic, T. N., Moretto, V. T., Santos, C. S., Ponce-Terashima, R., Reis, M. G., & Perez, F. (2019). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae from surface waters in urban Brazil highlights the risks of poor sanitation. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100(6), 1369–1377. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0726>
- Besmer, M. D., Sigrist, J. A., Props, R., Buyschaert, B., Mao, G., Boon, N., & Hammes, F. (2017). Laboratory-Scale Simulation and Real-Time Tracking of a Microbial Contamination Event and Subsequent Shock-Chlorination in Drinking Water. *Frontiers in Microbiology*, 8 : 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01900>
- Bi, M., Yang, K., Yu, T., Wu, G., & Li, Q. (2023). Cell-based mechanisms and strategies of co-culture system both *in vivo* and *in vitro* for bone tissue engineering. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 169, 115907. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115907>
- Bi, Xin., Li, Bin ., Zou et al. (2023). Fascia Promotes Adipose Tissue Regeneration by Improving Early Macrophage Infiltration after Fat Grafting in a Mouse Model. *Plastic and Reconstructive Surgery* 152(3):p 446e-457e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000010259
- Bruno-Salabarría, M. S., & Fuentes-Bedoya, E. A. (2020). *Análisis de peligros y puntos críticos de control (haccp): sistema para la gestión de la inocuidad en las industrias agroalimentarias en Colombia* [Trabajo de Grado, Universidad de Córdoba]
- Brusch, G., & Záchia, M. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103, 123–128.

- Çabuk, B., & Telliöglu Harsa, Ş. (2015). Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under *in vitro* gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 120(6), 650–656. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.04.014>
- Cai, Y. (1999). Identification and characterization of Enterococcus species isolated from forage crops and their influence on silage fermentation. *Journal of Dairy Science*, 82(11), 2466–2471. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75498-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75498-6)
- Calpa-Yama, F., Chaspuengal-Tulcan, A., & Jurado-Gámez, H. (2014). Determinación *in vitro* de la acción probiótica de *Lactobacillus plantarum* sobre Yersinia pseudotuberculosis aislada de cavia porcellus. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 61(3), 241–257. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15446/rfmvz.v61n3.46872>
- Camaró-Sala, M. L., Martínez-García, R., Olmos-Martínez, P., Catalá-Cuenca, V., Ocete-Mochón, M. D., & Gimeno-Cardona, C. (2015). Validación y verificación analítica de los métodos microbiológicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(7), e31–e36. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.010>
- Cano-Chauca, M., Stringheta, P., & Ramos-Mota, A. (2005). Effect of the carriers on the microstructure of mango powder spray drying and its functional characterization. *Innovative Food Science & Emerging*, 6(4), 420–428.
- Caro-Astorga, J., Meyerowitz, J. T., Stork, D. A., Nattermann, U., Pisz-kiewicz, S., Vimercati, L., Schwendner, P., Hocher, A., Cockell, C., & DeBenedictis, E. (2024). *Polyextremophile engineering: a review of organisms that push the limits of life*. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1341701. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1341701>
- Carrillo, L., & Audisio, M. C. (2007). Microbiología de los alimentos: Cap. 2. Factores que influyen en el crecimiento microbiano (pp. 25-30). Universidad Nacional de Jujuy. https://bluebooksoft.com/INDUSTRIAS_ALIMENTARIAS/1122.pdf
- Ceballos, A.M., Giraldo, G.I., Orrego, C.E. (2012). Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp.

Journal of Food Engineering ; 111: 360–365.

- Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarcino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*. Asociación Argentina de Microbiología.
- Charm Sciences, Inc. (2015). *Charm KIS Test for antimicrobial drug detection in kidney tissue [Ficha técnica]*. <https://www.charm.com/wp-content/uploads/2018/06/MRK-083.pdf>
- Chen, C., Li, M., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Chen, W., & Zhai, Q. (2024). Comparative genomics of *Lactiplantibacillus plantarum* reveals the role of the two-component system in response to bile salts stress. *Food Bioscience*, 61, 104803. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104803>
- Chen, N. H., Djoko, K. Y., Veyrier, F. J., & McEwan, A. G. (2016). Formaldehyde Stress Responses in Bacterial Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7 : 1-17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00257>
- Chen, C., Li, M., Yu, L., Tian, F., Zhao, J., Chen, W., & Zhai, Q. (2024). Comparative genomics of *Lactiplantibacillus plantarum* reveals the role of the two-component system in response to bile salts stress. *Food Bioscience*, 61, 104803. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.104803>
- Chiong-Lay, M., Márquez-Romegialli, F., Vironneau-Janicek, L., Álvarez-Santana, M., Tischler, N., Piñones-Olmos, O., & Moreno-Mau-ro, R. (2018). *Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados*. Asociados-Fondecyt-CONICYT
- Choi, J. K., Poudel, S., Yee, N., y Goff, J. L. (2024). Deeply branching *Bacillota* species exhibit atypical Gram-negative staining. *Microbiology Spectrum*, 12(10). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00732-24>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2024). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* (34th ed.). CLSI.
- Córsico, B., Falomir Lockhart, L. J., Franchini, G. R., y Scaglia, N. (2014). Capítulo 13. En *Análisis estructural y funcional de ma-*

cromoléculas (pp. 354–388). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/37269/Documento_completo.pdf?sequence=1

- Crueger, W., y Crueger, A. (1993). *Bioteología: Manual de microbiología industrial* (2.^a ed.). Editorial Acribia.
- Dahl, T. A., Midden, W. R., & Hartman, P. E. (1988). Some prevalent biomolecules as defenses against singlet oxygen damage. *Photochemistry and Photobiology*, 47(3), 357–362. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1988.tb02737.x>
- Daza-Pérez, M. A., & Martínez-Benavides, D. X. (2015). Contaminación Microbiológica del aire al interior y el síndrome del edificio interno. *Biociencias*, 10(2), 37–50.
- Dion, P. (2023). Microbiology of extreme soil environments. En M. Goss, M. Oliver (Ed.), *Encyclopedia of Soils in the Environment* (pp. 494–511). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822974-3.00109-9>
- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., y Shah, N. P. (2007). Rheological properties and sensory characteristics of set-type soy yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(24), 9868–9876. <https://doi.org/10.1021/jf071050r>
- Doyle, S. E., Cazzola, C. N., & Coleman, C. M. (2024). Design considerations when creating a high throughput screen-compatible *in vitro* model of osteogenesis. *SLAS Discovery*, 29(7), 100184. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.100184>
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1951). A Colorimetric Method for the Determination of Sugars. *Nature*, 168, 167–167.
- Ehrhardt, K., Becker, A.-L., & Grassl, G. A. (2023). Determinants of persistent *Salmonella* infections. *Current Opinion in Immunology*, 82, 102306. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2023.102306>
- Eren, A. M., & Banfield, J. F. (2024). Modern microbiology: Embracing complexity through integration across scales. *Cell*, 187(19), 5151–5170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.08.028>

- Espinoza-Santillán, D., Martínez-Juárez, V., Peralta-Ortiz, J., Molina-Mendoza, P., Olave-Leyva, J., & Ávila-Castillo, R. (2016). Estudio bacteriano en úteros de vacas sacrificadas en el rastro municipal de Tulancingo, Hidalgo. *Abanico Veterinario*, 6(1), 22–28.
- Estacio, R. C., Kron, M. A., Janlav, M., Yu, G. F. B., & Macaulay, J. O. (2020). Postgraduate programs in biochemistry and molecular biology: A parallel session at the IUBMB/PSBMB 2019 “Harnessing Interdisciplinary Education in Biochemistry and Molecular Biology” conference. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 48(6), 625–630. <https://doi.org/10.1002/bmb.21444>
- Fajardo-Argoti, C., Jurado-Gámez, H., & Parra-Suescún, J. (2021). Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre *Escherichia coli* O157: H7. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 24(1), e1733. <https://doi.org/https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1733>
- Freudig, B., Hoge Kamp, S., & Schubert, H. (1999). Dispersion of powders in liquids in a stirred vessel. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 38(4–6), 525–532. [https://doi.org/10.1016/S0255-2701\(99\)00049-5](https://doi.org/10.1016/S0255-2701(99)00049-5)
- Fritzen-Freire, CB., Prudêncio, ES., Amboni, RD., Pinto, SS., Ne-grão-Murakami, AN., Murakami, FS. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*; 45: 06–312.
- Gallandat, K., Kolus, R. C., Julian, T. R., & Lantagne, D. S. (2021). A systematic review of chlorine-based surface disinfection efficacy to inform recommendations for low-resource outbreak settings. *American Journal of Infection Control*, 49(1), 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.05.014>
- Gamboa-Capacho, G. (2019). Limpieza y desinfección relacionada con transmisión de microorganismos patógenos. *Revista Criterios*, 26(1), 71–79.
- García-Doval, C. (2013). *Estructura de fibras de bacteriófagos* [Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid]

- Garner, D., y Gandhi, K. J. (2019). *Microbiology Nuts & Bolts: Key Concepts of Microbiology & Infectious Diseases (3.ª ed.)*. CreateSpace Independent Publishing Platform. <https://pdfcoffee.com/preview-microbiology-nuts-bolts-pdf-free.html>
- González Cuello, R. E., Pérez Mendoza, J., & Morón Alcázar, L. B. (2015). Efecto de la microencapsulación sobre la viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a jugos gástricos simulados. *Información Tecnológica*, 26(5), 11–16. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000500003>
- González Meléndez, R. C., Elizalde Cuevas, B., Cortés Cruz, M. E., y Orduña Sánchez, M. (2018). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología: un enfoque gráfico*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>
- González-Tello, P., Camacho, F., Guadix, E., Luzón, G., & González, P. (2007). Density, viscosity and surface tension of whey protein concentrate solutions. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 235–247. DOI: 10.1111/j.1745-4530.2007.00213.x
- Google Gemini. (2026). Ciclo de replicación de un bacteriófago T4. [Imagen generada por IA]. <https://gemini.google.com/>
- Hageskal, G., Lima, N., & Skaar, I. (2009). The study of fungi in drinking water. *Mycological Research*, 113(2), 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.10.002>
- Heller, K. J., Bockelmann, W., Schrezenmeir, J., y de Vrese, M. (2003). Cheese and its potential as a probiotic food. En E. R. Farnworth (Ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (pp. 203–222). CRC Press.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>

- Jaramillo-Prado, L. D. (2018). *Optimización de un proceso de digestión anaerobia de vinaza usando una estrategia de enriquecimiento con microorganismos pre-adaptados* [Trabajo de Grado, Universidad ICESI].
- Job, K., Carstensen, K., & Anelich, L. E. (2023). Microbiological safety in food retail. En M. Knowles, L. Anelich, A. Boobis, B. Popping (Ed.) *Present Knowledge in Food Safety* (pp. 502–514). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819470-6.00077-9>
- Jones, S., Reagan, K., & Saunders, N. (2023). Antiseptics, Disinfectants, and Sterilization. En M. Burkitt, H. Davis (Ed.) *Advanced Monitoring and Procedures for Small Animal Emergency and Critical Care* (pp. 837–844) Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119581154.ch64>
- Jurado, H., & Insuasty, E. (2021). *Procedimientos de tecnología de carnes editorial Universidad de Nariño*. <https://sired.udenar.edu.co/7320/1/libro%20carnes%20digital.pdf> Kanbe, M.M. (1992). Functions of fermented milk, Cap. 2, Y. Nakazawa & A. Hosono (Editores), Elsevier Science Publishers Ltd., Cambridge.
- Jurado Gámez, H., & Fajardo Argoti, C. (2017). Determinación del efecto probiótico *In vitro* de *Lactobacillus gasseri* sobre una cepa de *Staphylococcus epidermidis*. *Biosalud*, 16(2), 53–69. <https://doi.org/10.17151/biosa.2017.16.2.6>
- Jurado-Gámez, H., Fajardo-Argoti, I. C., & Parreño-Salas, J. J. (2021). *Procedimientos de laboratorio de Microbiología Zootécnica*. (1.ª ed.) Editorial Universidad de Nariño.
- Jurado-Gámez, H., Muñoz-Domínguez, L., Quitiaquez-Montenegro, D., Fajardo-Argoti, C., & Insuasty-Santacruz, E. (2019). Evaluación de la calidad composicional, microbiológica y sanitaria de la leche cruda en el segundo tercio de lactancia en vacas lecheras. *Revista de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 66(1). 53-66. <https://doi.org/10.15446/rfmvz.v66n1.79402>
- Jurado-Gámez, H., Solarte-Portilla, C., Burgos-Arcos, A., González-Rodríguez, A., & Rosero-Galindo, C. (2020). Relationship of the compositional content and sanitary quality of Holstein cows' milk of the high tropic of Nariño. *Revista Mexicana de Ciencias*

- Pecuarías*, 11(2), 421–434. <https://doi.org/https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i2.5118>
- Katsini, L., Bhonsale, S., Akkermans, S., Roufou, S., Griffin, S., Valdramidis, V., Misiou, O., Koutsoumanis, K., Muñoz López, C. A., Polanska, M., & Van Impe, J. F. M. (2022). Quantitative methods to predict the effect of climate change on microbial food safety: A needs analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 126, 113–125. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.041>
- Konar, N., Palabiyik, I., Toker, O. S., Polat, D. G., Kelleci, E., Pirouzian, H. R., Akcicek, A., & Sagdic, O. (2018). Conventional and sugar-free probiotic white chocolate: effect of inulin DP on various quality properties and viability of probiotics. *Journal of Functional Foods*, 43, 206–213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.016> » <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2018.02.016>
- Koseki, S., Koyama, K., & Abe, H. (2021). Recent advances in predictive microbiology: theory and application of conversion from population dynamics to individual cell heterogeneity during inactivation process. *Current Opinion in Food Science*, 39, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.019>
- Kumar, V., Ahire, J. J., & Taneja, N. K. (2024). Advancing microbial food safety and hazard analysis through predictive mathematical modeling. *The Microbe*, 2, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100049>
- Larrea-Murrell, J. A., Rojas-Badía, M. M., Romeu-Álvarez, B., Rojas-Hernández, N. M., & Heydrich-Pérez, M. (2013). Bacterias indicadoras de contaminación fecal en la evaluación de la calidad de las aguas: revisión de la literatura. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 44(3), 24–34.
- Leal, S. M., Rodino, K. G., Fowler, W. C., & Gilligan, P. H. (2021). Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: Diagnosis of Ocular Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(3: 1-12). <https://doi.org/10.1128/CMR.00070-19>
- Linda, O., & García, A. (2020). *Riesgos biológicos en los trabajadores de la salud. una revisión documental* [Trabajo de Grado, Universidad CES]

- Łobacz, A., Żulewska, J., & Kowalik, J. (2022). Predictive microbiology and risk analysis. En A. Gomes de la Cruz, C. Seneka, F. Nazzaro, A. Mortazavian (Ed.), *Dairy Foods* (pp. 47–68). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820478-8.00011-0>
- Maidana, L. G., Gerez, J., Pinho, F., Garcia, S., & Bracarense, A. P. F. L. (2017). *Lactobacillus plantarum* culture supernatants improve intestinal tissue exposed to deoxynivalenol. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 69(8), 666–671. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.06.005>
- Mao, L., Pan, Q., Yuan, F., & Gao, Y. (2019). Formation of soy protein isolate-carrageenan complex coacervates for improved viability of *Bifidobacterium longum* during pasteurization and *in vitro* digestion. *Food Chemistry*, 276, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.026>
- Mccormick, K., & Sanders, J. H. (2022). Pharmaceutical microbiology. En K. Mccormick, J. Sander (Ed.), (pp. 299–325). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90815-3.00013-X>
- Montes, A., Santacruz, A., y Sañudo, J. (2003). *Efecto in vitro de Lactobacillus casei subsp. rhamnosus sobre el crecimiento de un aislado de Helicobacter pylori* [Trabajo de grado, Universidad de Nariño]. Facultad de Ciencias Matemáticas y Naturales.
- Moreno, A. E., Rojas, D. F., & Bonilla, R. R. (2011). Aplicación de diseños estadísticos secuenciales en la identificación de fuentes nutricionales para *Azotobacter chroococcum* AC1. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 12(2), 151–158. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:226
- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Current Protocols in Microbiology*, 15(1-10). <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs15>
- Ñacato-Anchaluisa, B. R. (2022). *Implementación de un protocolo de control de calidad para la esterilización de desechos biocontaminados producidos en el laboratorio de microbiología del Hospital General Ambato* [Trabajo de Maestría, Universidad Técnica de Ambato]

- Navarro, E. (2018). *Guía de laboratorio de Bromatología y Microbiología de Alimentos*. Acibia
- Nguyen, A.-L. V., Julian, S., Weng, N., & Flannigan, R. (2024). Advances in human *In vitro* spermatogenesis: A review. *Molecular Aspects of Medicine*, 100, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2024.101320>
- Organización Mundial de la Salud. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (3.ª ed.). OMS. <https://iris.who.int/handle/10665/43255>
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Manual de bioseguridad en el laboratorio* (4.ª ed.). OMS. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789240011311>
- Pan, C., Wang, X., Yang, C., Fu, K., Wang, F., & Fu, L. (2024). The culture and application of circulating tumor cell-derived organoids. *Trends in Cell Biology*. (1-17) <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2024.10.004>
- Pandey, Kavita. R., Naik, Suresh. R., & Vakil, Babu. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1>
- Pares-Farras, R., & Juarez-Gimenez, A. (1997). *Bioquímica de los microorganismos*. Editorial Reverté.
- Patel, H. K., Kalaria, R. K., Kahimani, M. R., Shah, G. S., & Dholakiya, B. Z. (2021). Prevention and control of mycotoxins for food safety and security of human and animal feed. En V. Kumar, M. Shan, S. Parmar, A. Kumar (Ed.), *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture, Environment and Nano-technology* (pp. 315–345). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821734-4.00013-7>
- Pérez-Rodríguez, F., García, R. P., & Ramos, J. J. (2013). Antibiotic resistance in the food chain: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 166(3), 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.ijfood-micro.2013.08.004>
- Pérez, C., Peluffo, G., Giachetto, G., Mencheca, A., Pérez, W., Machado, K., Cristoforene, N., Alamilla, M., Acosta, V., Bruneto, M., Assandri, M., Toscano, B., Telechea, H., Rompani, E., Morosini, F., Taboada,

- R., Notejane, M., Pacaluk, M., Pujadas, M., Varela, A. (2020). El laboratorio de microbiología en la estrategia de atención de niños hospitalizados por infecciones respiratorias agudas bajas. *Archivos de Pediatría Del Uruguay, Suplemento*, 91 (S1), 1–2.
- Racioppo, A., & Guerrieri, A. (2025). Fungi. En A. Bevilacqua, M. Corbo, M. Sinigaglia (Ed.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 175–195). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91160-3.00009-X>
- Ramos, G. L., Nascimento, J. S., Margalho, L. P., Duarte, M. C., Esmerino, E. A., Freitas, M. Q., Cruz, A. G., & Sant’Ana, A. S. (2021). Quantitative microbiological risk assessment in dairy products: Concepts and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.017>
- Ricke, S., Donaldson, J., & Phillips, C. (2015). *Food Safety*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-14380-2>
- Rodríguez-Arzave, J. A., Hernández-Torres, M., Estrada-Garza, E., & Santoyo-Stephano, M. (2018). Índice de saponificación de Cremas de leche y Cremas vegetales. *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 371–375.
- Rodríguez-Barahona, C. M., Corrales-García, J., Hernández-Montes, A., Ybarra-Moncada, M. del C., & García-Mateos, M. del R. (2015). Contenido fitoquímico de jugo de noni (*Morinda citrifolia*) microencapsulado en emulsiones W/O/W. *Revista CENIC. Ciencias Químicas*, 46, 26–30.
- Rodríguez-Barona, S., Giraldo, G. I., & Montes, L. M. (2016). *Encapsulación de alimentos probióticos mediante liofilización en presencia de prebióticos*. *Información Tecnológica*, 27(6), 135–144. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600014>
- Rodríguez-Gonzales, M. (2009). *Aislamiento y seleccion de cepas del género Lactobacillus con capacidad probiotica e inmunomoduladora* [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]
- Romero, C. (2009). *Material de laboratorio II [Material de cátedra]*. Universidad Nacional de Catamarca. <https://editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/CUADERNOS%20DE%20CATE->

[DRA/cesar%20Romero/MATERIAL%20DE%20%20LABORATORIO%20II%202009-04.pdf](#)

- Rutala, W. A., Donskey, C. J., & Weber, D. J. (2023). Disinfection and sterilization: New technologies. *American Journal of Infection Control*, 51(11), A13–A21. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2023.01.004>
- Salina, M., et al. (2018). *Portación de Staphylococcus aureus en manipuladores de alimentos de servicios gastronómicos de Asunción, Paraguay (2017)*. *Revista de Salud Pública del Paraguay*, 8(2), 28–33.
- Samaniego-Moreno, L., Vidales-Contreras, J. A., García-Zambrano, R., Rodríguez-Fuentes, H., Olivares-Saenz, E., Vázquez-Alvarado, R., Sánchez-Alejo, E., & Gortares-Moroyoqui, P. (2012). Supervivencia de bacteriófagos en una presa recreativa del noreste de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(2), 187–194.
- Samson, R., Dharne, M., & Khairnar, K. (2024). Bacteriophages: Status quo and emerging trends toward one health approach. *Science of The Total Environment*, 908, 168461. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168461>
- Sánchez, J., Correa, M., & Castañeda-Sandoval, L. M. (2016). *Bacillus cereus* un patógeno importante en el control microbiológico de los alimentos. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 34(2), 230-242. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v34n2a12>
- Santori, D., Gelli, A., Meneguz, M., Mercandino, S., Cucci, S., & Sezzi, E. (2024). Microbiological stability of *Hermetia illucens* meal subjected to two different heat treatments. *Journal of Stored Products Research*, 109, 102440. <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2024.102440>
- Serna-Cock, L., Pabón-Rodríguez, O. V., & Giraldo-Gómez, G. I. (2018). Adhesion Capacity of *Weissella cibaria* to Bovine Mammary Tissue and the Effect of Bio-Sealant Topical Application on Physicochemical Properties of Milk. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 11(4), 1293–1299. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9481-0>
- Serna Jiménez, J. A. (2012). *Elaboración de jugos de fruta con adición*

de bacterias ácido-lácticas con potencial probiótico (Master's thesis, Universidad de La Sabana).

- Siebert, M., Lhomme, C., Carbonnelle, E., Trésallet, C., Kolakowska, A., & Jaureguy, F. (2023). Microbiological epidemiology and antibiotic susceptibility of infected meshes after prosthetic abdominal wall repair. *Journal of Visceral Surgery*, 160(2), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.jviscsurg.2023.02.007>
- Song, X., Wang, Q., Xu, X., Lin, J., Wang, X., Xue, Y., Wu, R., & An, Y. (2016). Isolation and analysis of salt response of *Lactobacillus plantarum* FS5-5 from Dajiang. *Indian Journal of Microbiology*, 56(4), 451–460.
- Srivastava, A. (2024). Artificial intelligence as a smart approach En A. Srivastava, V. Mishra (Ed.), *Methods in Microbiology* (pp. 87–99). Academic Press <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2024.05.010>
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., & Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40(3), 722–756.
- Thaddeus, N., Francis, E., Jane, O., Obumneme, A., & Okechukwu, E. (2018). Effects of some common additives on the antimicrobial activities of alcohol-based hand sanitizers. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 11(3), 222–226. <https://doi.org/10.4103/1995-7645.228437>
- Theel, E. S., & Schuetz, A. N. (2022). Interacting with the Clinical Microbiology Laboratory. En Z. Temesgen (Ed.), *A Rational Approach to Clinical Infectious Diseases* (pp. 12–33). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-69578-7.00002-8>
- Torres-Arroyo, E. L., Gracia-Herrera, L., Thorrens-Romero, E., & Villagas-Gracia, R. (2021). *Manual de Introducción a la Microbiología*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba.
- Trevedi, P., Pandey, S., & Bhadauria, S. (2010). *Text Book of Microbiology*. Aavishkar Publishers, Distributors.
- Universidad Autónoma de San Luis Potosí. (2019). *Manual de manejo de equipo: Laboratorio de Microbiología*. Repositorio Institucional UASLP. <https://repositorioinstitucional.uaslp.mx/xmlui/bitstream/handle/i/4793/Manual%20de%20manejo%20de%20>

[equipo.pdf](#)

- Vargas-Flores, T., & Kuno-Vargas, A. (2014). Morfología Bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 2494–2598.
- Visser, R., Holzapfel, W. H., Bezuidenhout, J. J., & Kotzé, J. M. (1986). Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 552–555.
- Wai, H. H., Shiekh, K. A., Jafari, S., Kijpatanasilp, I., & Assatarakul, K. (2024). Ultraviolet irradiation as alternative non-thermal cold pasteurization to improve quality and microbiological parameters of mango juice during cold storage. *International Journal of Food Microbiology*, 415, 110632. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110632>
- Weber, F., & Schieber, A. (2023). When microbiology meets chemistry: generation, properties and prospects of pyranoanthocyanins as natural food colorants. *Current Opinion in Food Science*, 51, 101019. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2023.101019>
- Wildbrett, G. (2000). *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Editorial Acribia S.A.
- World Health Organization. (2019). *Benchmarks for International Health Regulations (IHR) Capacities*. Geneva: World Health Organization. IRIS.
- Wurtz, N., Papa, A., Hukic, M., Di Caro, A., Leparc-Goffart, I., Leroy, E., Landini, M. P., Sekeyova, Z., Dumler, J. S., Bădescu, D., Busquets, N., Calistri, A., Parolin, C., Palù, G., Christova, I., Maurin, M., La Scola, B., & Raoult, D. (2016). Survey of laboratory-acquired infections around the world in biosafety level 3 and 4 laboratories. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(8), 1247–1258. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2657-1>
- Xu, Z., Zhou, J., Ren, T., Du, H., Liu, H., Li, Y., & Zhang, C. (2020). Salt stress decreases seedling growth and development but increases quercetin and kaempferol content in *Apocynum venetum*. *Plant Biology*, 22(5), 813–821. <https://doi.org/10.1111/plb.13128>
- Yang, X., Wang, D., Zhou, Q., Nie, F., Du, H., Pang, X., Fan, Y., Bai, T., & Xu, Y. (2019). Antimicrobial susceptibility testing of Entero-

bacteriaceae: determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam. *BMC Microbiology*, 19(1), 240-246. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1613-5>

Zhao, W., Shi, Y., Liu, G., Yang, J., Yi, B., Liu, Y., Kastelic, J. P., Han, B., & Gao, J. (2021). Bacteriophage has beneficial effects in a murine model of *Klebsiella pneumoniae* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 3474–3484. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19094>

Zúñiga-Carrasco, I., & Reyna, M. D. (2021). Secadores de manos: dispersores de patógenos para el ser humano y su entorno. *Revista de enfermedades infecciosas en pediatría*, 33(135), 1804-1808.

Índice de Figuras

Figura 1. Cámara de flujo laminar.	28
Figura 2. Infografía Cámara de flujo laminar.	29
Figura 3. Micropipetas de volumen variable.	39
Figura 4. Batas.	41
Figura 5. Material de vidrio.	52
Figura 6. Tubos de ensayo con muestras microbiológicas.	53
Figura 7. Cajas de Petri.	53
Figura 8. Pipeteo en cámara de flujo laminar.	54
Figura 9. Erlenmeyer.	54
Figura 10. Beakers.	55
Figura 11. Perlas de vidrio.	56
Figura 12. Potenciómetro.	56
Figura 13. Infografía Potenciómetro.	57
Figura 14. Centrífuga de alta velocidad.	57
Figura 15. Infografía Centrífuga de alta velocidad.	58
Figura 16. Incubadoras.	58
Figura 17. Infografía Incubadora.	59
Figura 18. Baño maría.	59
Figura 19. Espectrofotómetro.	60
Figura 20. Infografía espectrofotómetro.	60
Figura 21. Autoclave.	61
Figura 22. Infografía autoclave.	61
Figura 23. Microscopio.	62
Figura 24. Tinción de Gram.	66
Figura 25. Infografía Microscopio digital o electrónico.	67
Figura 26. Incubadora.	78
Figura 27. Autoclave vertical, permite la destrucción de microorganismos.	80
Figura 28. Luz ultravioleta en la cámara de flujo laminar.	82
Figura 29. Luz ultravioleta.	87
Figura 30. Control por pozos.	94
Figura 31. Control por sensidisco.	95
Figura 32. Cultivo ambiental.	97
Figura 33. Formas de agrupación de las colonias en el medio de cultivo.	98
Figura 34. Medio de cultivo.	99
Figura 35. Medios de cultivo sólido en tubo de ensayo.	100
Figura 36. Medios de cultivo sólido en cajas de Petri.	103
Figura 37. Siembra en tubo con medio inclinado.	105
Figura 38. Siembra en caja de Petri con medio sólido.	106
Figura 39. Siembra por estría en caja de Petri con medio sólido.	106

Figura 40. Métodos de siembra.....	109
Figura 41. Coloración simple.....	110
Figura 42. Coloración de Gram.....	117
Figura 43. Ciclo de replicación de un bacteriófago T4.....	122
Figura 44. Kirby Bauer.....	151
Figura 45. Cultivo de <i>Penicillium</i> sp. en agar Saboraud.....	157
Figura 46. Microcultivo de hongos en agar Saboraud.....	158
Figura 47. Textura algodonosa.....	159
Figura 48. Prueba presuntiva para coliformes totales.....	169
Figura 49. Determinación de antibióticos en leche.....	185
Figura 50. Prueba para recuento de células somáticas.....	187
Figura 51. Reconstitución de la cepa láctica.....	197
Figura 52. Microfotografía del microencapsulado.....	202
Figura 53. Aspersión del concentrado e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con <i>L. casei</i>	215
Figura 54. Preparado final.....	216
Figura 55. Microbiología predictiva.....	229

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOTÉCNICA

Los Autores





HENRY JURADO-GÓMEZ

Profesor Tiempo Completo, Categoría Profesor Titular del Programa de Zootecnia, Departamento de Producción y Procesamiento Animal, Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño. Zootecnista de la Universidad de Nariño; Especialista en Microbiología de la Universidad Católica de Manizales; Magister (M.Sc) en Microbiología Agropecuaria de la Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (UNESP), Campus de Jaboticabal, Sao Paulo, Brasil; Doctor (Ph.D) en Ingeniería con énfasis en Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle.

Actualmente, es Director del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS, investigador en las líneas de Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal, docente de pregrado y postgrado en las áreas Microbiología Zootécnica, Tecnología de Carnes, Tecnología de Leches, Metodología de la Investigación y Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal en el Programa de Zootecnia de la Universidad de Nariño. Autor de varios artículos y libros, y participante como ponente en seminarios y congresos.



IVONNE CATALINA FAJARDO-ARGOTI

Es candidata a doctora (Ph.D) en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, Magíster en Ciencias Agrarias de la misma universidad, y Zootecnista de la Universidad de Nariño. Con experiencia en formulación y ejecución de proyectos de investigación con financiación externa e interna, e investigadora del Grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS en la línea de investigación Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal y Agroindustriales, y autora y coautora de varios artículos científicos en revistas indexadas.



JOHN JAIRO PARREÑO-SALAS

Zootecnista de la Universidad. Actualmente Docente del Programa de Zootecnia de la Universidad de Nariño e Investigador en las líneas de fisiología, apicultura y Modelación Aplicada a la Producción Animal (bioestadística) en el grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS de la Universidad de Nariño, además de contar con la experiencia laboral en bioestadística y biomodelación.

editorial
Universidad de **Nariño**

**PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA**

Segunda edición 2025

San Juan de Pasto – Nariño – Colombia

Esta Segunda Edición del Libro denominado: “PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA”, se fundamentan principalmente en brindar con bastante claridad los principales procedimientos de laboratorio aplicados a la Microbiología Zootécnica. Lo anterior, constituye una herramienta muy importante dentro de los procesos de enseñanza-aprendizaje de la Zootecnia y de otras profesiones afines y que serán de gran ayuda en su formación y ejercicio diario de sus profesiones.

Por estas razones, esta Segunda Edición del Libro: “PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA”, tiene como objetivo en ofrecer a los Docentes, estudiantes y productores una serie de conocimientos que constituyen una orientación de los análisis que se realizan que a nivel de laboratorio de la Microbiología Zootécnica y que dado la importancia de los temas relacionados como lo son las técnicas de siembra de microorganismos, análisis de la distribución de bacterias en el medio ambiente, los diferentes fenómenos de fermentación, descomposición, pruebas de calidad de los diferentes productos cárnicos, lácteos, agua, ensilajes y en huevos, así como, la importancia de las bacterias ácido lácticas (BAL), la microencapsulación que se hace para favorecer su viabilidad, su interacción con los antibióticos, y la aplicación en diferentes matrices alimentarias y en animales, permiten comprender la gran relevancia de esta Segunda Edición.

Es importante, también tener en cuenta que la Segunda Edición del Libro: “PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA”, será una guía fundamental para todos los Docentes, estudiantes y productores en formular planes de bioseguridad, sobre todo cuando se trata de planificar estrategias conducentes a controlar a una gran variedad de microorganismos patógenos responsables de toxiinfecciones y por lo tanto, de enfermedades de transmisión alimentaria (ETAS), así como, de las técnicas a nivel de laboratorio para su efectivo control. De igual manera, la utilización de las BAL en alimentos de origen animal y vegetal, así como en animales, mejorará todos los procesos de transformación e industrialización y todo esto será definitivo para mejorar la inocuidad alimentaria, con un gran impacto en la salud humana y/o animal.



Universidad de Nariño
FUNDADA EN 1954



Universidad de Nariño
AUTORIZADA EN SU CALIDAD
RESOLUCIÓN MEN 00022 - ENERO 11 DE 2023

editorial
Universidad de Nariño