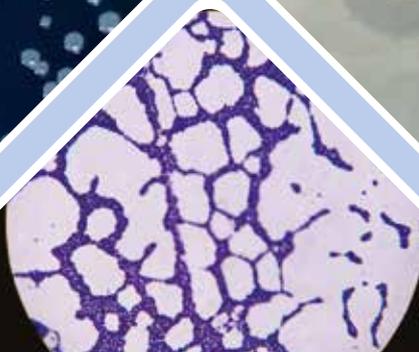
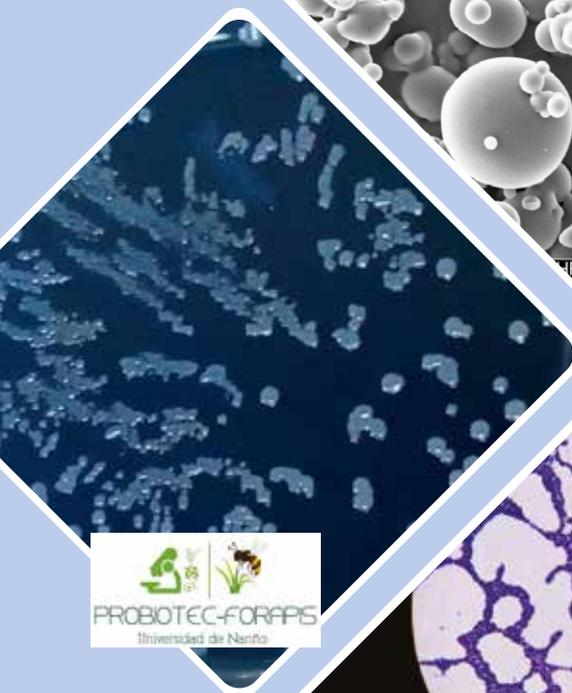
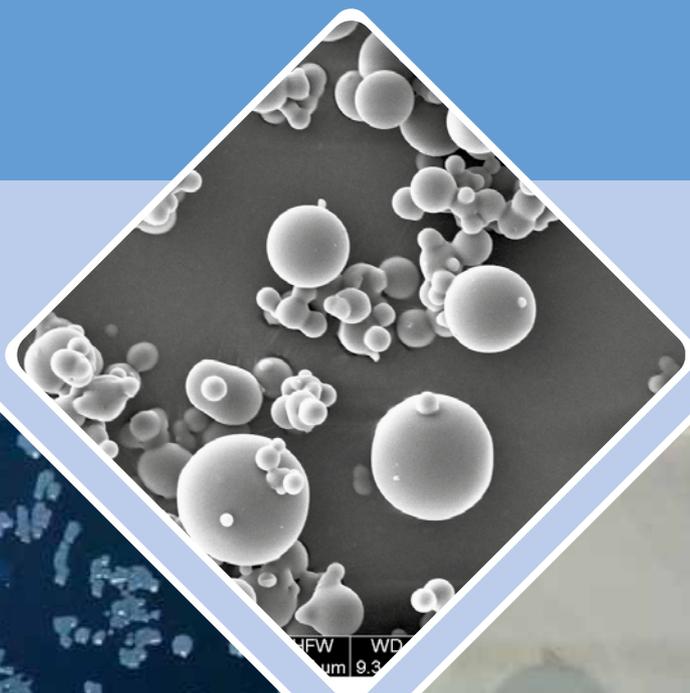


HENRY JURADO GÁMEZ
IVONNE CATALINA FAJARDO ARGOTI
JOHN JAIRO PARREÑO SALAS

PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA



Editorial
Universidad de Nariño



Editorial
Universidad de **Nariño**

Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica

Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica

Henry Jurado Gámez
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.- -1ª. ed.-
-San Juan de Pasto: Editorial Universidad de Nariño, 2021.

200p.: fig.; tablas

ISBN 978-958-5123-87-8 (Impreso)

ISBN 978-958-5123-88-5 (Digital)

1. Microbiología—alimentos (origen zootécnico) 2. Microbiología- Zootecnica. 3. Microorganismos –estudio. 4. Alimentos- bacteriología.

664.001579 G974 – SCDD-22

Biblioteca Alberto Quijano Guerrero

Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica

© Henry Jurado Gámez
henryjugam@gmail.com
Ivonne Catalina Fajardo Argoti
ivicaf2246@gmail.com
John Jairo Parreño Salas
jhonpasa@gmail.com

© Editorial Universidad de Nariño

ISBN: 978-958-5123-87-8 (impreso)

ISBN: 978-958-5123-88-5 (digital)

Primera edición

Junio de 2021

San Juan de Pasto, Nariño, Colombia

Impresión y encuadernación:

Graficolor Pasto sas

Calle 18 No. 29-67

Tels. 7310652 - 7311833

graficolorpasto@hotmail.com

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

Agradecimientos

Los Autores del presente Libro manifiestan sus más sinceros agradecimientos a la Universidad de Nariño por el apoyo y financiación para la publicación de esta obra.

Contenido

Prólogo	15
Introducción.....	17
CAPÍTULO 1. NORMAS DE TRABAJO DEL LABORATORIO Y TRABAJO EN EQUIPO	18
1.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO	18
1.1.1 Introducción	18
1.1.2 Objetivos	18
1.1.3 Marco teórico.....	19
1.1.3.1 Limpieza	20
1.1.3.2 Bioseguridad en el laboratorio.....	21
1.1.3.3 Seguridad biológica.....	21
1.1.3.4 El factor humano en la prevención de accidentes.....	22
1.1.3.5 Elementos de riesgo.....	23
1.1.3.6 Otras recomendaciones.....	25
1.1.3.7 Precauciones en el manejo de material biológico (Estacio <i>et al.</i> 2020).....	26
1.1.3.8 Clasificación de los agentes biológicos por grupos de riesgo	26
1.1.3.9 Clasificación de los laboratorios según su nivel de seguridad biológica	27
1.1.3.10 Normas para la vigencia de los trabajadores que manipulan microorganismos en el nivel de bioseguridad 1... ..	29
1.1.3.11 Normas para la vigencia de los trabajadores que manipulan microorganismos en el nivel de bioseguridad 2	30
1.2 EQUIPOS Y MATERIALES DE UN LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	47
1.2.1 Introducción	47
1.2.2 Objetivos	48
1.2.3 Materiales y equipos	49
1.2.3.1 Materiales de cristal.....	45
1.2.3.2 Equipos	50
1.3 EL MICROSCOPIO	54
1.3.1 Introducción	54
1.3.2 Objetivos	55
1.3.3 Marco teórico.....	55
1.3.3.1 Tipos de microscopio	55
1.3.4 El sistema de iluminación	59
1.4 MEDIDAS MICROSCÓPICAS.....	61
1.4.1 Introducción	61
1.4.2 Objetivo	61
1.4.3 Marco teórico.....	61
1.4.4 Materiales y equipos	62
1.4.5 Procedimiento	62

1.5	ESTERILIZACIÓN.....	64
1.5.1	Introducción	64
1.5.2	Objetivos	64
1.5.3	Marco teórico.....	65
1.5.3.1	Formas de esterilización.....	65
1.5.3.1.1	Esterilización por calor	65
1.5.3.1.2	Esterilización por filtración.....	69
1.5.3.1.3	Esterilización ultravioleta	69
1.5.4	Materiales y equipos	70
1.5.5	Procedimiento.....	71
1.6	EFFECTOS LETALES DE LA LUZ ULTRAVIOLETA.....	72
1.6.1	Introducción	72
1.6.2	Objetivo	73
1.6.3	Materiales.....	73
1.6.4	Procedimiento.....	73
1.6.5	Observaciones y resultados.....	74
Capítulo 2. PRÁCTICAS DE MICROBIOLOGÍA GENERAL		75
2.1	CONTROL MICROBIANO.....	75
2.1.1	Introducción	75
2.1.2	Objetivos	76
2.1.3	Marco teórico.....	76
2.1.4	Materiales y equipos	76
2.1.5	Procedimiento.....	77
2.2	PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA	80
2.2.1	Introducción	80
2.2.2	Objetivos	81
2.2.3	Materiales y equipos	81
2.2.4	Procedimiento.....	81
2.2.5	Observaciones y resultados	82
2.3	PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y MÉTODOS DE SIEM- BRA DE MICROORGANISMOS.....	82
2.3.1	Introducción	82
2.3.2	Objetivos	84
2.3.3	Materiales y equipos	84
2.3.4	Procedimiento.....	84
2.3.5	Observaciones y resultados.....	88
	ANEXO 1. Métodos de siembra.....	89
2.4	MORFOLOGÍA BACTERIANA Y FUNDAMENTOS DE TINCIÓN	89
2.4.1	Introducción	89
2.4.2	Objetivos	92
2.4.3	Materiales y métodos.....	92
2.4.4	Procedimiento.....	93
2.5	COLORACIONES DIFERENCIALES.....	95
2.5.1	Introducción	95
2.5.1.1	Coloración de Gram	95

2.5.1.2	Coloración de cápsula (método de Anthony)	96
2.5.1.3	Coloración de esporas	96
2.5.1.4	Prueba de KOH	97
2.5.2	Prueba de motilidad	97
2.5.3	Observaciones y resultados	98
2.6	AISLAMIENTO DE BACTERIÓFAGOS	98
2.6.1	Introducción	98
2.6.2	Objetivo	98
2.6.3	Marco teórico	99
2.6.3.1	Composición y estructura del bacteriófago	99
2.6.3.2	Ciclo de multiplicación del fago	101
2.6.4	Materiales	102
2.6.5	Procedimiento	102
2.6.6	Observaciones y resultados	103
2.7	METABOLISMO MICROBIANO: PRUEBAS BIOQUÍMICAS	103
2.7.1	Introducción	103
2.7.2	Identificación del Género <i>Staphylococcus</i>	104
2.7.2.1	Identificación de Microorganismos del Género <i>Streptococcus</i>	104
2.7.2.2	Esquema de identificación de Microorganismos Gramnegativos pertenecientes a la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	105
2.7.3	Esquema de identificación de bacterias gram positivas	108
2.7.3.1	Prueba de Catalasa	108
2.7.3.2	Prueba de Coagulasa	108
2.7.3.3	Fermentación Agar Manita Salada	109
2.7.3.4	Prueba de Tolerancia al NaCl 6.5%	109
2.8	PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS DE LA FAMILIA ENTEROBACTERIACEAE	110
2.8.1	Introducción	110
2.8.2	TSI (Triple Azúcar Hierro)	110
2.8.2.1	Objetivo	110
2.8.2.2	Materiales	110
2.8.3	Descarboxilasas	111
2.8.3.1	Materiales	111
2.8.4	Ureasa	111
2.8.4.1	Materiales	111
2.8.5	Movilidad	112
2.8.6	Indol	112
2.8.7	Producción de ácido sulfhídrico (H ₂ S)	112
2.8.8	Utilización de Citrato	113
2.8.9	Rojo metilo	113
2.8.10	Prueba Voges Proskauer	114
2.8.11	Prueba de oxidasa	115
2.9	CINÉTICA DE CRECIMIENTO MICROBIANO	116
2.9.1	Introducción	116
2.9.1.1	Crecimiento microbiano	116

2.9.2	Objetivos	118
2.9.3	Métodos	118
2.9.4	Procedimiento	119
2.9.5	Procedimiento	119
2.9.6	Interpretación	120
2.10	EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES USADOS EN LA INDUSTRIA LÁCTEA Y CÁRNICA: HIPOCLORITO DE SODIO	120
2.10.1	Introducción	120
2.10.2	Objetivos	123
2.10.3	Materiales por grupo	123
2.10.4	Procedimiento	124
2.11	ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER	125
2.11.1	Introducción	125
2.11.2	Objetivos	125
2.11.3	Materiales por grupo	126
2.11.4	Procedimiento	126
2.11.5	Interpretación	129
2.12	CULTIVO Y COLORACIÓN DE HONGOS (LACTOFENOL)	131
2.12.1	Introducción	131
2.12.2	Objetivos	132
2.12.3	Materiales	133
2.12.4	Metodología	133
	2.12.4.1 Preparación del microcultivo	133
2.12.5	Procedimiento para Microcultivo de Hongos	134
CAPÍTULO 3. MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN ZOOTÉCNICO		137
3.1	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO GENERAL	137
3.1.1	Identificación de bacterias Gram-positivas	137
	3.1.1.1 Prueba de catalasa	138
	3.1.1.2 Prueba de coagulasa	139
	3.1.1.3 Coliformes	140
3.1.2	Recuento de mesófilos aerobios	145
3.1.3	La familia Enterobacteriaceae	145
3.1.4	Identificación de <i>Escherichia coli</i>	150
3.1.5	<i>Staphylococcus aureus</i>	151
3.1.6	<i>Salmonella</i> sp	152
3.1.7	Esporas de <i>Clostridium</i> sulfito reductor	154
3.1.8	Identificación de <i>Listeria</i> sp	155
3.2	ANTIBIÓTICOS EN CARNE	156
3.3	ANTIBIÓTICOS EN LECHE	157
3.4	DETERMINACIÓN DE VOMITOXINAS	161
3.5	RECUESTO DE HONGOS Y LEVADURAS	162
	3.5.1 Prueba de la reducción de colorantes (azul de metileno)	163
	3.5.2 Prueba de la resazurina	165

CAPÍTULO 4. PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS A LA MICROBIOLOGÍA ZOOTÉCNICA	166
4.1 RECONSTITUCIÓN, CONSERVACIÓN, SIEMBRA Y CULTIVOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	166
4.2 CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS.....	168
4.2.1 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/ μ L.	168
4.2.2 Determinación de pH.....	169
4.2.3 Determinación de proteínas	169
4.2.4 Determinación de consumo de azúcares totales	170
4.3 DETERMINACIÓN DE PRODUCCIÓN DE ACIDEZ.....	170
4.4 CRECIMIENTO DE LAS CEPAS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NaCl	171
4.5 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOMASA	171
4.6 MICROENCAPSULACIÓN DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS ...	172
4.7 EVALUACIÓN DEL MICROENCAPSULADO	173
4.7.1 Estudio de supervivencia y estabilidad	173
4.7.2 Viabilidad.....	173
4.7.3 Humedad.....	174
4.7.4 Actividad de agua	174
4.7.5 Solubilidad.....	174
4.7.6 Humectabilidad	175
4.7.7 Eficiencia de la microencapsulación	175
4.8 PRUEBAS <i>IN VITRO</i>	176
4.8.1 Resistencia a diferentes niveles de temperatura	176
4.8.2 Producción de gas.....	176
4.8.3 Actividad de catalasa	176
4.8.4 Crecimiento de la BAL a diferentes concentraciones de NaCl ...	177
4.8.5 Exposición a condiciones gastrointestinales simuladas	177
4.8.6 Análisis de resistencia y liberación a jugos gástricos e intestinales ..	178
4.8.7 Verificación de producción de exopolisacáridos (EPS).....	180
4.8.8 Detección de capacidad amilolítica	180
4.8.9 Hidrolisis puntual del almidón	180
4.8.10 Ensayo de antagonismo bacterial.....	181
4.8.11 Capacidad de adherencia al epitelio intestinal - ensayos <i>Ex Vivo</i> ..	182
4.8.12 Evaluación in vivo	183
4.8.12.1 Inclusión y viabilidad en la ración de <i>Lactobacillus</i> sin microencapsular.....	183
4.8.12.2 Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración ..	184
4.8.13 Simulación in vitro del tránsito gastrointestinal	185
CAPÍTULO 5. MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS BALANCEADOS Y EL AGUA	186
5.1 MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS BALANCEADOS.....	186
5.2 MICROBIOLOGÍA DEL AGUA	188

CAPÍTULO 6. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	190
6.1 INTRODUCCIÓN	190
Referencias bibliográficas	193

Lista de tablas

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de algunas enterobacterias	115
Tabla 2. Inhibición	130
Tabla 3. Número más Probable (NMP)	144
Tabla 4. Interpretación de los resultados de la prueba de azul de metileno.	164
Tabla 5. Interpretación de los resultados de la prueba de azul de metileno.	165
Tabla 6. Bacterias Indicadoras de Inhibición	181
Tabla 7. Microorganismos y sus medios de cultivo.	182

Lista de figuras

Figura 1. Cámara de flujo laminar	29
Figura 2. Demostración de pipetas	37
Figura 3. Material de vidrio	48
Figura 4. Potenciómetro	50
Figura 5. Centrífuga de alta velocidad	50
Figura 6. Autoclave	51
Figura 7. Microscopio óptico	52
Figura 8. Incubadora	65
Figura 9. Autoclave vertical, permite la destrucción de microorganismos ...	67
Figura 10. Funcionando el ultravioleta	69
Figura 11. Luz ultravioleta	72
Figura 12. Control por pozos	79
Figura 13. Control por sensidisco	80
Figura 14. Formas de agrupación de las colonias en el medio de cultivo ...	82
Figura 15. Coloración de Gram	96
Figura 16. Ciclo de replicación de un bacteriófago T4	101
Figura 17. Prueba de azul	114
Figura 18. Kirby Bauer.	128
Figura 19. Prueba presuntiva para coliformes totales	143
Figura 20. Determinación de antibióticos en leche	159
Figura 21. Prueba para recuento de células somáticas	169
Figura 22. Reconstitución de la cepa láctica.	168
Figura 23. Microfotografía del microencapsulado	173
Figura 24. Aspersión del concentrado e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con <i>L. casei</i>	184
Figura 25. Preparado final.	184
Figura 26. Curva de crecimiento microbiano	191

Prólogo

El presente libro denominado “Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica” tiene el propósito de dar a conocer una serie de procedimientos como una herramienta valiosa para la enseñanza de la Microbiología en el campo de la Zootecnia y de Profesiones afines que les permitirá a estudiantes, profesionales y productores complementar su formación.

De esta manera, el presente libro tiene como finalidad ofrecer a los Docentes una guía de orientación y la planificación de los trabajos prácticos en el Laboratorio de Microbiología Zootécnica, y la cual se relaciona con temas como los fenómenos de fermentación, descomposición, putrefacción, aplicación de microorganismos en la elaboración de productos de origen animal y vegetal mediante la aplicación de procesos biotecnológicos con diferentes microorganismos. También se relaciona en el análisis en diferentes matrices alimenticias que permiten cuantificar el nivel de posibles contaminantes, que pueden ser causales de toxiinfecciones.

Así mismo, para los futuros profesionales de la Zootecnia y Profesiones afines, que tienen como base la producción, el procesamiento e industrialización animal les ayudará a desarrollar planes de bioseguridad, que son necesarios para trabajar con microorganismos patógenos y benéficos de diversos ambientes de laboratorio. Por lo anterior, se mejorará los procesos de transformación e industrialización de productos y sus derivados de origen animal y vegetal, así como también la sanidad de las explotaciones de interés zootécnico, con un impacto favorable en la inocuidad alimentaria.

Introducción

El Libro: “Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica”, brinda una información muy importante con las prácticas que a nivel de laboratorio se pueden desarrollar en relación con la Parte Zootécnica. De esta manera, se dan a conocer los diferentes análisis y metodologías que se deben realizar en el Laboratorio de Microbiología Zootécnica con un abordaje desde los procedimientos de Microbiología general hasta los análisis microbiológicos que se encaminan a los diversos alimentos como la carne, leche, los alimentos balanceados y el agua entre otros. También se destaca la importancia de los Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal y en especial las aplicaciones de las Bacterias Ácido Lácticas en ensayos in vitro e in vivo.

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. De igual manera, también existen una gran cantidad de microorganismos que son considerados GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) y que tienen importantes aplicaciones de carácter probiótico.

Es importante tener en cuenta que en los laboratorios deben seguir normas que garanticen el buen uso, la conservación de los elementos y equipos, y la seguridad de los estudiantes, docentes y auxiliares

que estén en el laboratorio. Esto ayudará a lograr los objetivos de los estudios que allí se desarrollen.

En este Libro Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica, se encontrarán los siguientes capítulos: Capítulo 1. NORMAS DE TRABAJO DE LABORATORIO Y TRABAJO EN EQUIPO; 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 y el Capítulo 6. MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA.

En todo el Texto se utiliza una serie de estrategias y herramientas pedagógicas, las cuales permitirán al lector ser fuente de consulta, de guía y de aporte al desarrollo técnico y científico en el área de la Microbiología Zootécnica.

Capítulo 1

Normas de trabajo de laboratorio

1.1 RECOMENDACIONES PARA EL TRABAJO EN LABORATORIO

1.1.1 Introducción

En el laboratorio 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 (Harrigan y McCance, 1968).

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 y Fuentes, 2021).

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.

1.1.3 Marco teórico

De acuerdo con Navarro (2018), los laboratorios deben seguir normas que garanticen el buen uso, la conservación de los elementos y equipos, y la seguridad de los estudiantes, docentes y auxiliares que estén en el laboratorio. Esto ayudará a lograr los objetivos de los estudios que allí se desarrollen. Las siguientes normas deben realizarse de la siguiente manera:

1. Usar siempre bata de laboratorio.
2. Antes de entrar a trabajar al laboratorio, lea el texto de la práctica que va a realizar y haga el plan de trabajo.
3. Antes y después de cada sesión de trabajo limpie los mesones con solución desinfectante (Alcohol o hipoclorito de sodio).
4. Antes y después de cada sesión lave las manos y aplique alguna solución desinfectante.
5. Las asas bacteriológicas deben ser esterilizadas en la llama del mechero, poniendo al rojo vivo todo el alambre, antes y después de su uso.
6. Cada grupo de estudiantes tendrá a su cargo un microscopio que debe aprender a manejar y a cuidar adecuadamente ya que éste será usado durante todo el curso.
7. No olvide traer a 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, utilice pipeteadores.
 10. En caso de derrame de material contaminado, cubra la mesa con toallas de papel, y humedézcalas con sustancias bactericidas (Alcohol o hipoclorito de sodio).
 11. El material contaminado debe ser colocado en recipientes adecuados para su posterior esterilización y/o desecho.
 12. Informe inmediatamente al Profesor de cualquier accidente, tales como cortaduras, quemaduras o derrames de cultivo. Tome las precauciones posibles para evitar accidentes.
 13. Después de realizar las respectivas lecturas de los cultivos deséchelos en la mesa dispuesta para tal fin, o devuélvalo al personal de laboratorio.
 14. Todos los reactivos y equipos deben dejarse organizados y en sus sitios respectivos al final de cada práctica.

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 étílico 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.

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** (García 2020).

El estudio de los microorganismos que pueden ser patógenos para el hombre, los animales u otras formas de vida, trae consigo ciertos riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados (Jaramillo, 2015).

Para que se produzca un accidente por agente biológico deben concurrir básicamente cuatro elementos:

- Una persona enferma.
- Un agente infeccioso.
- Una concentración suficiente de éste.
- Una ruta de transmisión apropiada.

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 (Capacho, 2019).

1.1.3.3 Seguridad biológica

Las Normas de Seguridad Biológica pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo relacionado con la manipulación de material peligroso, y su rigurosidad varía con el grado de riesgo de los agentes.

La seguridad biológica se fundamenta entonces en tres elementos:

- **Técnicas de Laboratorio.** Se refieren a todas aquellas prácticas y técnicas microbiológicas que se realizan dentro y fuera del laboratorio. Un buen seguimiento de las mismas ayuda a minimizar los riesgos biológicos.

- **Equipo de seguridad.** Se incluyen los dispositivos o aparatos que garantizan la seguridad (p.e. las cabinas de seguridad biológica), así como las prendas de protección personal (guantes, mascarillas, batas, calzado, etc.).
- **Diseño y construcción de la instalación.** Dependerá del tipo de agente infeccioso que se manipule en el laboratorio. Dentro de ellas, se incluyen la separación por zonas, según las actividades que se realizan (preparación de medios de cultivo, siembra, disponibilidad de sistemas de descontaminación -autoclaves-), filtrado del aire de salida al exterior, etc.

El equipamiento y el diseño del Laboratorio de Microbiología contribuyen a la seguridad sólo si **las personas que trabajan en él están motivadas**, conocen las normas de seguridad y las aplican. 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 la clave de la eficacia de los programas de seguridad y ésta debe ser facilitada a todas las personas que están expuestas a los riesgos del laboratorio: personal del laboratorio, de mantenimiento, de limpieza, etc.

1.1.3.4 El factor humano en la prevención de accidentes

Para disminuir los riesgos es importante mantener buenos hábitos de trabajo, respetar las normas de seguridad y conocer los peligros potenciales dentro del laboratorio.

Al respecto, España y Ortega (2013) mencionan que el riesgo puede ser alto o muy limitado y depende de la motivación del personal, de la infraestructura y de la metodología. Un accidente puede ocurrir por diferentes causas, pero “en la mayoría de los casos, se debe a errores humanos que pueden ser evitados”. Por ello, es que debe tenerse especial atención en aquellos factores humanos que intervienen en la prevención de accidentes:

- Prestar atención a los estados de ansiedad, irritabilidad y apresuramiento.
- Atender los estados de tensión que genera la rutina.
- Detenerse a investigar las causas de un accidente menor ocurrido como predecesor de otro de mayor importancia.
- Reflexionar sobre las actitudes de negación ante situaciones de riesgo.
- Estar alerta frente a situaciones de crisis familiares y/o laborales.
- Considerar que las crisis de cambio (p.e. fallecimiento de un familiar, cambio de trabajo), pueden ser un factor específico en la producción de accidentes.

El riesgo de que se produzca un accidente puede disminuirse a niveles muy bajos siempre y cuando se consideren los siguientes aspectos:

- Conocer los elementos de riesgo.
- Conocer la forma de manejarlos.
- Utilizar los elementos necesarios de seguridad y aplicar técnicas que disminuyan los riesgos.
- Aceptar recomendaciones técnicas de personas con experiencia en el trabajo de laboratorio.
- Transmitir dichas recomendaciones a quienes recién ingresan al laboratorio.
- Exigir de sus Profesores o personal encargado del Laboratorio la implementación de medidas de protección.
- Restringir el acceso de visitantes.

Si a pesar de todo lo antes expresado, el accidente igual ocurre, es muy importante saber qué se debe hacer y a 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 y sin que se tenga una noción clara de sus movimientos, se

ponen en contacto con las mucosas oral y ocular, principales puertas de entrada de muchas infecciones. Cuando se está trabajando en un laboratorio se deben cambiar ciertas costumbres, como la de poner en contacto objetos con la boca, ya que normalmente se dejan en cualquier lugar pudiéndose infectar con cualquier microorganismo allí presente.

Un paso importante en la protección de nuestra salud es aceptar e incorporar en nuestras prácticas la “Regla de los Cuatro NO” (o Primera Regla de Oro de la Bioseguridad), en ella se destaca que en el laboratorio se debe:

- ✓ No fumar
- ✓ No comer
- ✓ No beber
- ✓ No maquillarse

Para realizar estas acciones deben existir espacios destinados para tal fin, así como también para elementos de oficina y lectura.

Como una práctica diaria y en forma repetida, deben lavarse las manos con jabón (de preferencia líquido), cuantas veces sea necesario. Dado que las manos son susceptibles de recibir pinchazos, heridas y abrasiones. Para realizar algunas tareas, se recomienda utilizar guantes, dado que la posibilidad de que lo anterior ocurra es mayor. Dos prácticas son necesarias cuando se utilizan guantes: el lavado 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 (Hunter et al. 2011).

- **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.** El uso de bata de laboratorio impide daños mayores, por ejemplo, salpicaduras con colorantes, material infeccioso o contaminado. Esta ropa debe ser higienizada periódicamente y debe usarse siempre y exclusivamente dentro del laboratorio.

- **Protección de ojos.** Cuando se trabaja con sustancias corrosivas, es conveniente usar anteojos protectores o máscaras para disminuir el riesgo de lesionar la córnea con salpicaduras o por exposición a vapores químicos. Es importante trabajar bajo campana, al manipular solventes, como así también tener a mano soluciones y dispositivos especiales para el enjuague de los ojos (Francisco et al. 2000).
- **Otras protecciones.** En las operaciones comunes del laboratorio se generan aerosoles y dado que la mayoría de las bacterias y virus tienen como puerta de entrada al organismo la vía aérea, hay que evitar 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. Debe evitarse el pipeteo directo con la boca, por ello es necesario usar 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 de sobrecargas los circuitos eléctricos, usando estabilizadores y polos a tierra.
- Usar tomacorrientes simples en lugar de tomas múltiples.
- Colocar los interruptores en lugares accesibles.
- Usar calentadores con válvula de seguridad.
- Revisar periódicamente los cortapicos.
- Mantener los corredores y pasillos libres de obstáculos que puedan obstaculizar las salidas.
- Controlar las plagas y artrópodos.

- En general la labor del Microbiólogo en el Laboratorio, consiste en aislar e identificar microorganismos que, en algunos casos, pueden resultar patógenos. Para aislar el microorganismo de interés, se debe trabajar con elementos estériles (asas, medios de cultivo, material de vidrio, recipientes, etc.), y manipular las muestras con sumo cuidado, como potenciales vehículos de microorganismos patógenos.
- En el laboratorio de docencia, se deben tomar las medidas mínimas de bioseguridad y éstas deberán extremarse cuando se trabaje con microorganismos potencialmente letales.

1.1.3.7 Precauciones en el manejo de material biológico (Estacio *et al.* 2020)

- En lo posible, las operaciones deben realizarse dentro de una cabina de seguridad biológica.
- Reducir al mínimo la producción de aerosoles (preferiblemente utilizar mascarilla, o hablar lo estrictamente necesario).
- Utilizar dispositivos mecánicos para el pipeteo.
- Tener en el laboratorio, desinfectantes para manos y mesones.
- Colocar el material contaminado en recipientes con desinfectantes.
- Desechar el material contaminado en el lugar indicado.
- Las incubaciones deben realizarse durante el período de tiempo recomendado, no dejar material contaminado dentro de las incubadoras innecesariamente.
- Esterilizar o incinerar el material contaminado antes de su eliminación.

1.1.3.8 Clasificación de los agentes biológicos por grupos de riesgo

Según Estacio et al. (2020), para la peligrosidad de los microorganismos infecciosos, existe una clasificación por grupos de riesgo:

- **Agente Biológico del Grupo I.** Es aquél que resulta poco probable que cause una enfermedad en el hombre y en la comunidad.

- **Agente Biológico del Grupo II.** Es aquél que puede causar una enfermedad en el hombre y puede suponer un peligro para los manipuladores, siendo poco probable que se propague a la comunidad y existiendo generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.
- **Agente Biológico del Grupo III.** Aquél que puede causar una enfermedad grave en el hombre y presenta un serio peligro para los manipuladores, pudiendo causar la muerte, con riesgo de que se propague a la comunidad y existiendo frente a él generalmente profilaxis o tratamiento eficaz.
- **Agente Biológico del Grupo IV.** Aquél que causando una enfermedad grave en el hombre supone un serio peligro para los trabajadores, con muchas posibilidades de que se propague a la comunidad y sin que exista generalmente frente a él profilaxis o tratamiento eficaz.

1.1.3.9 Clasificación de los laboratorios según su nivel de seguridad biológica

- **Nivel 1. Microorganismos no patógenos para el hombre.** Es el nivel de seguridad requerido para los agentes biológicos del grupo I, es decir, los que no producen enfermedad en el ser humano sano y de susceptibilidad conocida y estable a los antimicrobianos. Es el habitualmente utilizado en los laboratorios de prácticas de universidades o centros docentes donde se emplean cepas no patógenas. Se debe trabajar en condiciones mínimas de asepsia y esterilidad. Ejemplos típicos son: todos aquellos microorganismos importantes y conocidos en la industria alimenticia (Zúñiga et al. 2011).
- **Nivel 2. Microorganismos y procedimientos de riesgo moderado.** En él se trabaja con agentes del grupo II, como así también con algunos que, perteneciendo a la propia microbiota habitual del hombre, son capaces de originar patología infecciosa humana de gravedad moderada o limitada. Deben ser manipulados por personal especializado y son los que con más frecuencia se estudian en laboratorio de microbiología clínica: *Salmonella typhi*, *Mycobacterium tuberculosis*, virus de la Hepatitis B, etc. (Zúñiga et al. 2011).

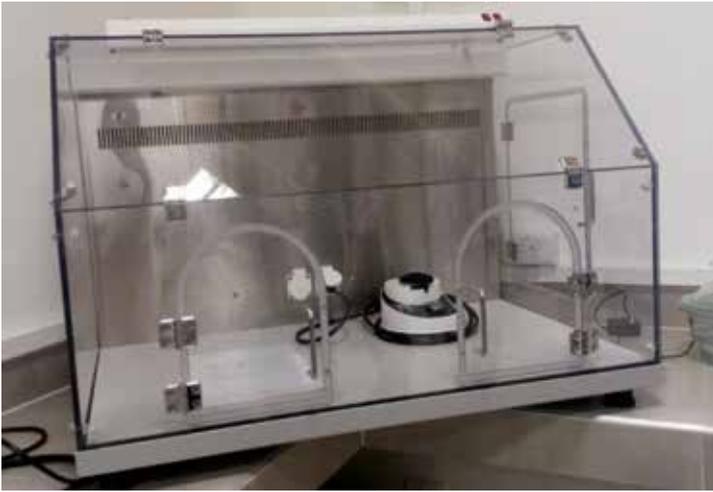
Otros aspectos que se deben considerar en este nivel son:

- ✓ El área de riesgo debe restringirse al personal, no permitiéndose el acceso a personas, que tengan aumentado, por alguna causa, el riesgo de infección (p.e. inmunosuprimidos).
- ✓ En el acceso al laboratorio figurarán señales de riesgo biológico, condiciones de ingreso y responsables del mismo (nombre, teléfono y domicilio).
- ✓ El personal debe estar vacunado (si correspondiera) y entrenado para prevenir accidentes y actuar correctamente en caso de que ocurriere.
- ✓ Control permanente de roedores e insectos.
- ✓ Evitar el uso de jeringas o cualquier otra práctica que genere aerosoles.
- ✓ “Las muestras deben tratarse siempre como potencialmente infectadas y tenerse en cuenta las precauciones citadas.”
- **Nivel 3. Microorganismos que pueden causar la muerte o aquellos de riesgo moderado.** En este nivel se trabaja con agentes biológicos del grupo III, microorganismos que causan patologías graves, de difícil y largo tratamiento, que pueden dejar secuelas y ocasionalmente producir la muerte, en cuya manipulación se aplican procedimientos de trabajo para prevenir el alto riesgo de infección. Los laboratorios clínicos pertenecen a este nivel (Estacio et al. 2020).
- **Nivel 4. Microorganismos exóticos y/o altamente peligrosos y procedimientos de alto riesgo.** Este nivel se requiere cuando se procesa con certeza y se sospecha de un agente especialmente patógeno e infectocontagioso, exótico o no, que produce alta mortalidad y para el que no existe tratamiento o es poco fiable. Normalmente, son microorganismos de dosis infectiva baja y alta contagiosidad. Este nivel también puede utilizarse para trabajar con animales de experimentación infectados con microorganismos del grupo IV.

Debe trabajarse en laboratorios especiales de máxima seguridad, en los que es necesario ducharse y cambiarse de ropa para entrar y salir y, en donde existen barreras de aire con el exterior. El manejo del material limpio y contaminado se realiza por canales altamente controlados (Moreno et al. 2011).

Ejemplos de agentes para este nivel, encontramos los virus del Ébola, el virus de la fiebre aftosa, el virus del HIV, y el Marburg. Además, deben incluirse en este nivel de contención los microorganismos propios del grupo 3 que adquieren propiedades patógenas que los elevan al grupo 4. Un ejemplo sería *Mycobacterium bovis* multirresistente que puede causar fallecimiento por fracaso terapéutico.

Figura 1. Cámara de flujo laminar.



Fuente: los autores

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

La experiencia indica que estos microorganismos tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades humanas o enfermedades animales de importancia veterinaria. No obstante, lo ideal es someter a todo el personal a un reconocimiento médico previo a la contratación en el que se anoten los antecedentes médicos de cada persona. 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 (Moreno et al. 2011).

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

- El reconocimiento médico previo al empleo o la asignación de un puesto es indispensable. Debe registrarse el historial médico de la persona y realizarse una evaluación de la salud ocupacional para los fines del laboratorio.
- El director del laboratorio debe mantener un registro de enfermedades y bajas laborales.
- Las mujeres en edad fecunda deberán ser informadas de los riesgos que supone para el feto la exposición profesional a ciertos microorganismos, como el virus de la rubéola. Las medidas concretas que se adopten para proteger al feto dependerán de los microorganismos a los que pueda estar expuesta la mujer.

Capacitación. Los errores humanos y las técnicas incorrectas pueden poner en peligro incluso las mejores medidas destinadas a proteger al personal de laboratorio. Por esta razón, el elemento clave para prevenir las infecciones adquiridas, los incidentes y los accidentes en el laboratorio es contar con un personal preocupado por la seguridad y que esté bien informado sobre la manera de reconocer y combatir los peligros que entraña su trabajo en ese entorno. En consecuencia, la formación continua en el servicio acerca de las medidas de seguridad es primordial. El proceso empieza por el personal directivo, que debe velar para que los procedimientos y prácticas de seguridad en el laboratorio formen parte de la capacitación básica de los empleados. La formación en medidas de seguridad siempre debe estar integrada en la capacitación inicial de los nuevos empleados. Además, debe ponerse a disposición del personal el código de prácticas y las directrices locales, incluido el manual de seguridad o de operaciones (Felix y Hurtado, 2000).

La capacitación del personal debe comprender siempre la enseñanza de métodos seguros para utilizar procedimientos peligrosos que ha-

bitualmente afectan a todo el personal del laboratorio y que entrañan 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.
- Riesgo de ingestión al manipular muestras, frotis y cultivos.
- Riesgo de inoculación cutánea al emplear jeringuillas y agujas.
- Riesgo de mordeduras y arañazos en la manipulación de animales.
- Manipulación de sangre y otros materiales patológicos potencialmente peligrosos.
- Descontaminación y eliminación de material infeccioso.

Manipulación de desechos. Se considera desecho todo aquello que de origen debe descartarse. En los laboratorios, la descontaminación y la eliminación de desechos son operaciones estrechamente relacionadas. En el trabajo cotidiano, son pocos los materiales contaminados que es preciso retirar del laboratorio o destruir. La mayor parte de la cristalería, los instrumentos y la ropa del laboratorio vuelve a utilizarse o se recicla. El principio básico es que todo el material infeccioso ha de ser descontaminado, esterilizado en autoclave o incinerado en el laboratorio (Soria, 2016).

Las principales preguntas que hay que hacerse antes de eliminar cualquier objeto o material de un laboratorio que trabaja con microorganismos o tejidos animales potencialmente infecciosos son las siguientes:

1. ¿Se han descontaminado o desinfectado realmente los objetos o el material por un procedimiento aprobado?
2. De lo contrario, ¿se han embalado con un método aprobado para ser incinerados inmediatamente *in situ* o transferidos a otro laboratorio que tenga capacidad para incinerar?

3. ¿Entraña la eliminación de los objetos o materiales descontaminados algún otro peligro, biológico o de otra clase, para quienes realizan las operaciones de eliminación inmediata o para quienes puedan entrar en contacto con los objetos o materiales desechados fuera del recinto del laboratorio?

Descontaminación. El tratamiento en autoclave de vapor constituye el método de elección para todos los procesos 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 (Hunter y Hunter, 2002).

Procedimientos de manipulación y eliminación de material y desechos contaminados. Deberá adoptarse un sistema de identificación y separación de material infeccioso y sus recipientes. Se seguirán las normas nacionales e internacionales y se tendrán en cuenta las siguientes categorías:

- Desechos no contaminados (no infecciosos) que puedan reutilizarse, reciclarse o eliminarse como si fuera “basura” en general.
- Objetos cortantes y punzantes contaminados (infecciosos): agujas hipodérmicas, bisturís, cuchillas, vidrio roto; se recogerán siempre en recipientes a pruebas de perforación dotados de tapaderas, además, serán tratados como material infeccioso.
- Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave que después pueda lavarse y volverse a utilizar o reciclarse.
- Material contaminado destinado al tratamiento en autoclave y a la eliminación.
- Material contaminado destinado a la incineración directa.

Objetos cortantes y punzantes. Las agujas hipodérmicas no se deben volver a tapar, cortar ni retirar de las jeringuillas desechables después de utilizarlas. El conjunto completo debe colocarse en un recipiente de eliminación específico. Las jeringuillas desechables, utilizadas con o sin aguja, se introducirán en recipientes de eliminación apropiados

y se incinerarán; además, si es necesario, se esterilizarán previamente en autoclave.

Material contaminado (potencialmente infeccioso) para ser tratado en autoclave y reutilizado. No se efectuará limpieza alguna de ningún material contaminado (potencialmente infeccioso) que vaya a ser tratado en autoclave y reutilizado. Cualquier limpieza o reparación que se revele necesaria se realizará siempre después del paso por la autoclave o la desinfección.

Material contaminado (potencialmente infeccioso) para ser eliminado. Aparte de los objetos cortantes y punzantes antes mencionados, todo el material contaminado (potencialmente infeccioso) debe ser introducido en recipientes impermeables (por ejemplo, en bolsas de plástico que resistan el tratamiento en autoclave marcadas con un código de color) y tratado en autoclave antes de proceder a su eliminación. Después de pasar por la autoclave, el material puede colocarse en recipientes apropiados para ser transportado al incinerador. Si es posible, el material procedente de actividades relacionadas con la atención sanitaria no debe desecharse en vertederos, ni siquiera después de haber sido descontaminado. 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 (Soria, 2016).

La incineración de desechos contaminados deberá contar no solo con la aprobación de las autoridades encargadas de salud pública y la contaminación del aire, sino también con la del funcionario de bioseguridad del laboratorio.

Código de prácticas. Al respecto Gander et al. (2009) mencionan que el código de prácticas de los laboratorios básicos - niveles de bioseguridad 1 y 2 - también se aplican en este caso, con las siguientes modificaciones:

- El símbolo y signo internacional de advertencia de peligro biológico expuesto en las puertas de acceso al laboratorio debe especificar el nivel de bioseguridad y el nombre del supervisor del laboratorio que controla el acceso a éste; igualmente, debe indicar cualquier condición especial de entrada en la zona, como puede ser la inmunización.

- Toda manipulación abierta de material potencialmente infeccioso debe realizarse dentro de una cámara u otro dispositivo de contención primaria.
- Puede ser necesario utilizar equipo de protección respiratoria para ciertos procedimientos de laboratorio o para el trabajo con animales que estén infectados con ciertos agentes patógenos.

El laboratorio de contención - nivel de bioseguridad 4

El laboratorio de contención máxima - nivel de bioseguridad 4 está concebido para trabajar con microorganismos del grupo de riesgo IV. Antes de construir y poner en funcionamiento un laboratorio de contención máxima se requiere una labor intensiva de consulta con instituciones que tengan experiencia en la utilización de instalaciones de este tipo. Cuando los laboratorios de contención máxima - nivel de bioseguridad 4 se encuentran en funcionamiento deben ser sometidos al control de las autoridades sanitarias (Ortiz *et al.*, 2016).

Código de prácticas. El código de prácticas correspondiente al nivel de bioseguridad 3 se aplica también en este nivel, pero con las siguientes modificaciones:

- Hay que aplicar la regla de trabajo realizado por dos personas, en virtud de la cual ninguna persona debe trabajar sola en el interior del laboratorio. Esto es particularmente importante si el trabajo se realiza con ropa especial del nivel de bioseguridad 4.
- Al entrar y salir del laboratorio es imprescindible un cambio completo de ropa y calzado.
- El personal debe recibir capacitación en procedimientos de evacuación de emergencia en caso de que un miembro del personal sufra lesiones o caiga enfermo.
- Debe establecerse un método de comunicación entre el personal que trabaja dentro del laboratorio del nivel de bioseguridad 4 y el personal de apoyo que se encuentra fuera del laboratorio para la comunicación ordinaria y de emergencia.

Conceptos de bioprotección en el laboratorio

Los acontecimientos mundiales recientes han evidenciado la necesidad de proteger los laboratorios y los materiales que estos contienen, de acciones que puedan perjudicar a las personas, a los animales, la agricultura o el medio ambiente. Antes de definir las necesidades de un laboratorio o un programa en materia de bioprotección, es preciso definir claramente la distinción entre “seguridad biológica” y “protección biológica”.

“Seguridad biológica” (o “bioseguridad”) es el término utilizado para referirse a los principios, técnicas y prácticas aplicadas con el fin de evitar la exposición no intencional a patógenos y toxinas, o su liberación accidental. En cambio, la “protección biológica” (o “bioprotección”) se refiere a las medidas de protección de la institución y del personal destinadas a reducir el riesgo de pérdida, robo, uso incorrecto, desviaciones o liberación intencional de patógenos o toxinas.

Las precauciones relacionadas con la protección deben formar parte de la rutina de trabajo en el laboratorio, exactamente igual que las técnicas asépticas y otras prácticas microbiológicas seguras. Las medidas de bioprotección no deben dificultar el intercambio eficiente de materiales de referencia, ni de muestras clínicas y epidemiológicas, ni de la información conexas necesaria para las investigaciones clínicas o de salud pública. Una gestión competente de la protección no tiene por qué interferir indebidamente con las actividades cotidianas del personal científico ni ser un impedimento para la actividad investigadora. Se debe proteger el acceso legítimo a materiales clínicos y de investigación importantes. 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 bioprotección en el laboratorio (Ortiz *et al.*, 2016).

Cámaras de seguridad biológica

Las Cámaras de Seguridad Biológica (CSB) están diseñadas para proteger al trabajador, la atmósfera del laboratorio y los materiales de trabajo de la exposición a las salpicaduras y los aerosoles infecciosos que pueden generarse al manipular material que contiene agentes

infecciosos, como cultivos primarios, soluciones madre y muestras de diagnóstico. Los aerosoles se producen en cualquier actividad que transmita energía a un material líquido o semilíquido, por ejemplo, al agitarlo, verterlo a otro recipiente, removerlo o verterlo sobre una superficie o sobre otro líquido. Las actividades como la siembra de placas de agar, la inoculación de frascos de cultivo celular con pipeta, el uso de pipetas múltiples para dispensar suspensiones líquidas de agentes infecciosos en placas de microcultivo, la homogenización y la agitación vertical de material infeccioso, y la centrifugación de líquidos infecciosos o el trabajo con animales pueden generar aerosoles infecciosos. Las partículas de aerosol de menos de 5 μ de diámetro y las pequeñas gotículas de 5 a 100 μ de diámetro no son visibles a simple vista. El trabajador no suele darse cuenta de que se están produciendo esas partículas, que pueden ser inhaladas o provocar la contaminación cruzada de los materiales que se encuentran sobre las superficies de trabajo. Las CSB, cuando se utilizan debidamente, han demostrado ser sumamente eficaces para reducir las infecciones adquiridas en el laboratorio y la contaminación cruzada de cultivos por exposición a aerosoles. Las CSB también protegen la atmósfera del laboratorio (Ortiz *et al.*, 2016).

A lo largo de los años, el diseño básico de las CSB ha sufrido varias modificaciones. Un cambio importante fue la adición de un filtro HEPA. Estos filtros retienen el 99,97% de las partículas de 0,3 μ de diámetro y el 99,99% de las partículas de tamaño mayor o menor; ésto les permite retener eficazmente todos los agentes infecciosos conocidos y garantizar que de la cámara sólo sale aire exento de microorganismos. 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 (Ortiz *et al.*, 2016).

Equipo de bioseguridad

Dispositivos de pipeteo. De acuerdo con Ferreras et al. (2018), para los procedimientos de pipeteo debe utilizarse siempre un dispositivo especial. El pipeteo con la boca debe estar estrictamente prohibido.

Debe insistirse bastante en la importancia de utilizar dispositivos de pipeteo. Los riesgos más comunes que entraña el uso de pipetas como

resultado de la succión bucal, la aspiración por la boca y la ingestión de material peligroso han dado lugar a numerosas infecciones en los laboratorios.

También pueden transferirse agentes patógenos a la boca si se coloca un dedo contaminado en el extremo de la pipeta por el que se hace la succión. Un riesgo menos conocido del pipeteo con la boca es la inhalación de aerosoles provocados por la succión.

Los dispositivos de pipeteo deben seleccionarse con cuidado (Figura 2). Es importante que ni su diseño ni su modo de empleo aumenten el riesgo de infección, y que sean fáciles de esterilizar y limpiar. Deben utilizarse puntas de pipeta obturadas (resistentes a los aerosoles) cuando se manipulen microorganismos y cultivos celulares. Las pipetas que tengan los extremos de succión agrietados o astillados deben desecharse, ya que dañan las puntas herméticas por las que se insertan en los dispositivos de pipeteo y crean un peligro.

Figura 2. Demostración de pipetas.



Fuente: los autores

Homogeneizadores, agitadores, mezcladores y desintegradores ultrasónicos. Los homogeneizadores domésticos (de cocina) no son herméticos y liberan aerosoles. Solo deben utilizarse aparatos diseñados especialmente para el trabajo de laboratorio, que están cons-

truidos de forma que se reduce al mínimo o se impide esa liberación de aerosoles. Los homogeneizadores de tipo Stomacher, disponibles ahora para trabajar con volúmenes grandes y pequeños, también pueden producir aerosoles.

Los homogeneizadores utilizados para los microorganismos del grupo de riesgo III siempre deben cargarse y abrirse en una CSB.

Asas desechables. Estas asas ofrecen la ventaja de que no necesitan ser esterilizadas, por lo que pueden utilizarse en CSB, en las que los mecheros de Bunsen y los microincineradores perturbarían la corriente de aire.

Microincineradores. Los microincineradores calentados con gas o electricidad llevan protecciones de cristal de borosilicato o de cerámica que reducen al mínimo las salpicaduras y la dispersión de material infectado cuando se esterilizan las asas. Sin embargo, pueden perturbar la corriente de aire y, por consiguiente, deben colocarse en la parte trasera de la superficie de trabajo de las CSB.

Ropas y equipo de protección personal. La vestimenta y el equipo de protección personal pueden actuar como barrera para reducir al mínimo el riesgo de exposición a aerosoles, salpicaduras e inoculación accidental. Las prendas de vestir y el equipo que se seleccionen dependen de la naturaleza del trabajo que se realice. En el laboratorio los trabajadores llevarán ropa protectora. Antes de abandonar el laboratorio, tendrán que quitarse las prendas protectoras y lavarse las manos.

Batas y delantales de laboratorio. Preferiblemente, las batas de laboratorio irán abotonadas hasta arriba. Sin embargo, las batas de manga larga y abertura trasera protegen mejor que las batas de abertura frontal y son preferibles en los laboratorios de microbiología y especialmente cuando se trabaja en una CSB. Los delantales pueden llevarse por encima de las batas cuando se necesite mayor protección contra el derrame de sustancias químicas o material biológico como sangre o líquidos de cultivo. Los servicios de lavandería deben encontrarse en las instalaciones o cerca de ellas.

Gafas de seguridad y viseras. La elección del material para proteger los ojos y el rostro de salpicaduras e impactos de objetos dependerá

de la actividad que se lleve a cabo. Pueden fabricarse gafas, graduadas o no, con monturas especiales que permiten colocar los cristales desde delante. Los cristales son de material irrompible y pueden ser curvos o llevar protecciones laterales (cristales de seguridad). Las gafas de patilla no protegen debidamente contra salpicaduras ni siquiera cuando se utilizan con protecciones laterales. Las gafas de máscara para proteger contra salpicadura e impactos deben llevarse sobre las gafas graduadas normales y los lentes de contacto (que no protegen contra, los riesgos biológicos o químicos).

Mascarillas respiratorias. La protección respiratoria puede utilizarse cuando se realizan procedimientos de alto riesgo, como limpiar un derrame de material infeccioso. El tipo de mascarilla respiratoria elegida dependerá del tipo de peligro. Existen respiradores con filtros cambiables para proteger contra gases, vapores, partículas y microorganismos. Es indispensable que el filtro esté colocado en el tipo de mascarilla adecuado. Para que la protección sea máxima, las mascarillas respiratorias deben ajustarse al rostro de cada trabajador y probarse previamente.

Guantes. Las manos pueden contaminarse cuando se trabaja en el laboratorio. También son vulnerables a las heridas producidas por objetos punzantes o cortantes. Los guantes desechables de látex, vinilo o nitrilo de tipo quirúrgico aprobados para uso microbiológico son los más extendidos para el trabajo general de laboratorio y para manipular agentes infecciosos, así como sangre y otros líquidos corporales. También pueden usarse guantes reutilizables, pero hay que lavarlos, retirarlos, limpiarlos y desinfectarlos correctamente.

Después de manipular material infeccioso o de trabajar en una CSB y antes de abandonar el laboratorio es preciso retirar los guantes y lavarse las manos concienzudamente. Los guantes desechables usados deben eliminarse junto con los residuos de laboratorio infectados.

Desinfección y esterilización

Para la bioseguridad en el laboratorio es fundamental disponer de conocimientos básicos sobre la desinfección y la esterilización. Los tiempos de contacto con los desinfectantes son distintos para cada ma-

terial y cada fabricante. Así pues, todas las recomendaciones para el uso de desinfectantes deben seguir las especificaciones del fabricante.

Limpieza del material de laboratorio

La limpieza consiste en la eliminación de suciedad, materia orgánica y manchas. Incluye el cepillado, la aspiración, el desempolvado en seco, el lavado o el fregado con un paño y agua con jabón o detergente. La suciedad, la tierra y la materia orgánica pueden albergar microorganismos e interferir con la acción de los descontaminantes (antisépticos, germicidas, químicos y desinfectantes). La limpieza previa es fundamental para conseguir una correcta desinfección o esterilización. Muchos productos germicidas solo son activos sobre material previamente limpio. La limpieza debe llevarse a cabo con cuidado para evitar la exposición a agentes infecciosos. Deben utilizarse materiales que sean químicamente compatibles con los germicidas que vayan a utilizarse después.

Germicidas químicos

Pueden utilizarse como desinfectantes o antisépticos muchos tipos de sustancias químicas. Dado que el número y la variedad de productos comerciales es cada vez mayor, deben elegirse cuidadosamente las formulaciones que sean indicadas para las necesidades concretas.

La actividad germicida de muchas sustancias químicas es más rápida y eficaz a temperaturas más altas, pero las temperaturas elevadas también pueden acelerar su evaporación y degradarlas. Es preciso tener particular cuidado en el uso y el almacenamiento de esas sustancias en las regiones tropicales, donde su tiempo de conservación puede verse reducido a causa de las altas temperaturas del ambiente.

Muchos germicidas pueden ser perjudiciales para el ser humano o el medio ambiente. Se deben seleccionar, almacenar, manipular, utilizar y eliminar con precaución, siguiendo las instrucciones del fabricante. En relación con la seguridad personal, se recomienda utilizar guantes, delantales y protección ocular cuando se preparen diluciones de germicidas químicos.

El uso correcto de los germicidas químicos contribuirá a la seguridad en el lugar de trabajo y al mismo tiempo reducirá el riesgo que suponen los agentes infecciosos. En la medida de lo posible, el número de sustancias químicas germicidas que se utilicen deberá ser limitado por razones económicas y de control del inventario, así como para reducir la contaminación ambiental.

A continuación, se describen las clases más utilizadas de germicidas químicos, con información genérica sobre sus aplicaciones y sus características de seguridad:

Cloro (hipoclorito sódico): el cloro, oxidante de acción rápida, es un germicida químico de uso muy extendido y de amplio espectro. Normalmente se vende en forma de lejía, una solución acuosa de hipoclorito sódico (NaOCI) que puede diluirse en agua para conseguir distintas concentraciones de cloro libre. El cloro, especialmente en forma de lejía, es sumamente alcalino y puede ser corrosivo para los metales. Su actividad se ve considerablemente reducida por la materia orgánica (proteínas). Las soluciones madre o de trabajo de lejía almacenadas en recipientes abiertos, particularmente a temperaturas elevadas, liberan cloro gaseoso, con lo que se debilita su potencial germicida. La frecuencia con la que deben prepararse nuevas soluciones de trabajo de lejía depende de su potencia inicial, del tamaño y el tipo de los recipientes (por ejemplo, con o sin tapa), de la frecuencia y el tipo de uso, y de las condiciones ambientales. 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.

Como solución desinfectante general para toda clase de trabajos de laboratorio se utilizará una concentración de 1 g/L de cloro libre. En caso de derrame que conlleve un peligro biológico y en presencia de grandes cantidades 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.

Dicloroisocianurato sódico: el dicloroisocianurato sódico (NaDCC) en polvo contiene un 60% de cloro libre. Las soluciones preparadas con NaDCC en polvo a razón de 1,7 g/L y 8,5 g/L contendrán 1 g/L y 5 g/L de cloro libre, respectivamente. Los comprimidos de NaDCC suelen contener el equivalente a 1,5 g de cloro libre por comprimido. Uno o cuatro comprimidos disueltos en un litro de agua darán aproximadamente las concentraciones requeridas de 1 g/L 65 g/L, respectivamente.

Cloraminas: las cloraminas existen en forma de polvo, conteniendo aproximadamente un 25% de cloro libre. Al liberar el cloro a menos velocidad que los hipocloritos, se requieren concentraciones iniciales más altas para obtener una eficacia equivalente a la de aquellos. Por otro lado, las soluciones de cloramina no son inactivadas por la materia orgánica con la misma intensidad que los hipocloritos, y se recomienda una concentración de 20 g/L para situaciones “limpias” y “sucias”.

Dióxido de cloro: el dióxido de cloro (ClO_2) es un germicida, desinfectante y oxidante potente y de acción rápida que a menudo tiene actividad a concentraciones inferiores a las necesarias en el caso del cloro procedente de la lejía. La forma gaseosa es inestable y se descompone en cloro gaseoso (Cl_2) y oxígenos gaseosos (O_2), produciendo calor. Sin embargo, el dióxido de cloro es soluble en agua y estable en solución acuosa. Puede obtenerse en dos formas: 1) por generación *in situ*, mezclando dos componentes distintos, el ácido clorhídrico (HCl) y el clorito sódico (NaClO_2), o 2) encargando la forma estabilizada, que después se activa en el laboratorio cuando se necesita. El dióxido de cloro es el más selectivo de los biocidas oxidantes. El ozono y el cloro son mucho más reactivos que el dióxido de cloro y son consumidos 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.

Formaldehído: el formaldehído (HCHO) es un gas que mata los microorganismos y esporas a temperaturas superiores a las 20°C. Sin embargo, no tiene actividad contra los priones. Su acción es relativamente lenta y requiere una humedad relativa alrededor del 70%. Se comercializa en forma de polímero sólido (paraformaldehído),

en copos o comprimidos, o como formol, solución del gas en agua con aproximadamente 370 g/L (37%) y con metanol (100 mL/L) como estabilizante. Ambas formulaciones se calientan para liberar el gas, que se utiliza en la descontaminación y la desinfección de espacios cerrados como las CSB y locales. El formaldehído (un 5% de formol en agua) puede utilizarse como desinfectante líquido.

El formaldehído es un agente presuntamente cancerígeno. Se trata de un gas peligroso de olor acre que puede irritar los ojos y las mucosas. Así pues, debe almacenarse y utilizarse con una campana extractora de vapores o en zonas bien ventiladas. Deben observarse las normas nacionales de seguridad de las sustancias químicas.

Compuestos fenólicos: los compuestos fenólicos, un grupo amplio de productos, figuran entre los germicidas más antiguos.

El triclosán es común en los productos para el lavado de manos. Tiene una actividad principalmente contra las formas vegetativas de las bacterias y es inocuo para la piel y las mucosas. Sin embargo, en estudios de laboratorio se ha observado que las bacterias con resistencia inducida a bajas concentraciones de triclosán también muestran resistencia a ciertos tipos de antibióticos. Se desconoce el alcance de esta observación sobre el terreno. Algunos compuestos fenólicos son sensibles a la dureza del agua y pueden quedar inactivados con aguas duras; por esta razón, deben diluirse con agua destilada o desionizada.

Alcoholes: el etanol (alcohol etílico, C_2H_5OH) y el 2-propanol (alcohol isopropílico, $(CH_3)_2CHOH$) tienen propiedades desinfectantes similares. Son activos contra las formas vegetativas de las bacterias, los hongos y los virus con envoltura lipídica, pero no contra las esporas. Su acción sobre los virus sin envoltura lipídica es variable. Para conseguir la máxima eficacia deben utilizarse en concentraciones acuosas de aproximadamente un 70% (v/v): las concentraciones más altas o más bajas pueden no tener tanto poder germicida. Una de las grandes ventajas de las soluciones acuosas de alcoholes es que no dejan residuo alguno en los objetos tratados.

Las mezclas con otros agentes son más eficaces que el alcohol por sí solo; por ejemplo, el alcohol al 70% (v/v) con 100 g/L de formaldehído, o el alcohol con 2 g/L de cloro libre. Las soluciones acuosas de etanol al 70% (v/v) pueden utilizarse en la piel, las superficies de trabajo de

las mesas de laboratorio y las CSB, así como para sumergir pequeñas piezas de instrumental quirúrgico. Dado que el etanol puede secar la piel, a menudo se mezcla con emolientes. Las friegas de alcohol se recomiendan para descontaminar manos ligeramente sucias en situaciones en las que no es posible o práctico lavarlas. 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.

Yodo y yodóforos: la acción de estos desinfectantes es análoga a la del cloro, aunque pueden ser ligeramente menos susceptibles a la inhibición por la materia orgánica. El yodo puede manchar los tejidos y las superficies del entorno, y en general no es adecuado como desinfectante. Por otro lado, los yodóforos y las tinturas de yodo son buenos antisépticos. La povidona yodada es un agente de lavado quirúrgico fiable e inocuo, y sirve como antiséptico cutáneo preoperatorio. Los antisépticos a base de yodo no suelen ser adecuados para utilizarlos en material médico/dental. El yodo no debe usarse en objetos de aluminio o cobre.

Descontaminación de espacios y superficies

La descontaminación del espacio, el mobiliario y el equipo de laboratorio requiere una combinación de desinfectantes líquidos y gaseosos. Las superficies pueden descontaminarse con una solución de hipoclorito sódico (NaOCl); 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. Para la descontaminación de espacios y superficies, las soluciones de lejía pueden sustituirse por fórmulas que contengan un 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Reglamentación internacional en el transporte de material infeccioso

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*. 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 jurídicamente vinculante, la Reglamentación Modelo

debe ser introducida en las normas nacionales y en las reglamentaciones modelo internacionales por las autoridades competentes (por ejemplo, las Instrucciones Técnicas para el transporte sin riesgos de mercancías peligrosas por vía aérea de la Organización de Aviación Civil Internacional OACI, en relación con el transporte aéreo, y el Acuerdo Europeo sobre el Transporte Internacional de Mercaderías Peligrosas por Carretera, ADR).

La Asociación de Transporte Aéreo Internacional, IATA, publica todos los años una guía sobre el transporte de sustancias infecciosas (*Infectious Substances Shipping Guidelines*). La guía de la IATA debe seguir como mínimo las Instrucciones Técnicas de la OACI, pero puede imponer restricciones adicionales. Cuando un envío es transportado por un miembro de la asociación, debe seguir las directrices de la IATA.

Puesto que la *Reglamentación Modelo para el Transporte de Mercancías Peligrosas* es un conjunto dinámico de recomendaciones sometido a modificaciones cada dos años, se remite al lector a las últimas ediciones de las normas nacionales e internacionales para consultar los textos reglamentarios aplicables.

Sistema básico de embalaje/envasado triple. Es el preferido para el transporte de sustancias infecciosas y potencialmente infecciosas. Este sistema de embalaje/envasado consta de tres componentes: i) el recipiente primario que contiene la muestra debe ser estanco, a prueba de fugas y estar debidamente etiquetado en relación con el contenido; ii) debe ir envuelto en material absorbente suficiente para absorber todo el líquido en caso de rotura o fuga, y iii) el recipiente primario se introduce en un segundo embalaje/envase protector estanco y a prueba de fugas. Pueden colocarse varios recipientes primarios en un solo embalaje/envase secundario. En algunos textos reglamentarios se incluyen límites en relación con el volumen o el peso de las sustancias infecciosas envasadas.

El embalaje/envase externo protege el embalaje/envase 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.

La *Reglamentación Modelo* de las Naciones Unidas prescribe el uso de dos sistemas diferentes de envasado triple. El sistema básico es el indicado para el transporte de diversas sustancias infecciosas, pero los microorganismos de alto riesgo deben enviarse siguiendo normas más estrictas. Para más detalles sobre el uso de los distintos envases según los materiales que se vayan a enviar, se aconseja al lector que consulte la reglamentación nacional o internacional para conocer los textos normativos aplicables.

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

Organización: conforme grupos máximo de 4 o 5 personas; recuerde que del buen trabajo en grupo depende en gran parte los resultados de la práctica.

Área de trabajo: el laboratorio de microbiología debe estar dispuesto en mesas de trabajo, cada una de ellas equipadas con microscopios; adicionalmente, durante la clase se puede contar con asas, aceite de inmersión, soluciones, gradilla de tinción, 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. El servicio de agua o lavadero se encuentra en el costado del laboratorio.

Materiales y equipos: los materiales utilizados por cada práctica serán repartidos por el profesor o monitor antes de comenzar la misma; rótúelos doblemente indicando el número del grupo, número de mesa, fecha, tipo de prueba y facultad. Después de que haya realizado la siembra, lleve el material a la incubadora al final de la sesión, y si el material es de desecho, colóquelo en la bandeja indicada por el profesor. Encienda el microscopio sólo el tiempo que lo utilice, guarde la funda y aléjelo de los mecheros.

Prácticas de lectura: la mayoría están dedicadas a observar el crecimiento de los microorganismos, éste sólo es visible al cabo de varias

horas o días de realizadas las siembras, motivo por el cual cada laboratorio conlleva una sesión de lectura de resultados que se realizará durante todo el semestre en el día y hora indicadas por el profesor. Las lecturas serán semanales y corresponderán al laboratorio inmediatamente anterior, y el material no leído también será desechado semanalmente. Una vez tomados los datos de los resultados, entregue los cultivos para su eliminación.

Precaución de accidentes: informe cualquier accidente o lesión sufrida en el laboratorio al profesor. Si llega a romper algo no lo coja con las manos e informe inmediatamente sobre el accidente. Recuerde que se puede infectar.

Recomendaciones académicas: antes de cada sesión entérese sobre el tema de la práctica, lea las instrucciones y consiga el material solicitado. En el transcurso del laboratorio tome apuntes constantemente, realice dibujos y esquemas de lo observado, anote los resultados, intérpretelos y relacione constantemente 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.

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

La mayoría de los instrumentos más utilizados en los laboratorios son elaborados de vidrio resistente a altas temperaturas, ya que su alto contenido de dióxido de silicio, bajo álcali, óxido bórico y vestigios de otros óxidos, condiciona su escaso coeficiente de latación. 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 altera su composición.

Figura 3. Material de vidrio.



Fuente: los autores

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

- Que no sean fácil de quebrarse.
- Ser de color neutro.
- Poseer resistencia a las acciones mecánicas y a las variaciones de temperatura así como también a los álcali-libre (no se raje).
- Poseer bajo coeficiente de dilatación (que no pierda su forma).

1.2.3.1 Materiales de cristal

- **Tubos de ensayo:** Se emplean como recipientes de medios de cultivo. Deben ser de vidrio neutro, paredes gruesas y equilibradas, de preferencia sin rebordes para facilitar el taponamiento. Se encuentran de diferentes tamaños dependiendo de la práctica que se desee realizar.
- **Capsulas o placas Petri:** Son de forma cilíndrica y se emplean para el cultivo y aislamiento de microorganismos. Las más usadas son las de 10, 15, 20 y 100 mm.
- **Placas Brewer:** Para el cultivo y aislamiento de microorganismos anaeróbicos. Son idénticas a las anteriores, con excepción de las tapas que además de ser más pesadas están adaptadas para crear anaerobiosis.
- **Pipetas:** Tubos cilíndricos delgados terminados en punta, graduados al décimo o al centésimo de mL. Se emplean en la medición de pequeñas cantidades de líquidos. Pueden ser:

Volumétricas: Se reconocen por presentar una dilatación bulbosa central con unas marcas de aforamiento conocida en el extremo proximal angosto de la pipeta, se les llama también pipetas de bola; las medidas más conocidas son de 10, 25, 50 y 100 mL.

Pasteur: De varillas de vidrio de diámetro de 4 x 20 mm de 30 ó 40 cm de longitud. La calidad de vidrio debe facilitar la acción directa de la llama del mechero, para conseguir por estiramiento la capilaridad. Se emplea para la toma de pequeños inóculos de siembra.

- **Matraces y Erlenmeyers:** De forma cónica y cuello corto, volumétricos útiles para la preparación y almacenamiento de soluciones, colorantes, reactivos, medios de cultivos, etc.
- **Kitasato:** Son frascos muy parecidos a los Erlenmeyers, se caracterizan por sus paredes gruesas y por una tubuladura lateral en el cuello, la misma que sirve de tabulación lateral para hacer el vacío.
- **Probetas:** Recipientes graduados de forma cilíndrica y capacidad variable, con base para la esterilidad. Pueden estar graduadas.

- **Vasos de Precipitación o Beakers:** Recipientes cilíndricos y cortos, con una depresión en el margen de la bocadura. Su utilidad es amplia. El vidrio debe ser resistente al calor.
- **Frascos viales para hemocultivos, vacunas, cultivos de tejido:** Son de vidrio neutro, resistentes al calor, transparentes y con tapas de rosca, con capacidad para 50 mL y 100 mL, blancos o de color ámbar pueden utilizarse para la reserva de soluciones y medios de cultivo en stock, previamente taponados con algodón esterilizados.
- **Perlas de Vidrio Neutro:** Se emplean para desfibrilar sangre y para recoger cosechas microbianas en la preparación de antígenos, de 4 a 6 mm. Vienen acompañados de una Varilla de vidrio macizo.

1.2.3.2 Equipos

Potenciómetro: Miden el pH de los medios de cultivo y de las soluciones buffer. Constituido de un par de electrodos sensibles a concentraciones de hidrogeniones, conectados a un potenciómetro que indique las mediciones. Los potenciómetros emplean un electrodo de vidrio, unido a un electrodo de calomel como estándar.

Figura 4. Potenciómetro.



Fuente: los autores

Figura 5. Centrífuga de alta velocidad



Fuente: los autores

- **Centrífugas:** Se utiliza en la separación de sólidos suspendidos en líquidos. Hay centrífugas de tamaño y velocidades variables; la velocidad se mide en revoluciones por minuto. La velocidad a la cual sedimentarán las partículas en un líquido dependen de varios factores: tamaño de la partícula, el peso de la partícula, la viscosidad del líquido, la fuerza gravitacional y la ultra centri-

fugación para obtener separaciones elevadas (mayor o igual a 100000 g), pueden ser:

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

Ultracentrifugación preparativa: Permite la separación de orgánulos celulares. La separación se debe efectuar en gradiente de densidad.

- **Incubadoras y hornos:** Los hornos son capaces de mantener temperaturas de más de 100°C y las incubadoras menos de 100°C. Los hornos no tienen salida de aire, mientras las incubadoras sí.
- **Baños de agua:** También llamados Baño María. Están dotados de un piso para colocar los materiales. Cuentan con salida de aire y un termostato que regula la temperatura del agua.
- **Refrigeradoras y congeladores:** Son incubadoras de temperatura fría menor de 0°C.
- **Elementos de filtración:** Sirven para separar materiales líquidos de sólidos, un ejemplo de ellos son los filtros de membrana.
- **Espectrofotómetro:** Se puede observar los colores de los alimentos con una intensidad que el aparato brinda.
- **Autoclave:** Funciona por las presiones que se dará a una mayor temperatura logrando su esterilización, como por ejemplo en las conservas.
- **Horno Pasteur:** Es como una mufla que tiene tres paredes y la cubierta es de asbesto. Sirve para la esterilización por el calor seco.



➤
Figura 6. Autoclave

Fuente: <https://hospitienda.com/producto/autoclave-a-vapor-olla-all-american-1941x/>

- **Estufas de aire caliente:** Al igual que el anterior son utilizadas en la esterilización a través de calor seco. Tienen solo dos paredes y son de forma cúbica.
- **Aparato de Arnold koch:** Es un tipo de esterilizador con calor húmedo de forma cilíndrica.
- **Microscopio:** Según los criterios clásicos de clasificación pueden ser microscopios ópticos y microscopios electrónicos. Los microscopios ópticos se clasifican en simples (monoculares, binoculares) y compuestos (estereomicroscopios, de luz ultravioleta, de fluorescencia, de contraste de fases, de campo oscuro, de polarización y de luz reflejada). Los electrónicos en microscopios de barrido MEB, de transmisión TEM y microscopio con focal de barrido láser (Figura 7).

Figura 7. Microscopio óptico.



Fuente: los autores

- **Estereomicroscopios:** Son microscopios dobles, con dos objetivos y dos oculares que poseen un doble prisma, el cual permite enderezar las imágenes y conservar la textura. La iluminación del objeto se hace por transparencia o por incidencia, siendo esta última la más frecuente. Pueden estar dotados de accesorios microfotográficos, doble dispositivo de observación para observaciones simultáneas, cámaras claras y microdisectores.

- **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 basa en la propiedad que poseen determinadas sustancias (llamadas fluorescentes), de emitir bajo la acción de radiaciones de onda corta, otras radiaciones de longitud de onda larga denominadas fluorescencia. Está constituido por una fuente de luz que emite una banda de longitud de onda del ultravioleta al infrarrojo, un filtro que determina la banda de excitación que normalmente es ultravioleta, una muestra fluorescente después del cual se encuentra un filtro (filtro de barrera) que corta los restos de la luz de excitación y deja pasar solo la fluorescencia.
- **Microscopio de contraste de fases:** Se utiliza para estudiar aquellas preparaciones de densidad homogénea y transparente, como son las bacterias y las células, en la que la baja capacidad de absorción hace que la imagen obtenida no presente diferencia de luminosidad entre sus elementos, permaneciendo prácticamente invisibles los detalles. Se requiere la práctica de tinción de muestras.
- **Microscopio de campo oscuro.** Este tipo de microscopios producen un efecto consistente en un fondo oscuro sobre el que se ven los objetos intensamente iluminados. El poder de resolución depende del contraste que existe entre el objeto y el medio que lo rodea. Se utiliza para observar microorganismos sin teñir y que están suspendidos en líquidos.
- **Microscopio de polarización:** Son microscopios de luz polarizada, que se construyen a partir de un microscopio ordinario colocando un polarizador entre la fuente de luz y el condensador y un analizador entre el objetivo y el ocular.
- **Microscopios de luz reflejada:** Se utilizan en microscopia de minerales metálicos u opacos. Se necesita un foco de luz polarizada que incide de manera perpendicular sobre la superficie finamente pulida, con intenso brillo y sin interposición de cubreobjetos. Se

requiriere además un iluminador de opacos acoplado adecuadamente al microscopio.

- Respecto a los microscopios electrónicos, se tiene la ventaja de alcanzar una extraordinaria ampliación y pueden dar un poder de resolución 1000 veces mayor que con el óptico debido a que emplea un haz de electrones en un lugar de un haz de fotones.
- **Microscopio electrónico de barrido MEB:** También conocido como microscopia de exploración electrónica. Los electrones inciden sobre la preparación, esta última puede ser secada por congelación o por punto crítico y se cubre con una capa de metal como el oro o el platino. Con este microscopio no se alcanza la misma resolución que con un microscopio electrónico de transmisión, pero su ventaja es una excelente impresión tridimensional.
- **Microscopio electrónico de transmisión:** En este tipo de microscopia el haz de electrones atraviesa el material que se desea observar. Opera igual que un microscopio óptico a diferencia de que la imagen se forma sobre una pantalla de material fluorescente, que brilla al recibir el impacto de los electrones; debajo de la pantalla se sitúa la cámara para la toma de fotografías. Es útil con muestras de un grosor muy delgado. Esta microscopia debe estar acompañada de técnicas de tinción negativa, microtomía y congelación.
- **Microscopio con focal de barrido láser:** Es el mejor de los avances en cuanto a microscopia, ya que permite utilizar la tecnología láser. Permite la observación de secciones finísimas dentro de una espesa muestra fluorescente y la digitalización y reconstrucción a gran velocidad de imágenes de alta resolución en tres dimensiones.

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.

1.3.2 Objetivos

- Conocer las diferentes partes y funcionamiento de un microscopio.
- Reconocer los distintos tipos de microscopios y su función específica.
- Manejar cuidadosa y eficientemente el microscopio compuesto.
- Adquirir conocimiento acerca del cuidado, manejo y utilidad 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 disminución 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 ampliación, 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.
- **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 que impide la penetración directa de la luz a través de las muestras, ya que para la evaluación de campo oscuro es necesario que la luz penetre desde la periferia e ilumine los objetos oblicuamente, con el fin de que éstos aparezcan brillantes sobre el fondo negro. Este tipo de microscopio es útil para el estudio de los movimientos de las espiroquetas en preparaciones con montaje líquido.
- **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 de dos tipos, mecánicos y ópticos. Los mecánicos se presentan en un prototipo moderno de microscopio de investi-

gación 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. El poder de resolución de un microscopio se define como la distancia mínima entre dos puntos que el sistema óptico es capaz de representar claramente. 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

Parte mecánica. Comprende un pie pesado que sostiene el miembro o brazo inclinado del cual pende a su vez el cuerpo del tubo. El tubo puede elevarse o bajarse mediante el tornillo macrométrico (enfoque grosero) - que funciona gracias a un dispositivo con piñón y cremallera - y mediante el tornillo micrométrico (enfoque fino) para precisar más el enfoque. Ambos están gobernados por cabezas de tornillos estriadas. Los microscopios modernos se fabrican en tubos de 160 mm de longitud, lo cual puede aumentarse elevando el tubo deslizable que generalmente está graduado para lograr mayor aumento.

En el extremo inferior del tubo hay un portaobjetivos (revólver) que lleva las lentes de aumento u objetivos; el brazo sostiene también la platina, sobre la que se colocan los portaobjetos para examinar; éstos se mantienen en posición fija mediante unos sujetadores; hay también platinas mecánicas que permiten el movimiento de los objetos. La parte inferior del brazo o apéndice sostiene el espejo.

Parte óptica. Consta de los objetivos, los oculares, el espejo y el condensador. Los objetivos son tubos pequeños que contienen una combinación de lentes. Los de uso corriente tienen una distancia focal de 16 mm (aumento pequeño). En bacteriología, citología y otras investigaciones que requieren aumentos altos, se emplea una lente de inmersión en aceite, de 2 mm. Para el objetivo de inmersión se coloca en el cubreobjetos una gota de aceite de inmersión (prácticamente del mismo índice de refracción que el vidrio) y se enfoca el objetivo dentro de ella. Con esto se incrementa la iluminación.

La distancia entre el objetivo y el portaobjetos se llama distancia de enfoque. En los microscopios modernos, una vez que se ha enfocado el objeto de poco aumento, queda casi enfocado cuando se cambia (girando el revólver) por el objetivo de gran aumento, sin que haga falta más de una vuelta al tornillo micrométrico para enfocar exactamente 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

- Consiste en un conjunto de lentes.
- Las lentes del microscopio se encuentran montadas en dos grupos, uno en cada extremo de un tubo relativamente largo, o tubo del microscopio.
- El primer grupo de lentes se encuentra en el extremo inferior del tubo inmediatamente arriba de la preparación que se va a examinar (el objeto), y se denomina objetivo.
- El segundo grupo se encuentra en el extremo superior del tubo, por donde mira el microscopista, y se llama ocular.

Los objetivos

Aumento. El poder de aumento de cada objetivo se indica por un número grabado en la manga de la lente:

- El objetivo 10X aumenta 10 veces.
- El objetivo 40X aumenta 40 veces.
- El objetivo 100X aumenta 100 veces.

(El objetivo 100X generalmente se encuentra marcado con un anillo blanco para indicar que se debe usar con aceite de inmersión).

Distancia de operación del objetivo

Esta es la distancia que hay entre la lente frontal del objetivo y el portaobjetos cuando la imagen se encuentra enfocada. A medida que

el poder de aumento del objeto es mayor, disminuye la distancia de operación.

- Objetivo 10X: la distancia de operación es de 5 - 6 mm.
- Objetivo 40X: la distancia de operación es de 0,5 - 1,5 mm.
- Objetivo 100X: la distancia de operación es de 0,15 - 0,20 mm.

El ocular

Aumento. El poder de aumento se encuentra marcado en el ocular:

- Un ocular 4X aumenta 4 veces la imagen que produce el objetivo.
- Un ocular 6X aumenta la imagen 6 veces.
- Un ocular 10X aumenta la imagen 10 veces.
- Si la imagen del objeto se hace aumentar 40 veces mediante el objetivo 40X y luego 6 veces mediante el ocular 6X, el aumento total será de $6 \times 40 = 240$.

1.3.4 El sistema de iluminación

La fuente luminosa. Preferiblemente se empleará luz eléctrica, dado que, es más fácil de ajustar. Puede proporcionarla un bombillo contenido en el microscopio por debajo de la platina o mediante un bombillo exterior colocado frente al microscopio.

El espejo. El espejo refleja los rayos de la fuente luminosa sobre el objeto; por un lado, su superficie es plana, mientras que por el otro es cóncava.

El condensador. El condensador lleva los rayos luminosos a un foco común sobre el objeto que se habrá de examinar. Se pone entre el espejo y la platina. Se puede elevar (iluminación máxima) y bajar (iluminación mínima), y se debe centrar y ajustar adecuadamente.

El diafragma. El diafragma se encuentra dentro del condensador, se utiliza para reducir o ampliar el ángulo, y controla la cantidad de luz que entra en el condensador. Cuanto más se abre el diafragma, más se

amplía el ángulo y en consecuencia, aumenta la Apertura Numérica (AN), por lo que se pueden observar detalles más pequeños.

Filtro. En algunos microscopios se ajustan filtros de colores (principalmente azules) debajo del condensador.

Sistema de ajuste. Este sistema comprende:

- La cremallera de avance rápido. Es el tornillo más grande y se utiliza primero para lograr la aproximación del enfoque.
- El tornillo micrométrico de avance lento. Este hace que el objetivo se desplace más lentamente. Se emplea para conseguir un enfoque perfecto del objeto.
- El tornillo de ajuste del condensador. Se utiliza para elevar el condensador y aumentar o descender la iluminación.
- Tornillos para centrar el condensador. Pueden haber tres tornillos colocados alrededor del condensador: uno al frente, uno a la izquierda y el otro a la derecha. Se usan para centrar el condensador exactamente en relación 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 soplete de aire o pincel fino.
 - Frote sin presionar con papel de lente, usando éste una sola vez.
- b. Ubique y enfoque la preparación en la platina a bajo aumento; pase a mayor aumento. No use el objetivo de inmersión excepto con preparaciones y cubreobjetos delgados, o preparaciones fijadas sobre el portaobjetos (sin cubreobjeto).
- c. Siempre vuelva el objetivo de menor aumento a posición de trabajo, antes de cambiar de preparación o guardar el microscopio.
- d. Limpie la lente frontal del objetivo de inmersión con papel de lente inmediatamente después de usarlo; quite el grueso del aceite con una hoja; luego límpielo con una segunda hoja ligeramente mojada en xilol o bencina y, por último, séquelo con una tercera hoja.

No use cantidades excesivas de solvente porque puede disolver el pegante de los componentes de los lentes. Nunca debe usarse el alcohol, pues daña las superficies enlacadas del instrumento.

- e. Mantenga siempre tapado o guardado el microscopio cuando no esté en uso.
- f. En sitios de excesiva humedad ambiental, guarde el microscopio bajo una campana de vidrio con un desecante como carbonato de calcio, o con un pequeño foco eléctrico que eleve la temperatura unos 5-10°C. Un deshumecedor de ambiente protege todo el equipo del laboratorio; el aire acondicionado también deshumedece.

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

La unidad de medida en microscopía es 0,001 mm y se conoce con el nombre de micra (μ). Para medir objetos que se observan en el campo visual de un microscopio, se emplea el micrómetro ocular, que consiste en una placa de cristal con una escala grabada, que se incrusta

sobre el diafragma del campo ocular, de tal manera que la escala queda enfocada por hallarse en el plano de la imagen real intermedia.

Debido a que los aumentos varían de un microscopio a otro, las escalas de los micrómetros oculares no representan medidas convencionales, sino simples unidades. Para determinar la distancia lineal que representa cada unidad, o sea, el valor micrométrico, deben efectuarse calibraciones para cada aumento de un microscopio, empleando para tal fin un micrómetro objetivo, que es similar a un portaobjetos y tiene grabada una escala que representa medidas exactas y convencionales. Generalmente se emplea un micrómetro objetivo cuya escala comprende 100 ó 200 divisiones de 0,01 mm ($10\ \mu$).

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 $10\ \mu$.

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. En la figura se muestra cómo las dos 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 $1000\ \mu$ en 1 mm, estas divisiones están $1,43\ \mu$ aparte. Con esta información conocida, el micrómetro objetivo es reemplazado

con una lámina portaobjetos que contiene un microorganismo para ser medido.

Establecido este dato, se determina la fórmula o coeficiente micrométrico. Por ejemplo, si 20 divisiones del micrómetro ocular cubren tres unidades del objetivo, una unidad o división del ocular representará $3 \times 0,01 \text{ mm} = 0,0015 \text{ mm}$ ó $1,5 \mu$. Cada 20 divisiones del micrómetro ocular valen, por lo tanto, $1,5 \mu$ para la combinación óptica con que se trabaja; por consiguiente, el valor micrométrico (VM) en micras (μ) se obtiene así:

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. Ejemplo con un ocular de 10X:

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

Medición. Para medir un objeto en el campo del microscopio es necesario hacer coincidir un extremo o división mayor de la escala del micrómetro ocular con un extremo del objeto que se va a medir. Cuente el número de unidades que representa y multiplíquelas por el valor micrométrico (VM) que corresponda al objetivo empleado. El valor resultante corresponde a 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.
- ¿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.

Se han desarrollado y aplicado diversos procesos de desinfección y esterilización para limitar su presencia o eliminarlos. La esterilización es un método de eliminación total de todo tipo de microorganismos y que asegura la ausencia absoluta de cualquier forma viviente, mientras que la desinfección es un proceso que sólo elimina formas vegetativas de los microorganismos.

1.5.2 Objetivos

- Conocer las diversas formas de esterilización.
- Realizar la práctica de envoltura y acondicionamiento de los materiales para su posterior esterilización.
- Llevar a la práctica los pasos necesarios en el uso de la autoclave, la estufa y el 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 queme. 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 (Figura 8).

Figura 8. Incubadora.



Fuente: los autores

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 (Figura 9). 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 9. Autoclave vertical, permite la destrucción de microorganismos



Fuente: los autores

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 que permite que el calor penetre

y se absorba. Este método es excelente para esterilizar medios en frascos, pero si el volumen es mayor de un litro deberá aumentarse 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 recomienda cubrir el algodón con una bolsa pequeña de papel invertida para evitar que se humedezca excesivamente. Los medios preparados en tubos de ensayo deben ponerse en canastillas de malla metálica, con los tubos algo separados para que el calor penetre uniformemente.

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 ultravioleta (UV) para esterilizar medios; pero como estos rayos tienen 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.

Figura 10. Funcionando el ultravioleta.



Fuente: los autores

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 esterilización 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.

Pasteurización

Debe su nombre a Pasteur, quien fue el primero en utilizar este método. Consiste en someter el líquido a un calentamiento rápido seguido de un enfriamiento posterior. La temperatura aplicada es de 63°C durante 30 minutos, con lo que se consigue la destrucción de las formas vegetativas, excepto las termófilas. Existe una pasteurización denominada alta o instantánea, en los que se mantienen películas delgadas de leche vaporizada sobre tubos o placas a 71°C; con esta pasteurización alta se requiere una exposición de sólo 15 segundos.

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.

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.
- Cajas de Petri de vidrio.
- Pipetas de 1 o 2 mL.
- Pipetas de 10 mL.
- Pipeta Pasteur.

- Matraces Erlenmeyer de 250 mL.
- Parrilla de calentamiento con agitación.
- Autoclave.
- Horno de calor seco.
- Mechero Fisher.
- Incubadora a 35°C.
- Hisopo estéril, algodón y gasa.
- Papel Kraft para envolver.

1.5.5 Procedimiento

1. Coloque el material que va a esterilizar en la autoclave.
2. Calibre el reloj a funcionar por un período de 15 minutos. El ciclo de esterilización se iniciará automáticamente cuando se obtiene la presión a 15 libras y una temperatura a 121°C. Cuando el ciclo de exposición se completa, el esterilizador se apagará automáticamente y la válvula de escape se abrirá también automáticamente.
3. Abra la cámara solo cuando la presión de la misma baje a cero "0". Cuando abra la cámara, permita por unos segundos que el vapor escape de la cámara antes de proceder a abrirla por completo.
4. Remueva los materiales. Si se trata de líquidos, páselos directamente a la cámara de aislamientos.
5. Drene el agua de la cámara, lávela ligeramente y límpiela.
6. Seque bien el interior de la cámara.
7. Deje abierta la puerta de la cámara durante la noche.
8. Una vez frío el material sacado de la autoclave, se debe rotular un tubo con caldo nutritivo estéril y colocarlo en la estufa de cultivo junto con otro tubo que no haya sido sometido a esterilización.

Observaciones y resultados

1. Describa todo el procedimiento de la esterilización de material en autoclave.
2. A las 72 horas observe los resultados del material incubado.

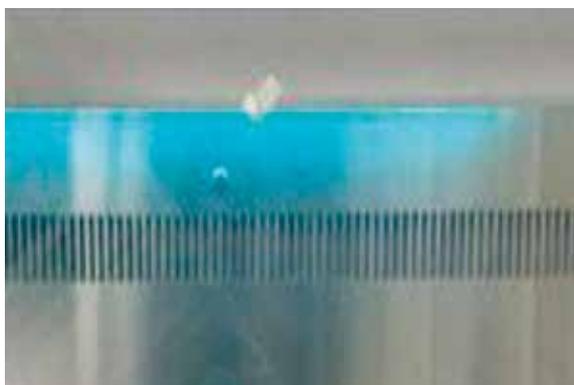
1.6 EFECTOS LETALES DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

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 onda 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.

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 $0,45 \mu$.

Figura 11. Luz ultravioleta.



Fuente: los autores

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 . Ella une la brecha que hay entre los rayos X y las longitudes de ondas más cortas visibles al ojo humano (Figura 11). 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 Å) incluye radiaciones que son absorbidas por el aire y, consecuentemente, funciona solamente en un vacío. Esta región también se refiere como “vacío ultravioleta”.

Los efectos germicidas de los 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.

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 rayarán sobre agar nutritivo 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, raye 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.

Nota: No mire directamente sobre la lámpara ultravioleta. Estos rayos son peligrosos.

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?

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 masiva 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

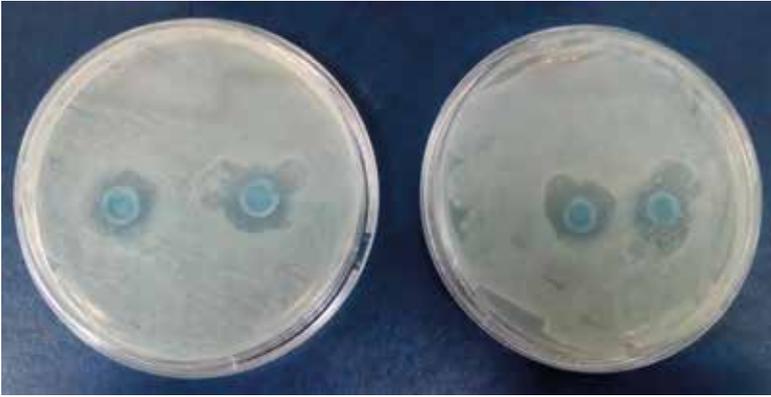
- **Evaluación del control por calor.** En un tubo estéril sembrar una asada de una colonia de *Escherichia coli* y en otro tubo una colonia de *Bacillus subtilis*; diluir en 1 mL de solución salina estéril o agua peptonada y agitar en vortex; sumergir los tubos al baño María cuando el agua esté hirviendo; 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 (López y Nuñez, 2011).
- **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 en el espectrofotómetro a una longitud de onda determinada). Se puede variar el microorganismo y la sustancia que se va a evaluar, así como la dilución del controlador químico (Pérez *et al.*, 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 vortex, 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 en cada caja irradiada sobre el número de colonias 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 vortex, tomar de allí 1 mL, trasladarlo a una caja de Petri vacía y estéril. 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 (Pérez *et al.*, 2009).

Figura 12. Control por pozos.



Fuente: los autores

- **Control por sensidiscos.** Tomar una colonia de *Staphylococcus aureus* y diluirla en 10 mL de Agua Destilada Estéril (ADE), tomar de allí 1 mL por cada tubo y diluirlo en cada tubos de Agar Plate 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, sumergir los discos en cada extracto etanólico, impregnar además, otros con el alcohol que se usó como diluyente. Con la ayuda de una pinza estéril poner los sensidiscos (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 (Pérez *et al.*, 2009).

Figura 13. Control por sensidisco.



Fuente: los autores

2.2 PRESENCIA DE MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA

2.2.1 Introducción

La actividad microbiana se manifiesta en diversos ambientes y materiales donde se desarrollan múltiples funciones, sean estas benéficas o perjudiciales. 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 (Lee, 2011).

La ubicuidad de los microorganismos se basa en tres características principales:

- Su tamaño pequeño, que les permite una gran capacidad de dispersión.
- Su variabilidad y flexibilidad metabólica, que les permite tolerar y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables.

- Su plasticidad genética (o gran capacidad de transferencia horizontal de genes), que les permite recombinar y recolectar los caracteres positivos y persistir durante largo tiempo adaptándose a condiciones ambientales cambiantes.

Independientemente de la constante relación “rechazo” (enfermedad, degradación), “dependencia” (utilización de microorganismos para fabricar productos: queso, cerveza, antibióticos, enzimas; etc.), entre los humanos y los microorganismos, este grupo de organismos “invisibles” representan un vasto terreno inexplorado de conocimiento y diversidad biológica. 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 (Kloepper y Zhang, 2017).

2.2.2 Objetivos

- Observar la presencia de los microorganismos en el ambiente.
- Validar el concepto de ubicuidad microbiana.

2.2.3 Materiales y equipos

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

2.2.4 Procedimiento

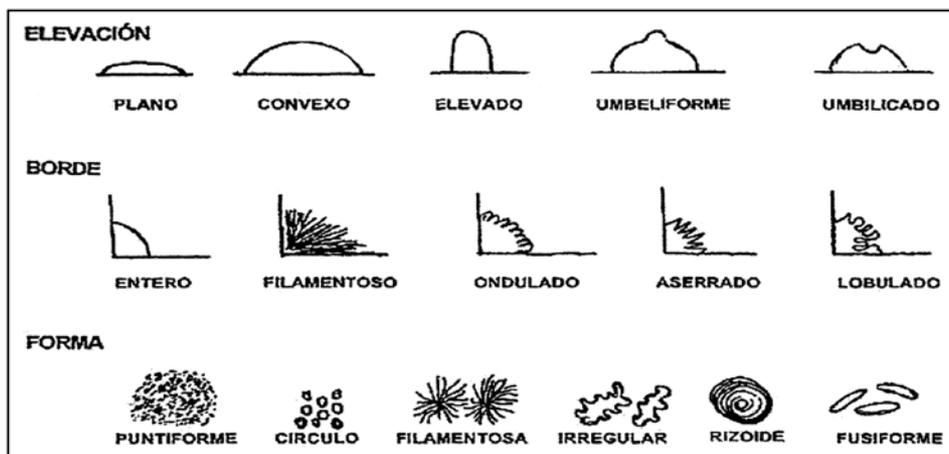
- a. Microorganismos presentes en el aire.
 - Tome dos cajas de Petri; una con agar nutritivo y otra con agar Saboraud. Posteriormente, se procede a abrirlas y depositarlas en un espacio escogido por Ud. dentro del laboratorio de Microbiología.
 - Exponga las cajas de Petri por un período de 30 minutos. Enseguida, tape las cajas, séllelas con cinta vinilpel y márquelas.

- Incúbelas a 37°C / 24 horas.
- Al cabo de este tiempo observe el crecimiento de los microorganismos que aparecen en las cajas de Petri.
- Observe, compare y describa con la ayuda de la figura 1 el tipo de colonias que crecen.

2.2.5 Observaciones y resultados

1. Mencione algunas de las actividades benéficas y perjudiciales que pueden llevar a cabo los microorganismos.
2. ¿A qué se refiere cuándo se menciona el término aislamiento?
3. Defina el término colonia.

Figura 14. 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 microorganismos tienen alta capacidad para adaptarse a muchos sustratos. Según sus requerimientos nutricionales se consideran

como exigentes y no exigentes. Su estudio se ha hecho posible gracias a la implementación de los medios de cultivo, los cuales le suministran al microorganismo los elementos y factores de crecimiento necesarios para su desarrollo. 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 et al. 2015).

Aunque los diferentes medios contienen gran cantidad de sustancias dependiendo del microorganismo que se desee aislar, un gran número de microorganismos crece en medios básicos formulados a partir de:

- **Agentes solidificantes:** Agar, gelatina, agarosa, agar nutritivo.
- **Peptonas:** las cuales varían de pureza y calidad dependiendo del tipo de hidrólisis realizada.
- **Infusión y extractos:** regularmente son de carne y otros tejidos; se trata del material de origen proteico, soluble en agua, sin acción enzimática.

Los medios de cultivo usualmente pueden contener:

- Colorantes que permitan la tinción de paredes del microorganismo, por ejemplo: cristal violeta, safranina, verde de malaquita.
- Dispersantes como cloruro de sodio o tween.
- Indicadores de pH.
- Agentes antimicrobianos: sulfamidas.

Los medios de cultivo se pueden clasificar en:

- **Sólidos:** Aquellos que contienen agar, gelatina o huevo coagulado.
- **Líquidos:** Carecen de agar o un agente solidificante. Se conocen como caldos de cultivo.
- **Semilíquidos:** presentan características similares a los medio sólidos.

Existen otros medios de cultivos que se utilizan con propósitos específicos. En este grupo se encuentran: **medios selectivos, diferenciales, de mantenimiento, medios no selectivos y enriquecidos.**

2.3.2 Objetivos

- Conocer el protocolo de preparación de un medio de cultivo y reconocer la importancia de sus componentes para el crecimiento de los microorganismos.
- Conocer los métodos generales de siembra 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. Los medios de cultivo pueden prepararse a partir de sus componentes o según las recomendaciones del fabricante, cuando éste se consigue comercialmente hay varias reglas que se deben guardar para asegurar la buena calidad del medio preparado, estas normas son:

- ✓ El agua utilizada debe ser destilada, bidestilada o desmineralizada, proveniente de un sistema adecuado de destilación; su medida debe ser exacta y en ningún momento con aproximaciones que generalmente se traducen en una alteración de la consistencia del medio.
- ✓ Si los ingredientes necesarios para preparar el medio de cultivo son deshidratados deben permanecer en remojo durante 15 minutos, con la finalidad de permitir una hidratación total de las moléculas, lo cual facilita el calentamiento excesivo que conduce generalmente a evaporación y descomposición del medio.
- ✓ Antes de someterse a la acción de la autoclave el medio debe estar completamente disuelto. No se debe disolver con la temperatura de la autoclave, pues generalmente el exceso de calor produce un medio con grumos debido a una deficiente disolución.

- ✓ Los medios de cultivo que contienen suplementos como yema de huevo, carbohidratos, urea, antibióticos o cualquier nutriente deben ser esterilizados por filtración o vapor fluente. **No pueden ser esterilizados en autoclave.** El medio base se esteriliza en autoclave. La mezcla de los componentes se realiza cuando el medio base ha alcanzado una temperatura entre 45 y 50 °C.
- ✓ Todos los medios de cultivo después de preparados y vertidos en las cajas de Petri estériles deben colocarse en posición invertida con la finalidad de eliminar el exceso de agua que queda en la superficie para evitar la contaminación.
- ✓ Las cajas servidas con el medio de cultivo pueden ser almacenadas en refrigeración y envueltas en bolsas plásticas hasta por tres semanas, dependiendo del medio de cultivo. Los medios que contienen antibióticos deben utilizarse en menos de dos semanas.

Caracterización de medios de cultivo comerciales.

- ✓ Observe cada uno de los medios de cultivo deshidratados o de otros componentes que estén dispuestos en la mesa del laboratorio. Registre los siguientes datos: Nombre, composición, usos y preparación.
- ✓ Destape el envase y determine (sin tocar su contenido): color, olor, textura (cristales, gránulos, polvo).

Preparación de medios de cultivo y caldo nutritivo.

- ✓ Efectúe los cálculos correspondientes para preparar 250 mL de agar nutritivo comercial y 250 mL de caldo nutritivo.
- ✓ Siga las instrucciones de la etiqueta del frasco (20 g/L por ejemplo, dependiendo del medio de cultivo). No olvide verificar el pH del medio. Disuelva en un Erlenmeyer con agitación sin que este llegue a hervir. Tenga cuidado, utilice guantes de protección.
- ✓ El laboratorio les entregará medio ya preparado en cajas de Petri, tubos de ensayo con agar inclinado y caldo nutritivo para sembrar cultivos bacterianos y el medio preparado en el laboratorio por los estudiantes será utilizado en el siguiente laboratorio.

Métodos de siembra

Siembra en tubo con medio sólido inclinado.

- Con el asa esterilizada y fría tome una muestra de bacterias e introdúzcalas en línea recta en un tubo de ensayo con agar nutritivo inclinado e inocule la muestra del microorganismo sobre la superficie del medio. Flamee la boca del tubo y tápelo. Flamee nuevamente el asa y repita el procedimiento con cada uno de los cultivos bacterianos entregados. **No olvide rotular.**
- En esta prueba Usted debe observar qué tipo de crecimiento tiene la muestra bacteriana (24 horas después de la siembra) de acuerdo a las siguientes descripciones:
 - ✓ **Filiforme:** Crecimiento uniforme a lo largo de la línea de inoculación.
 - ✓ **Equinulado:** Márgenes con apariencia dentada (Diente).
 - ✓ **Rosariforme:** Colonias separadas, casi juntas o en forma de rosario o semifloculenta a lo largo de la línea de inoculación.
 - ✓ **Efuso:** Crecimiento muy delgado como de velo.
 - ✓ **Arborescente:** Ramificado o arboriforme.
 - ✓ **Rizoide:** Con apariencia de raíces.

Siembra en caldo nutritivo

Siembre en tubos con caldo nutritivo las mismas bacterias que sembró en el procedimiento anterior y observe el tipo de crecimiento (24 horas después de la siembra). **No olvide rotular** y determine si el crecimiento bacteriano en medio líquido es:

- ✓ **Superficial:** Película membranosa, floculenta (masas de bacterias flotantes).
- ✓ **Sub-superficial:** Turbia, granulada, floculenta. escamosa.
- ✓ **Sedimento:** Granular, floculento, escamoso, viscoso.

Siembra en caja de Petri con medio sólido.

- Obtenga una segunda muestra de cada cultivo bacteriano y siembre suavemente de manera horizontal sobre la superficie del agar contenido en las cajas Petri.
- Tape, esterilice el asa y repita la operación con los demás cultivos. **NO OLVIDE ROTULAR.**

Siembra en superficie

Flamee y enfríe el asa bacteriológica antes de iniciar con el procedimiento de siembra.

Siembra por estría

- ✓ Tome con el asa una muestra de un tubo que contiene un cultivo bacteriano mixto y siembre sobre un tercio de la caja de Petri que contiene agar nutritivo.
- ✓ Flamee el asa y enfríela.
- ✓ En un extremo de la caja con agar nutritivo realice rayados suaves en forma horizontal sobre la superficie formando estrías. Flamee nuevamente el asa, gire la caja 90°, raye la superficie formando estrías y continúe el mismo procedimiento en los tres extremos restantes de la caja. En el último extremo, cuando esté realizando la última estría tenga cuidado de no tocar con el asa el primer rayado que realizó.

Siembra por agotamiento

- ✓ Tome con el asa de argolla una muestra de bacteria y en un extremo de la caja de Petri con medio de cultivo, realice rayados suaves de un extremo al otro en un tercio de la caja, de allí en adelante reduzca el rayado hasta terminar en el punto medio del otro extremo de la caja.

Siembra en profundidad

- ✓ Esta técnica requiere la preparación previa de diluciones con agua peptonada. Se prepararán hasta 10^{-3} las diluciones.

- ✓ Marque las diluciones así: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
- ✓ Para cada una de las diluciones utilice pipetas estériles.
- ✓ Agregue 1 mL de cada dilución a sembrar en el centro de una caja de Petri estéril vacía.
- ✓ Vierta el medio de cultivo Plate Count Agar (PCA) contenido en los tubos de ensayo fundidos a 45°C sobre la caja de Petri con la dilución. Homogenice realizando movimientos giratorios horizontales en varias direcciones, teniendo cuidado de no formar burbujas y de no derramar el medio.
- ✓ Deje solidificar e incube.

Siembra por punción o picadura

- ✓ Utilice un medio de cultivo sólido e inclinado en un tubo de ensayo.
- ✓ Flamee y enfríe el asa de punta recta en el agar sólido.
- ✓ Tome una muestra del cultivo microbiano y realice la punción vertical del medio de cultivo con el asa, tape el tubo flameando previamente la boca del mismo.
- ✓ Flamee nuevamente el asa.
- ✓ Incube por 24 horas.
- ✓ Verifique la forma del crecimiento del cultivo.

NOTA: Esterilice el asa en la llama del mechero calentándola completamente hasta el rojo.

2.3.5 Observaciones y resultados

Explique los propósitos microbiológicos que se emplean en los medios de cultivo: selectivos, diferenciales, de mantenimiento, no selectivos y enriquecidos. Dé algunos ejemplos de cada uno de estos medios e indique el protocolo de preparación.

Describa el proceso que se debe realizar para adicionar un antibiótico a un medio de cultivo.

Haga una tabla donde indique cuáles son los medios de cultivo apropiados para el crecimiento de estas bacterias: *Bacillus* sp., *Salmonella* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* sp.

ANEXO 1. Métodos de siembra



Fuente: Kramer et al. (2002)

2.4 MORFOLOGÍA BACTERIANA Y FUNDAMENTOS DE TINCIÓN

2.4.1 Introducción

La determinación del tamaño y la morfología de los microorganismos juegan un papel fundamental como ayuda para su clasificación. A través de las determinaciones morfológicas, se puede efectuar el reconocimiento de los microorganismos acompañada con una adecuada consulta bibliográfica científica. Para facilitar el estudio del tamaño y la morfología de las bacterias se puede confirmar observándolas sin teñir, demostrando la movilidad o cuando son teñidas con colorantes (Vargas y Kuno, 2015).

Los colorantes son compuestos orgánicos que contienen radicales cromóforos (que producen color), pueden ser ácidos, básicos o neu-

tros. Los colorantes ácidos tiñen las partes celulares básicas y los básicos las partes celulares ácidas. La coloración de las células parece deberse a una combinación de fenómenos químicos y físicos como la capilaridad, la adsorción, la ósmosis y el intercambio de iones entre el colorante y los sitios activos de la superficie o del interior de la célula. Es importante que todos los colorantes se preparen en el laboratorio siguiendo las instrucciones específicas del fabricante (Vargas y Kuno, 2015). Es preciso seguir paso a paso los detalles cuando se preparan mezclas o compuestos colorantes múltiples, el período y las condiciones de almacenamiento pueden ser factores críticos para determinar la composición y la calidad tintórea de la solución final. En el estudio de los microorganismos se realizan dos tipos de coloración:

a) Coloración simple.

Este método consiste en teñir una célula, utilizando un solo colorante bien sea ácido o básico. Los más usados son el azul de metileno, cristal violeta, fucsina o safranina. Estos colorantes se emplean para apreciar la forma y el tamaño, pero no muestran detalles de la estructura interna.

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.

➤ **La coloración Gram.** Elaborada por el Danés Hans Gram en 1884 y permite diferenciar bacterias por la estructura de la pared celular. Al microscópico un extendido de flora bacteriana mixta, coloreado por el método de Gram, muestra las características diferenciales del método. Muchas bacterias conservan la combinación

violeta-yodo y se teñirán de púrpura (Gram positivas), otras se tiñen de rojo por la safranina o el colorante que se emplee en la contra-coloración (Gram-negativas). Este procedimiento permite observar forma, tamaño, otros detalles estructurales y diferenciar dos grupos: debido a las reacciones frente a los colorantes (Gram-positivos y Gram-negativos). Las diferentes reacciones de los dos grupos se atribuyen a la composición química. Las paredes de las células Gram-negativas tienen un contenido lipídico más elevado que las positivas, y aunque en ambas se forma un complejo cristal violeta-yodo, el alcohol extrae el lípido de las células Gram-negativas y aumenta por lo tanto la permeabilidad celular. Esto da como resultado la pérdida del complejo de colorantes y se colorean de rojo con la safranina o la fucsina. El mismo es retenido por las células Gram-positivas, en las cuales la deshidratación por el alcohol ocasiona una disminución de la permeabilidad, reteniendo el cristal violeta tras la decoloración. Las características de coloración de Gram pueden ser atípicas en cultivos muy jóvenes o muy viejos (Vargas y Kuno, 2015).

Según la distribución del **peptidoglicano** de la pared celular que las envuelve, se tiñen de una forma u otra. Así, las bacterias que **no se tiñen** de color violeta mediante esta técnica se denominan **Gram negativas**. Están formadas por una pared más fina formada por menos capas de peptidoglicano y una segunda membrana rica en lípidos (que repele la tinción Gram), al microscopio aparecen de color rosa (**Gram, 2012**).

- **La cápsula es una estructura típica de algunas bacterias.** Su observación exige el empleo de métodos especiales. Algunos métodos para tinción de cápsula están destinados a colorear la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que la envoltura se aprecia por contraste, como el método de Anthony. Otros procedimientos producen un efecto colorante diferencial, cuando la cápsula admite un contra-colorante. Otro procedimiento utiliza el principio de coloración negativa como el método de la tinta china (Aguirre, 2015).
- **Las esporas son estructuras características de algunas bacterias;** estas son relativamente resistentes a los agentes físicos y químicos y no se colorean con facilidad. Por lo general, se requiere el calor

para permitir la penetración del colorante en las esporas (Aguirre *et al.* 2015).

- La prueba de KOH es un método moderno y sencillo para diagnosticar la tinción de 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 *et al.*, 2015).
- La Motilidad es una propiedad de algunas bacterias, esto es debido a la presencia de flagelos. Este hecho puede ser fácilmente demostrable en condiciones de laboratorio.

2.4.2 Objetivos

- Adquirir destreza en la preparación de placas de extendidos de cultivos bacterianos.
- Observar mediante el uso de diferentes colorantes la forma, el tamaño, diferencia en composición de la pared, cápsula y esporas en algunas bacterias.
- Comprobar que la prueba de KOH es más rápida e igualmente eficiente que la coloración de Gram para la tinción estructuras bacterianas.
- Observar al microscopio la motilidad de algunas especies bacterianas.

2.4.3 Materiales y métodos

- ✓ Láminas porta objetos.
- ✓ Láminas cubre objetos.
- ✓ Asa de inoculación.
- ✓ Mechero.
- ✓ Goteros.
- ✓ Cultivo de bacterias.
- ✓ Colorantes: azul de metileno, cristal Violeta, Fucsina, o safranina, nigrosina o tinta china.
- ✓ Agua destilada estéril.

- ✓ Aceite de inmersión.
- ✓ Papel lente.
- ✓ Cristal violeta.
- ✓ Lugol de Gram.
- ✓ Alcohol-Acetona (decolorante).
- ✓ Saftanina o Fucsina (contracolor).
- ✓ Cristal violeta 1% (solución acuosa).
- ✓ Sulfato de Cobre al 20% (solución acuosa).
- ✓ Solución acuosa de Verde Malaquita al 5%.
- ✓ Solución acuosa de safranina al 0.5%.
- ✓ Cajas de Petri estériles.
- ✓ Papel filtro estéril.
- ✓ KOH al 3%.
- ✓ Palillos de madera estériles.
- ✓ Tubos con agua destilada.

2.4.4 Procedimiento

Preparación de extendidos

- Esterilice el asa para bacterias, poniéndola verticalmente a la llama del mechero hasta un color rojo en toda su longitud.
- Enfríe el asa introduciéndola en el borde del medio de cultivo o esperando por unos segundos al lado de la llama del mechero.
- Coloque con el asa una gota de agua destilada estéril en una lámina porta objetos limpia.
- Tome con el asa de argolla suavemente una pequeña porción de colonia bacteriana sin tomar el medio de agar.
- Coloque la muestra sobre la gota de agua del porta objetos, haga una extensión delgada con el fin de que las bacterias queden bien esparcidas. Si Usted observa que la suspensión no se extiende en la superficie del porta-objetos, sino que se recoge en gotas, significa que el porta objetos está engrasado y deberá repetir el proceso en un porta objetos completamente limpio.

- Realice extendidos con todos los cultivos de bacterias que se entregaron (puede colocar dos bacterias diferentes por lámina, siempre y cuando aplique después el mismo colorante).
- Deje que la preparación se seque al aire.
- Fije la preparación pasándola dos veces sobre la llama del mechero, así las bacterias quedan firmemente adheridas al porta objetos.

Nota: Cuando se hacen extendidos a partir de un cultivo en medio líquido, no es necesario colocar la gota de agua.

Coloraciones simples

- Coloque las láminas portaobjeto sobre las que realizó los extendidos sobre una bandeja de coloración.
- Cubra totalmente los extendidos con los colorantes. Debe tener un extendido de cada bacteria para aplicar a cada uno un colorante. Deje actuar los colorantes así:

Cristal violeta	1 minuto
Azul de metileno	5 minutos
Fucsina o Safranina	30 segundos

- Lave las placas con agua destilada, escurra y deje secar a temperatura ambiente. Observe al microscopio con objetivos de 40X y posteriormente con 100X (use aceite de inmersión).

Coloración negativa

- Coloque en el extremo de un porta-objetos una gota de nigrosina o tinta china, tome con el asa una muestra de cualquiera de las bacterias entregadas, mézclala suavemente con la gota. Utilice una porta objetos limpios para extender la gota para que se forme una película delgada. Deje secar.
- Una vez estén secas todas las láminas, observe al microscopio en 4X, 10X, 40X y 100X. Describa la forma, distribución y coloración. Realice esquemas de lo que observa.

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. 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 (Espinosa *et al.*, 2016).

2.5.1.1 Coloración de Gram

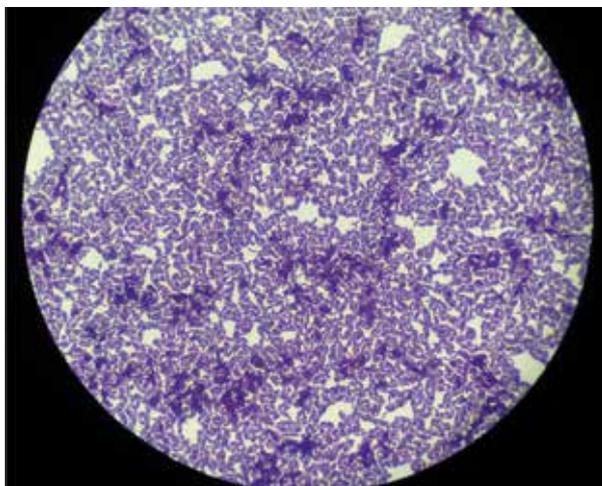
La tinción de Gram es un tipo de **tinción** que se realiza **sobre las bacterias** para observarlas mejor bajo el microscopio.

- Preparar un extendido fino de una colonia bacteriana y dejarlo secar al aire.
- Fijar el material al porta-objetos, de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el porta-objetos 3 o 4 veces sobre la llama del mechero.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución de cristal-violeta durante un minuto.
- Lavar bien con agua destilada estéril (ADE).
- Cubrir el preparado con solución de yodo (Lugol de Gram) durante 1 minuto.
- Lavar nuevamente con ADE.
- Sostener el portaobjetos entre el pulgar y el índice y bañar la superficie con unas gotas del colorante (Alcohol-acetona) por 10-20 segundos dependiendo del extendido (Fase crítica).
- Lavar nuevamente con agua destilada y colocar el porta-objetos nuevamente sobre el soporte, cubrir la superficie con safranina o el colorante que se va a emplear para contra-colorear durante 30 segundos; 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 y las Gram-negativas rojas o rosadas.

2.5.1.2 Coloración de cápsula (método de Anthony)

- Prepare un extendido fino y uniforme de un cultivo bacteriano de *Klebsiella pneumoniae*; extienda con un porta-objetos en ángulo recto.
- Seque al aire. No fijar por calor.
- Coloree con solución acuosa de cristal violeta al 1%, durante 2 minutos.
- Lave con solución de sulfato de cobre al 20%.
- Deje secar al aire en posición vertical y observar el microscopio.
- La cápsula aparece de un color azul pálido y por contraste las células se tiñen de color púrpura intenso y el fondo claro.

Figura 15. Coloración de Gram.



Fuente: los autores

2.5.1.3 Coloración de esporas

- a. Realizar un extendido de una colonia bacteriana tomada del agar con el asa bacteriológica. Cubrir el portaobjetos con una tira de papel filtro.
- b. Bañar todo el portaobjetos con solución acuosa de Verde Malaquita al 5%.

- c. Calentar sobre un beaker en agua en ebullición (al vapor) durante 3 a 6 minutos sin dejar secar. Si es necesario adicione un poco más de colorante.
- d. Enjuagar con agua destilada.
- e. Contra colorear con solución de Safranina al 0.5 % durante 30 segundos.
- f. Lavar con agua destilada y dejar secar al aire.
- g. Observe las esporas que se ven en forma de esférulas verdes en las células bacterianas coloreadas de rojo o rosado, o junto con 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 porta objetos (KOH+ bacteria), deje reposar por 30 segundos. Con el palillo 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

- a) Coloque una gota de agua sobre una lámina portaobjetos.
- b) Suavemente tome con un asa previamente esterilizada un poco de muestra de cultivo bacteriano.
- d) Coloque suavemente el asa sobre la gota de agua teniendo cuidado de no esparcir la gota sobre toda la lámina.
- e) Coloque la lámina cubre objetos sobre la gota y observe al microscopio.

2.5.3 Observaciones y resultados

- 1. Explique el fundamento de la tinción de Gram.
- 2. ¿Por qué esta tinción es fundamental para clasificar los microorganismos?

3. ¿Cuál es la importancia de identificar la cápsula en las bacterias?
4. Mencione ejemplos de bacterias gram negativas y gram positivas.

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 poder replicarse. Los virus utilizan la maquinaria metabólica de las células para sintetizar su material genético y proteínas de la envoltura. Existen distintos tipos de virus que pueden infectar células procariontas o células eucariontes. Los bacteriófagos o fagos son virus que se reproducen en células procariontes (Samaniego et al. 2012).

Los bacteriófagos (fagos) son parásitos intracelulares obligados que se multiplican al interior de las bacterias, haciendo uso de 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 fago alguna de las bases está parcialmente sustituida (Alvarado, 2006).

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 *et al.*, 2012).

2.6.2 Objetivo

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

2.6.3 Marco teórico

Los virus bacterianos o bacteriófagos son extraordinariamente abundantes, y en número, los seres más abundantes de la biosfera. Algunos tienen la capacidad de realizar la transferencia horizontal de genes. Además, porcentajes importantes de genes de algunas bacterias son de origen vírico; algunos de ellos confieren propiedades nuevas a las cepas que los tienen incorporados, en un fenómeno conocido como conversión fágica. Entre estos fagos se encuentran aquellos que transportan los genes de las toxina-Shiga (Samaniego *et al.*, 2012).

2.6.3.1 Composición y estructura del bacteriófago

- **Composición.** Aunque diferentes bacteriófagos pueden contener diferentes materiales, todos ellos contienen ácido nucleico y proteína. Dependiendo del fago, el ácido nucleico puede ser ADN o ARN, pero no ambos, y puede existir en varias formas. Los ácidos nucleicos de los fagos a menudo contienen bases raras o modificadas. Estas bases modificadas protegen a los ácidos nucleicos del fago de las endonucleasas que cortan los ácidos nucleicos del huésped durante la infección. El tamaño de los ácidos nucleicos varía dependiendo del fago. Los fagos más simples solo tienen suficiente ácido nucleico para codificar un promedio de tres o cinco productos génicos, mientras que los fagos más complejos pueden codificar para más de 100 productos génicos (Gardia *et al.*, 2008).

El número de proteínas de diferentes clases y la cantidad de cada una de ellas en la partícula del fago variarán dependiendo de la clase de fago que se trate. El fago más simple posee varias copias de solo una o dos diferentes proteínas, mientras que los más complejos podrían poseer muchos tipos de proteínas diferentes. La función de las proteínas durante la infección es proteger al ácido nucleico de las nucleasas de su medio ambiente (Patricio, 2011).

- **Estructura.** Los bacteriófagos vienen en diferentes formas y tamaños.
- **Tamaño.** Entre este grupo se observa diversos tamaños, al respecto el T4 está entre los fagos más grandes, tiene aproximadamente

200 nm de largo y 80-100 nm de ancho. La mayoría oscilan entre un ancho de 24 a 200 nm de longitud, demostrando una alta variabilidad.

- **Cabeza o cápside.** Los fagos clásicos poseen una estructura a manera de cabeza y pueden variar de tamaño y forma, algunos son icosaédricos (20 caras) y otros son filamentosos. La cabeza o cápside está compuesta de muchas copias de una o más proteínas diferentes, y en el interior de la cabeza se encuentra el ácido nucleico. La cabeza actúa como una cubierta protectora para el ácido nucleico.
- **Cola.** Muchos, aunque no todos los fagos, muestran una cola unida a la cabeza del fago. La cola es un tubo hueco a través del cual el ácido nucleico pasa durante la infección, el tamaño de la cola puede variar y algunos fagos ni siquiera la tienen. En los fagos más complejos como T4, la cola se rodea de una cortina contráctil durante la infección de la bacteria. Al extremo de la cola los fagos más complejos como T4 presentan una placa en la base y una o más fibras unidas a ella, esta placa de base y las fibras de la cola están involucradas en la unión de los fagos a la célula bacteriana. No todos los fagos tienen placas de base ni fibras de la cola, en tales casos existen otras estructuras que se ven asociadas en la unión de partícula del fago a la bacteria (Doval, 2013).

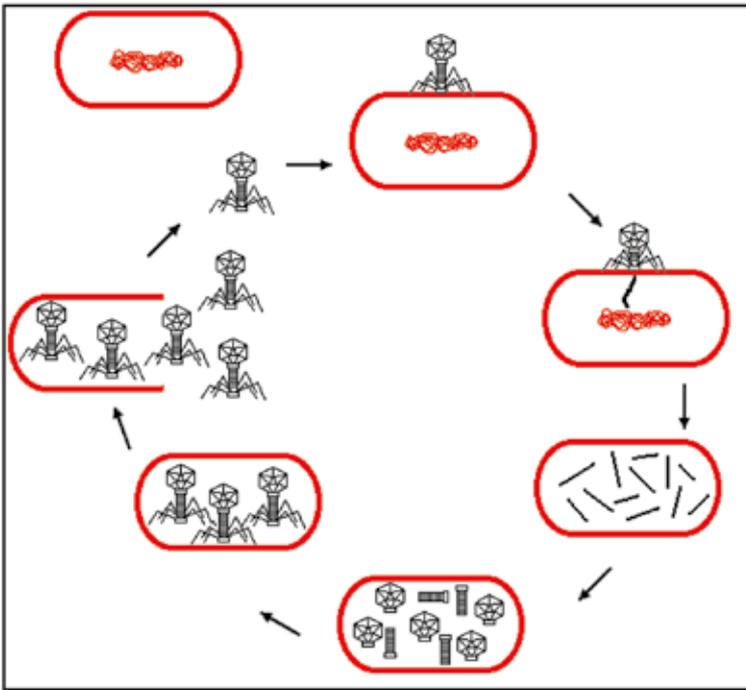
El ciclo de replicación de un bacteriófago T4 se puede dividir esquemáticamente en distintas etapas, las cuales son comunes a otros virus bacterianos y eucarióticos:

- Absorción.
- Inyección del material genético viral.
- Replicación del material genético viral.
- Síntesis de las envolturas proteicas.
- Empaquetamiento del ADN dentro de la envoltura proteica y ensamblaje de la envoltura.
- Lisis y liberación de las partículas viral (Figura 16).

2.6.3.2 Ciclo de multiplicación del fago

- **Fagos líticos o virulentos.** Los fagos líticos o virulentos son fagos que solo pueden multiplicarse en bacterias y matan a la célula, debido a la lisis, al término del ciclo de vida.

Figura 16. Ciclo de replicación de un bacteriófago T4



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

- ✓ **Fago lisogénico o temperado.** Los fagos lisogénicos o temperados son aquellos que bien pueden multiplicarse mediante el ciclo lítico o entran en un estado quiescente en la célula. En este estado quiescente la mayoría de los genes del fago no se transcriben, el genoma del fago existe en un estado reprimido. Al ADN del fago en este estado reprimido se le conoce como profago, ya que no es un fago, pero posee el potencial para producir fagos. En la mayoría de los casos, el ADN del fago realmente se integra en el cromosoma del huésped, se replica junto con el cromosoma del huésped y se transmite a las células hijas. La célula que alberga un profago

no se ve negativamente afectada por la presencia del profago y el estado lisogénico puede persistir indefinidamente. A la célula que alberga un profago se la conoce como lisógena (Doval, 2013).

2.6.4 Materiales

- ✓ Cepa bacteriana de *Escherichia coli*.
- ✓ Agua residual.
- ✓ Medio de cultivo: caldo doble concentrado (CDC).
- ✓ Agar triptosa.
- ✓ Filtro de porcelana.
- ✓ Frascos y botellas estériles.
- ✓ Viales.
- ✓ 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 una botella estéril se coloca 50 mL de caldo doble concentrado (CDC), luego se siembra la cepa problema (*Escherichia coli*) en el CDC (una colonia si la cepa está en medio líquido o cuatro colonias si está en placa), se incuba durante cuatro o cinco horas en el caso de *Escherichia coli*; seguidamente se agrega el agua residual (50 mL) (previamente se debe pasar por papel filtro); luego, se incuba a 37°C durante 18 o 24 horas. Pasado el tiempo, se vuelve a filtrar en papel filtro para luego centrifugar ese filtrado a 1.500 rpm durante 10 minutos; de esta manera, se libera la muestra de macro impurezas, el sobrante se filtra con el filtro bacteriológico de porcelana y el filtro

obtenido, de manera aséptica, se pasa a viales (estériles); luego se taponan y se guardan en refrigeración.

Comprobación de fagos

En una placa con agar triptosa se siembra con hisopo la cepa problema (*Escherichia coli*), seguidamente se incuba por espacio de seis horas; pasado el tiempo, con el asa se añade una gota de filtrado sobre la placa; finalmente, se incuba a 37°C durante 24 horas (observar la formación de placas con lisis).

2.6.6 Observaciones y resultados

1. Realice un esquema para el aislamiento de bacteriófagos.

2.7 METABOLISMO MICROBIANO: PRUEBAS BIOQUÍMICAS

2.7.1 Introducción

Las pruebas bioquímicas determinan en frecuencia el género y especie de las bacterias, basándose en los patrones de fermentación de azúcares y elaboración de varios subproductos metabólicos como el ácido sulfhídrico (sulfuro de hidrógeno, denominado ácido sulfhídrico), y otras (Farras, 2020).

La acción sobre el sustrato está determinada por la ausencia o presencia de diferentes enzimas que guían el metabolismo microbiano.

Los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar son incorporados en un medio de cultivo junto con un indicador que detectará la declinación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos. Entre las reacciones bioquímicas más frecuentes tenemos:

- ✓ Agar Sangre = promueve el desarrollo de la mayoría de las bacterias, además sirve para observar hemolisis.
- ✓ Agar Mac - Conkey \implies 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* fermenta el manitol con producción de 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 éste 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.

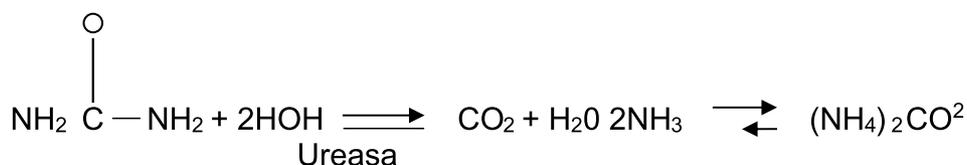
En el agar sangre se desarrollan colonias de color gris opaco, pueden ser secas o mucoides.

❖ Identificación Bioquímica de Especies

La clasificación de las Enterobacterias está basada principalmente en la determinación de la presencia o ausencia de diferentes enzimas que guían el metabolismo de la bacteria.

Los sustratos sobre los cuales estas enzimas pueden actuar son incorporados a un medio de cultivo junto con un sistema indicador que detectará la declinación del sustrato o la presencia de productos metabólicos específicos, entre las reacciones bioquímicas más frecuentes están:

- ✓ **Citrato Simons.** Que se basa en la utilización de citrato por una bacteria como la única fuente de carbono mediante la formación de subproductos alcalinos.
- ✓ **TSI.** A través del medio triple azúcar de hierro se visualiza la utilización de hidratos de carbono; glucosa, lactosa y sacarosa, mediante la fermentación del medio, también se visualiza la producción de gas y H₂O.
- ✓ **Descarboxilasas.** Son un grupo de enzimas y sustratos específicos capaces de actuar sobre la porción carboxilo de aminoácidos, con la producción de aminas de reacción alcalina. En la reacción de descarboxilación se produce dióxido de carbono como producto secundario, cada descarboxilasa es específica para cada aminoácido, lisina, ornitina, y arginina, en caso de las enterobacterias produce las siguientes aminas específicas:
 - Lisina cadaverina
 - Ornifina putrescina
 - Arginina citrulina.
- ✓ **Urea.** La ureasa es una enzima que poseen muchas especies de microorganismos, que pueden hidrolizar la urea para producir amoníaco, agua y CO₂.



El amoníaco reacciona en solución para formar carbonato de amonio produciéndose una alcalinización que aumenta el pH del medio.

- **Movilidad.** La movilidad bacteriana es otra característica importante en la identificación final de una especie, las bacterias se mueven por medio de flagelos.
- **Producción de sulfuro de hidrógeno denominado ácido sulfhídrico (H_2S).** 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 de degradación metabólica del aminoácido triptófano; las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de hidrolizar y de desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco.
- **Rojo de Metilo.** Es una prueba cuantitativa para la producción de ácidos y requiere la producción de ácidos fuertes (láctico, acético, fórmico), a partir de la glucosa por vía fermentativa.
- **Prueba de Voges Proskauer.** El ácido pirúvico componente fundamental formado en la degradación fermentada de la glucosa, es metabolizado a través de varias vías de acuerdo con los sistemas enzimáticos que poseen las diferentes bacterias, uno de los productos es la acetoína de reacción neutra. 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 para revelar un color rojo.

Sistemas Comerciales de Identificación Microbiana. La introducción de sistemas comerciales de identificación microbiana a partir de la década de 1.960 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

- Con un asa recta, se transfiere una colonia bien aislada del microorganismo en el estudio a la superficie de un portaobjeto.
- 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 sometidas 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

- Se coloca 0.5 mL de plasma de conejo en el tubo.
- Se añade 0.5 mL del cultivo puro.
- 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 microorganismo a estudio.

Técnica

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

Interpretación

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

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

2.7.3.4 Prueba de Tolerancia al NaCl 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* la cual pertenece a la familia Enterobacteriaceae se utilizan las siguientes pruebas bioquímicas.

2.8.2 TSI (Triple Azúcar Hierro)

2.8.2.1 Objetivo

- Identificar los microorganismos de las bacterias enterobacteriaceae.

2.8.2.2 Materiales

Se prepara, el agar TSI según instrucciones de la casa comercial y se distribuye en tubos tapa rosca de 16 x 10 mm. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos y posteriormente se inclina.

Técnica

Se inocula con el asa recta una colonia del microorganismo en estudio y se punciona el medio por el centro hasta el fondo del tubo y se hace estrías en la superficie. Se incuba por 24 horas y se interpreta.

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 prepara, según instrucciones de la casa comercial, se distribuye en tubos tapa rosca. Se esteriliza, a 121°C por 15 minutos y se inclina.

Técnica

Se inocular el medio con asa recta una colonia del microorganismo, se hace doble punción y se estría la superficie. Se incuba de 18 a 24 horas a 37°C.

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 agrega el indicador, se distribuye en tubos tapa rosca estériles junto al mechero y se inclinan.

Técnica

Se inocular 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 prepara el medio según instrucciones de la casa comercial. Se distribuye en tubos tapa rosca, se esteriliza a 121 °C por 15 minutos.

Técnica

Se inocular el medio con asa recta, se incuba a 37°C por 24 horas. El agar SIM se debe inocular por picadura en el centro hasta la mitad o un centímetro antes del fondo.

Interpretación

Se realiza un examen macroscópico del medio observando una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación que se interpreta como una prueba positiva de movilidad.

2.8.6 Indol

Materiales

- Medio SIM.
- Reactivo de Kovac's.

Técnica

Se inocular el medio con asa recta. Se incuba de 18 a 24 Horas a 37°C, transcurrido este período se añade 5 gotas de reactivo de Kovac's.

Interpretación

La aparición de un anillo rojo indica una prueba positiva para 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

El no ennegrecimiento de los medios se interpreta como una producción de H₂S negativa.

2.8.8 Utilización de Citrato

Materiales

Agar Citrato Simons, el cual se prepara según instrucciones de la casa comercial, se distribuye en tubos tapa rosca. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Se inclinan posteriormente.

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.

2.8.9 Rojo metilo

Materiales

– Caldo RM / VP

Se prepara según instrucciones de la casa comercial. Se distribuye en tubos tapa rosca y se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Indicador rojo de metilo.

Técnica

Se inocula el caldo RM/VP con el microorganismo a estudio y se incuba de 18 a 24 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se agrega 4 gotas del indicador rojo de metilo.

Interpretación

Al agregarle el indicador el medio desarrolla un color rojo lo que indica una prueba positiva para la Prueba de Rojo del Metilo.

2.8.10 Prueba Voges Proskauer

Materiales

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

Técnica

Se inocula, el Caldo RM/VP con el microorganismo a estudiar, se incuba a 37°C de 18 a 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación se transfiere 1 mL del caldo RM/VP a un tubo estéril, se añade 0.6 mL de alfa Naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40% exponiéndolo al oxígeno atmosférico.

Interpretación

La prueba se considera negativa cuando no desarrolla un color rojo a los 15 minutos de agregado el reactivo.

Figura 17. Prueba de azul.



Fuente: los autores

2.8.11 Prueba de oxidasa

La oxidasa es una enzima que cataliza una reacción de oxidación/reducción envolviendo oxígeno molecular (O_2) como aceptor de electrones. En estas reacciones el oxígeno se reduce a agua (H_2O) o a peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La prueba de la oxidasa se utiliza como una característica fenotípica en la identificación de cepas bacterianas aeróbicas o aeróbicas facultativas. Esta prueba determina si la bacteria produce citocromo oxidasa (y por lo tanto, utiliza oxígeno en la cadena de transporte de electrones).

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

Técnica

Se toma una porción de la bacteria y se estría sobre el borde de la tira. Espere 60 segundos.

Interpretación

Prueba Positiva: Coloración púrpura en la tira.

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

Tabla 1. Reacciones bioquímicas de algunas enterobacterias.

PRUEBA		MICROORGANISMO A EVALUAR			
		Escherichia coli	Proteus vulgaris	Salmonella typhi	Klebsiella pneumoniae
	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 Cía. Ltda., (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 tanto, en esta sección se proporciona información sobre los mecanismos de reproducción bacteriana, así como su utilización en la determinación de las 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 (Balletsteros *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 (Albornoz, 2014).

- **Medición del crecimiento microbiano.** La medición del crecimiento celular en suspensión se lleva a cabo con recuento celular, masa celular o actividad celular. Estos métodos se clasifican en: métodos directos y métodos indirectos (Balletsteros *et al.* 2018).
- ✓ **Métodos directos.**
 - Recuento del número de células en una cámara.
 - Peso seco celular.
 - Determinación de nitrógeno o de proteínas totales.
 - Determinación de DNA.

✓ **Métodos indirectos.**

- Recuento de colonias en placa.
- Recuento sobre filtro de membrana.
- Consumo de oxígeno.
- Liberación de dióxido de carbono.
- Concentración de un enzima constitutivo.
- Decoloración de un colorante.
- Incorporación de precursores radiactivos.
- Medida de la turbidez.

✓ **Absorción.** Cuando un haz de luz paralelo (colimado) golpea una partícula en suspensión, parte del haz es reflejada, parte, se dispersa, otro se absorbe y parte se transmite. La nefelometría es un procedimiento que mide la dispersión de la luz en una solución de partículas (Ballersteros *et al.*, 2018).

Los métodos de dispersión de la luz son las técnicas más utilizadas para monitorear el crecimiento de los cultivos bacterianos. Son muy útiles y poderosos pero pueden llevar a resultados erróneos. Principalmente, dan información sobre el peso seco (contenido macromolecular).

- ✓ **Turbidimetría.** Mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida.
- ✓ **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 realizan en cámaras de recuento, aunque en algunos casos se utiliza muestras filtradas en membranas o teñidas con colorantes fluorescentes (Naranja de acridina).

El recuento en cámara presenta el problema de reproducibilidad, junto con la dificultad de adsorción de las células en las superficies del vidrio, incluyendo pipetas, lo que puede ocasionar errores en las mediciones.

La dilución de la muestra es un factor crítico, dado que repercute sobre la medición. Este factor se minimiza al diluir la muestra en medios de alta fuerza iónica (solución fisiológica o medios mínimos sin fuente de carbono).

Las cámaras más utilizadas son las de Hawksley y la de Petroff-Hausser. Esta técnica, además de determinar el recuento microbiano, permite obtener información sobre el tamaño y la morfología de los objetos contados.

2.9.2 Objetivos

- Determinar la cinética de crecimiento de E. Coli, en caldo tripticasa de soya TSB.
- Representar la curva de crecimiento del microorganismo con la técnica de turbidimétrico.
- Calcular el tiempo de duplicación, el coeficiente de correlación y la ecuación de la recta de la fase exponencial.

2.9.3 Métodos

Cada grupo debe tener el siguiente material:

- ✓ Erlenmeyer de 100 mL con 45 mL de caldo TSB a una temperatura de 36°C.
- ✓ Tubo de ensayo con 5 mL de caldo TSB inoculado con E. coli (mantenido a 36°C) ajustado por la escala de Mac Farland.
- ✓ 8 tubos tapa rosca, estériles.
- ✓ 1 pipeta estéril de 10 mL.
- ✓ Pipeteadores automáticos.
- ✓ Cronómetro.

Para uso de todos los grupos se debe tener:

- ✓ Cámara cuenta células.
- ✓ Microscopio.
- ✓ Espectrofotómetro.
- ✓ 50 mL de TSB estéril para realizar los tubos blancos.

2.9.4 Procedimiento

Recuento por turbidimetría

- a) Primero, se ubica el filtro UV del equipo a 650 nm apreciadamente y se coloca en cero con el tubo blanco (caldo TSB estéril).
- 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. 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) Completar la siguiente tabla teniendo en cuenta los siguientes tiempos:

2.9.5 Procedimiento

- a) Se debe limpiar la cámara antes de su uso. Se coloca un cubreobjetos en la parte central de la cámara y se agrega una gota del cultivo bacteriano, evitando inundar la parte central.
- b) La cámara debe colocarse en el microscopio y se ubica la cuadrícula bajo los objetivos 10X, 40 X y 100X hasta obtener una imagen clara en el último objetivo.
- c) Finalmente seleccionamos 4 cuadrículas en la zona central de la cámara (de 25 cuadritos cada una) y realizamos el conteo de bacterias y apuntamos los resultados.
- d) Obtenemos la media de las mediciones y aplicamos una regla de tres simple teniendo en cuenta las siguientes indicaciones:

Si en 25 cuadros tenemos X bacteria, en 16 cuadros cuantas bacterias tendremos.

$$\text{Bacterias} = X \cdot 16/25$$

Dónde:

X: Media de las cuatro cuadrículas observadas bajo el microscopio.

Con este resultado de conteo se realiza los siguientes cálculos:

$$\text{Media de bacterias contadas} \cdot 25 \cdot 10 \cdot 10 = \text{bacterias/mL}$$

Dónde:

25 número de cuadritos

10 = factor de corrección de la cámara

10 = inverso de la dilución.

2.9.6 Interpretación

Con los datos, realice la curva de crecimiento para los dos métodos, 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) y otros parámetros de crecimiento microbiano

Encontrar 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 prácticas de limpieza y desinfección para plantas y equipos utilizados en la industria láctea se basan en la NTC 5245 que fue ratificada por el Consejo Directivo del 2004-02-25. Esta norma tiene grado de correspondencia modificada (MOD) con respecto a su documento de referencia *British Standard Code of Practice for Cleaning and Disinfecting of Plant and Equipment Used in the Dairying Industry*, BS 5305:1984.

En cuanto sea posible, los equipos se deben diseñar para facilitar la limpieza y desinfección y todos los cuidados posibles deben cumplirse, para mantenerlos en buenas condiciones.

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 (Mossel, 2010). A este respecto, Anaya *et al.* (2016) 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 estarán protegidos del contacto con los desinfectantes químicos y también, en alguna medida, de los efectos del calor.
- b) La fuerza de cualquier solución química desinfectante, y en consecuencia su eficacia, se pueden ver reducidas por cantidades excesivas de suciedad.
- c) La desinfección por calor hará que la suciedad residual sea más resistente a los procesos de limpieza posteriores.
- d) Los microorganismos que sobrevivan, ya sea al calor o a los agentes químicos, se pueden multiplicar en residuos húmedos de suciedad, y si transcurre suficiente tiempo antes de su uso, el equipo se puede contaminar suficientemente.

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

En la industria de productos lácteos, los agentes químicos pueden ser agentes desinfectantes solos o combinados detergente - desinfectante. Es esencial que ambos tipos sean aprobados si se usan para desinfectar equipos para manipulación de leche y de crema. Esta restricción no se aplica a equipos usados para productos lácteos y helados de crema, aunque se usen normalmente agentes químicos aprobados (Cáseres, 2012). El hidróxido de sodio y el formaldehído o formalina se pueden

usar para propósitos especiales. La eficacia de todos los agentes de desinfección aprobados está influenciada por la concentración, el tiempo de contacto, la temperatura, la materia orgánica (suciedad), pH, dureza del agua, combinación con detergentes y tipos de microorganismos. Todos los agentes químicos desinfectantes carecen de fuerza de penetración, y los microorganismos en piedra de leche y en las grietas pueden sobrevivir al tratamiento. La presencia de películas de suciedad menos resistentes, por ejemplo, residuos de leche secados al ambiente, también puede impedir el contacto inmediato de los agentes químicos con los microorganismos. Sin embargo, la combinación del agente desinfectante con detergentes compatibles para facilitar la remoción de suciedad permite realizar la limpieza y la desinfección en una sola operación.

Los agentes químicos desinfectantes no son eficaces contra las esporas bacterianas y no se debería confiar en que eliminen las esporas de mohos.

Cloro

Las soluciones de hipoclorito de sodio y las marcas de fosfatos trisódicos clorados se pueden usar como agentes desinfectantes por sí solos; el hipoclorito se puede adicionar a soluciones de detergentes adecuados para obtener soluciones con doble propósito. Los agentes químicos orgánicos que liberan cloro, por ejemplo el diclorodimetilhidantoína y el dicloroisocianurato de sodio, son más comúnmente formulados con detergentes y se comercializan en polvo. Una solución de hipoclorito de sodio aprobada dentro de su vida útil en estantería no debería contener menos del 8% (m/m), ni más del 12% (m/m) de cloro disponible. Para propósitos prácticos, esto se puede considerar como el 10% (m/m) de cloro disponible, de manera que la dilución de una parte de un hipoclorito aprobado en 1000 partes de agua dé una solución que contenga aproximadamente 100 mg/L de cloro disponible. El cloro disponible del hipoclorito y otros agentes químicos que liberan cloro reacciona rápidamente con la materia orgánica, como por ejemplo los residuos lácteos, y se inactiva por ésta, pero en las condiciones de uso normal el volumen de solución y su concentración son tales que la cantidad de suciedad presente en el equipo no afecta considerablemente la eficiencia de la solución 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.

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.

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 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

- ✓ 1 tubo de ensayo con 10 mL de caldo nutritivo.
- ✓ 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%.
- ✓ 1 tubo de ensayo con 10 mL de hipoclorito de sodio al 0.75%.

- ✓ 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 20 mL de caldo nutritivo inoculado con bacterias patógenas (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp.)

2.10.4 Procedimiento

- a) Se preparan diferentes soluciones de hipoclorito de sodio con las siguientes concentraciones: 6%, 3%, 1.5% y 0.75%. Posteriormente, se utilizan cuatro (4) tubos de ensayo con caldo nutritivo y se añade a cada uno de ellos 1 mL de cada una de las concentraciones preparadas, por ejemplo, a un tubo con caldo nutritivo se le agrega 1 mL de hipoclorito de sodio al 6% y se agita. Enseguida, se agrega 1 mL de cultivo de bacterias patógenas que tenga a disposición, y de igual manera se agita. Este procedimiento se debe realizar por duplicado.
- b) **Nota importante:** Utilizar el mismo cultivo de bacterias para todas las concentraciones de hipoclorito de sodio.
- c) En el tubo testigo (sin hipoclorito de sodio), se inocula 1 mL de caldo nutritivo, se agrega 1 mL de cultivo de bacterias patógenas que tenga a disposición, y de igual manera se agita. Se realiza por duplicado.
- d) Posteriormente, de cada tubo inoculado y después de tres minutos, tomar con una pipeta estéril 1 mL del cultivo (caldo nutritivo + hipoclorito de sodio + cultivo de bacteria patógena) y verterlo en una caja de Petri estéril mediante la técnica de siembra en profundidad, usando el Plate Count Agar a 45°C. Repetir el mismo procedimiento para el testigo.
- e) Repetir el mismo procedimiento anterior a los 15 y 30 minutos.
- f) Incubar a 37°C /24-48 horas. Realizar el conteo de las colonias que crecieron en el medio de cultivo teniendo en cuenta la concentración y el tiempo de siembra.

- g) Finalmente, compare los tubos con las diferentes concentraciones con el testigo (sin hipoclorito de sodio).

2.11 ANTIBIOGRAMA POR EL MÉTODO DE KIRBY-BAUER

2.11.1 Introducción

Un antibiótico ha sido definido como una sustancia química producida por un microorganismo capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. Los antibióticos modificados por manipulaciones químicas aún se consideran como tales. Un agente antimicrobiano es activo contra los microorganismos y puede ser producido en forma natural por microorganismos o sintéticamente en el laboratorio. El término agente quimioterápico ha sido empleado para referirse a agentes antimicrobianos sintéticos o no y también se refiere a agentes que actúan contra células humanas como inmunomoduladores y drogas antitumorales. Los términos agente antiviral y agente antimicótico son términos más específicos, incluidos dentro de la categoría más general de agentes antimicrobianos (Yan *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, una vez realizado, da la siguiente información:

- Grado de sensibilidad de la colonia bacteriana a un determinado antibiótico.
- Diferencia de sensibilidad por parte de la colonia a diferentes antibióticos.

Con esta información, se clasifica el efecto del antibiótico sobre esa determinada colonia en: Resistente (R), Intermedio (I) y Sensible (S).

2.11.2 Objetivos

- Evaluar mediante la prueba de susceptibilidad antimicrobiana la sensibilidad de una cepa bacteriana que se sospecha es la responsable de una infección a uno o varios antibióticos.

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

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar “*in vitro*” la susceptibilidad de bacterias ante agentes antimicrobianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, la prueba de difusión en agar es usada en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias fastidiosas patógenas.

- 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 la muestra.
- El Agar Müeller Hinton debe ser preparado como mínimo con un día de antelación para un mejor secado de las placas.
- Al menos 3 a 5 colonias bien aisladas y del mismo tipo de morfología se seleccionan de un agar de cultivo. Se toca la colonia por arriba con un asa y el crecimiento se transfiere a un tubo con 4 a 5 mL de un medio de cultivo adecuado, tal como caldo Müeller-Hinton.
- El caldo de cultivo es incubado a 36°C hasta que alcance la turbidez del estándar de 0.5 McFarland (usualmente 2 a 6 horas). Esto resulta en una suspensión que contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UCF/mL.

- La turbidez del caldo se ajusta con solución salina estéril o con caldo para obtener una turbidez ópticamente comparable a un estándar de 0,5 McFarland.
- En un lapso de tiempo óptimo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, un aplicador de algodón se sumerge en ella. El aplicador debe ser rotado varias veces y presionado firmemente contra la pared interna del tubo sobre el nivel de líquido. Esto remueve el exceso de inóculo.
- Se inocula la superficie de una placa de Agar Mueller-Hinton extendiendo el aplicador de un extremo a otro sobre toda la superficie. Este procedimiento es repetido dos o más veces, rotando la placa aproximadamente 60°C después de cada aplicación para asegurar una distribución constante del inóculo. Como paso final se pasa sobre los bordes del Agar.
- La tapas de la placa pueden quedar entreabiertas por 3 a 5 minutos, pero no más de 15, para permitir que un exceso de humedad de la superficie se absorba antes de aplicar el disco con la droga impregnada.
- Se debe evitar excesos en la densidad del inóculo. Nunca usar caldos de cultivo de la noche anterior sin diluir u otro inóculo no estandarizado.
- Los discos se dispensan sobre la superficie del agar. Cada disco debe ser presionado para asegurar contacto pleno con la superficie del agar. Ya sea que el disco se ponga individualmente o con un dispensador, deben ser distribuidos en forma constante y no debe quedar a menos de 24 mm de distancia entre centros. No más de 12 discos se deben poner por placa de 150 mm o no más de 5 en placas de 100 mm. Debido a que algunas drogas difunden casi instantáneamente, un disco no debe ser relocalizado una vez que haya tomado contacto con la superficie del agar.
- Las placas son invertidas y puestas en un incubador a 36°C en el lapso de 15 minutos después de aplicados los discos. Las placas no se deben incubar en un ambiente de CO₂ porque los estándares de interpretación fueron desarrollados usando aire ambiente y el

CO₂ alterará significativamente el tamaño de las zonas de inhibición de algunos agentes.

- Los discos utilizados en este procedimiento estarán directamente relacionados con el tipo de bacteria a la cual se le esté midiendo la sensibilidad, es decir, si se trata de bacterias Gram negativas o Gram positivas, de la localización de la infección, de la procedencia. Además se seleccionarán los antibióticos que representen a cada uno de los grupos de antimicrobianos que se utilizan en la actividad asistencial.
- Después de 16 a 18 horas de incubación, cada placa es examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento. Si aparecen colonias individuales, el inóculo estaba muy diluido y la prueba debe ser repetida. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en mm pasando por el centro del disco. La caja de Petri se mantiene a una distancia de pocos centímetros sobre un fondo negro no reflectante y se ilumina con luz reflejada.

Figura 18. Kirby Bauer.



Fuente: los autores

- El margen de las zonas debe ser tomado como el área donde no se observa crecimiento visible. Un crecimiento pobre de pequeñas colonias, las que se detectan con lente de aumento al borde de la zona de crecimiento inhibido, son ignoradas. Sin embargo, colonias discretas creciendo dentro de la zona clara de inhibición deben ser identificadas y probadas nuevamente. Con *Proteus* sp., el delgado velo de población en una obvia zona de inhibición debe ser ignorado. Con trimetoprim y las sulfonamidas, pueden aparecer zonas de crecimiento leve; por lo tanto, no se considera y se mide los márgenes más obvios para determinar el diámetro de la zona. Cuando se usa medio suplementado con sangre para probar *Streptococcus* sp., se debe ser cuidadoso en medir la zona de inhibición y no la de hemólisis.
- Los tamaños de las zonas de inhibición son interpretados en las Tablas del National Committee for Clinical Laboratory Standards o NCLI por sus siglas en inglés, para ser informado como susceptible, intermedio, o resistente a los antimicrobianos que se han probado. Estas tablas se actualizan de manera periódica.

2.11.5 Interpretación

- ✓ **Sensible:** La categoría “sensible” implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.
- ✓ **Intermedio:** La categoría “Intermedio” incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con una concentración mínima inhibitoria (CMI) que se aproxime usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría “Intermedia” implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada; ejemplo, quinolonas y β -lactámicos en orina; o cuando una dosis mayor que lo normal de una droga puede ser usada; ejemplo: β -lactámicos.
- ✓ **Resistente:** Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CMI

que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.

❖ 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 por el fondo de la placa y se anotaran los resultados, los cuales serán comparados con las tablas correspondientes. Se interpretará como sensible, resistente o intermedio. El borde de la zona de inhibición se aprecia a simple vista y es en general netamente delimitado. Sin embargo hay 3 excepciones:

- ✓ En el caso de las sulfamidas y el clotrimoxazol, pequeñas colonias pueden aparecer en el interior de la zona de inhibición, las mismas no deben ser tomadas en cuenta.
- ✓ Cuando se estudia sensibilidad a la penicilina de los *Staphylococcus* productores de penicilinas se observa en la zona de inhibición un borde que indica dilatación marcada. Éstas se reconocen con facilidad cuando se comparan con las cepas testigos, cualquiera que sea el tamaño debe ser considerada como reveladora de resistencia.
- ✓ Ciertas cepas de *Proteus* pueden dispersarse en el interior de las zonas de inhibición lo cual no debe ser tomado en cuenta.

Tabla 2. Halos de inhibición por la prueba de difusión en disco

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 son un grupo de organismos con características particulares, las cuales permiten ubicarlos en un reino separado, EL REINO FUNGÍ. Actualmente este reino está constituido 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 constituyentes son: celulosa, glucano y quitina.

Morfológicamente las formas más sencillas poseen un solo núcleo (levaduras) y las más complejas forman filamentos multinucleados y se denominan hongos filamentosos. Estos filamentos son llamados hifas y son la unidad constituyente de su cuerpo vegetativo, la cual crece únicamente por su ápice y se ramifica periódicamente dando como resultado una de hifas denominada micelio. Los hongos presentan diversas características nutritivas: parásitos, simbióticos o heterótrofos. Los hongos requieren materiales orgánicos preformados, que utilizan como fuente de energía, además de utilizar las estructuras carbonadas para la síntesis celular.

Algunas características morfológicas como el color y hábito de crecimiento se ven por el medio de cultivo utilizado. La mayoría de las descripciones existentes se ven en las observaciones obtenidas sobre Agar Papa Dextrosa o Agar Sabouraud. Microscópicamente los hongos se pueden caracterizar de acuerdo a su organización celular y estructuras presentes. Macroscópicamente se puede caracterizar un hongo de acuerdo a la topografía y color presentes en el verso y anverso de la colonia en un medio que define como la altura del micelio y puede ser: algodonosa o aérea, granular o polvosa, afelpada y glabra.

- **Textura algodonosa:** Se caracteriza por un micelio aéreo, denso y muy alto, con aspecto de algodón.
- **Textura granular y/o polvosa:** Se caracteriza por la facilidad con que se desmenuza y la excesiva producción de conidias. Con frecuencia estos dos términos se intercambian, sin embargo la textura

granular es más rugosa semejante al azúcar granulado, mientras que polvosa parece harina o polvo.

- **Textura afelpada:** Se caracteriza por presentar un micelio aéreo bajo, con aspecto de felpa o terciopelo.
- **Textura glabra o cerosa:** No producen micelio aéreo, por lo tanto, tiene una superficie pareja. Generalmente se presentan en las colonias de levaduras.

La topografía describe las desigualdades presentes en la superficie de la colonia, se observa generalmente por el anverso de la caja, debido a que usualmente el micelio enmascara esta característica. Se describe como verrugosa o cerebriforme, rugosa y lisa.

- a) **Topografía rugosa:** tiene pliegues irregulares que irradian el centro de cultivo.
- b) **Topografía verrugosa o cerebriforme:** Posee una superficie delgada que semeja un cerebro.
- c) **Topografía lisa:** No posee irregularidades en su superficie.

El examen microscópico permite la identificación definitiva del hongo. En la observación se debe tener en cuenta el tipo de hifa (septada, aseptada, hialina, pigmentada), forma de la estructura reproductiva en estado anamórfico o telemórfico. En estado anamórfico se observa eonidióforo, tipo de conidias, color, tamaño, forma. En la fase telemórfica se observan esporas, las cuales presentan forma, tamaño, color ornamentación que definen el género y/o la especie del hongo.

2.12.2 Objetivos

- ✓ Reconocer las diferentes estructuras o cuerpos reproductivos de algunos hongos.
- ✓ Conocer el protocolo general para la observación e identificación de hongos.
- ✓ Aislar, sembrar y observar hongos presentes en diversas muestras.
- ✓ Realizar la coloración de lactofenol para la identificación de 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.

2.12.4 Metodología

Descripción e identificación de caracteres macroscópicos de hongos.

Tome las diferentes cajas de cultivo y describa la textura, topografía y color presente en el anverso y reverso de cada colonia. Registre estas características en el cuadro que se suministra.

2.12.4.1 Preparación del microcultivo

1. Preparación de reactivos y medio de cultivo.
 - a) Solución glicerinada al 5% (5 mL de glicerina en 100 mL de agua)
 - b) Agar Sabouraud: Preparar medio siguiendo las indicaciones del reactivo.
2. Preparar 6 cajas Petri (por equipo) de la siguiente forma: Colocar una varilla de vidrio en forma de "U" dentro de la caja encima de esta un portaobjetos y 2 cubreobjetos, cerrar la caja.
3. Colocar las cajas Petri preparadas de acuerdo al punto anterior en un autoclave para esterilizar las cajas Petri.

4. Esterilizar el medio de cultivo, agua glicerizada, bisturí y pinzas envueltas en papel y las cajas Petri y pipetas en el autoclave a 15 lb/plg², durante 15 minutos.
6. En condiciones asépticas vaciar el agar a 2 cajas petri (por equipo) calcular aproximadamente 20 mL por caja.

2.12.5 Procedimiento para Microcultivo de Hongos

1. Bajo condiciones estériles y con ayuda de un bisturí cortar cuadros pequeños de agar aproximadamente de 1 cm x 1 cm.
2. Utilizando las pinzas de disección colocar en cada una de las cajas Petri un cuadro de agar sobre el portaobjetos.
3. Con el asa estéril inocular hongos por picadura en cada uno de los 4 lados del cuadro de agar (muestra y aquellos proporcionados por el profesor). Colocar con la ayuda de las pinzas de disección estériles el cubreobjetos encima del agar.
4. Adicionar agua glicerizada estéril a cada una de las cajas petri hasta cubrir dos terceras partes de la varilla de vidrio. Tapar las cajas.
5. Incubar las cajas a 30°C a temperatura ambiente durante un periodo de 3 a 7 días. Verificar que las cajas conserven un nivel adecuado de agua glicerizada.

Cultivo de hongos

El agar Sabouraud, por ejemplo, es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el medio estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación.

La siembra se realiza con el fin de aislar o repicar los hongos para su uso inmediato o para mantenerlos viables por un tiempo corto. La siembra o aislamiento en cultivo puro consiste en dejar crecer el hongo elegido bajo condiciones en las que pueda desarrollar y esporular convenientemente.

Para ello es necesario verter el medio de cultivo, dejarlo enfriar, acidificarlo -si fuera necesario- y colocar una pizca del hongo a sembrar. Se realiza por medio de una aguja o de un asa, ya sea por un simple toque o por rayado continuo. Generalmente para la siembra se usan placas, tubos y frascos. Después de la siembra se sellan las placas, tubos y frascos, se coloca la fecha y se incuba durante el tiempo conveniente hasta que se vea que el hongo ha crecido y esté esporulando. Las levaduras se inocularán por estría cruzada sobre la superficie de las cajas de Petri con agar Saboraud, en forma similar a la inoculación de las bacterias.

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

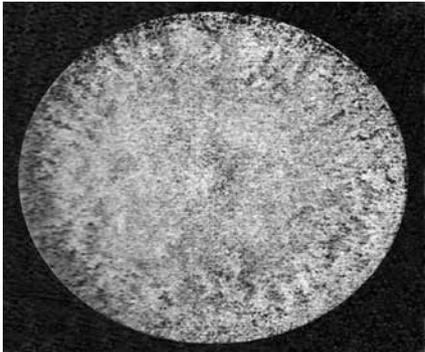
- a. Coloque una gota de azul de lactofenol en el centro del portaobjetos.
- b. Tome aproximadamente 8 cm de cinta adhesiva transparente entre los dedos pulgar e índice, con el adhesivo hacia fuera.
- c. Presione suavemente el lado adhesivo de la cinta sobre la superficie de una caja con crecimiento 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

- Coloque una gota de azul de algodón con lactofenol en el extremo de un porta objetos.
- Tome con el asa de punta recta estéril una porción de micelio de la parte más externa. Lleve la muestra sobre la gota azul de lactofenol. Coloque el cubre objetos y observe al microscopio.

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

Textura algodonosa



Fuente: Bernal et al. (2008).

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.

Objetivos

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

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 (Rodríguez, Gamboa y Vargas, 2002).

Materiales y equipos

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

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 basa en la enzima catalasa, que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias. Esta tiene la capacidad de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de

burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva (Arce y Asalde, 2012).

Materiales

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

Procedimiento

1. Se toma una asada del microorganismo y se lleva a un portaobjetos.
2. Se agrega 1 o 2 gotas de peróxido de hidrógeno.
3. Si se observa burbujas, la prueba es positiva, por ejemplo, para *Staphylococcus* sp. y negativa para *Streptococcus* sp.

3.1.1.2 Prueba de coagulasa

Se realiza sobre los cocos Gram positivos, catalasa positivos, y de esta manera se distingue las cepas de *Staphylococcus aureus* de otros *Staphylococcus*.

Materiales

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

Procedimiento

1. Se toma 5 mL de plasma de conejo.
2. Al cual se añade 5 mL del cultivo puro.
3. Se lleva a incubación a 37°C de 4 a 24 h.
4. Si luego de la incubación se observa la formación de coágulos, se define como positiva a *S. aureus*, de lo contrario (no coágulos) se considera como *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 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. Agua peptonada.

Materiales y equipos

- Erlenmeyer de 1000 mL
- Mezclador

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} .
3. Como recomendación deben realizarse los procedimientos en un tiempo menor a 20 minutos.
4. 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}
5. 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} .
6. A partir de las anteriores diluciones se harán los análisis microbiológicos respectivos.

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. A 9 tubos de ensayo se adiciona 9 mL de caldo verde bilis brillante y dentro de cada tubo se introducen un tubo Durham invertido.
2. Se pipetea 1 mL de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}). El proceso se realiza por triplicado, lo que indica 3 muestras por dilución.
3. Los tubos se llevan a incubación por 48 horas a 37°C .
4. Luego de la incubación se observa la producción de gas dentro de los tubos Durham, lo que es un indicativo de muestra positiva a coliformes totales.

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

Materiales

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

Reactivos

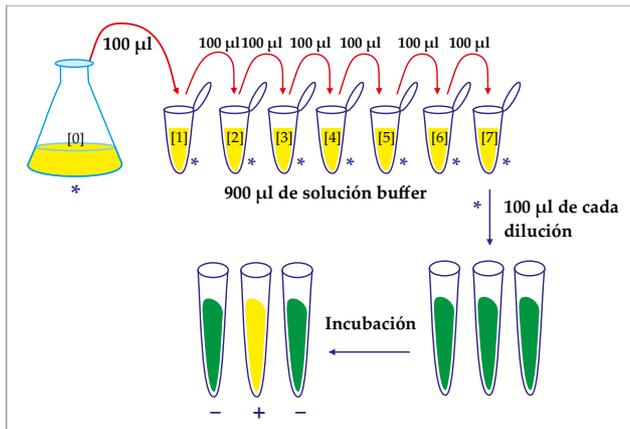
- Caldo verde bilis brillante
- Caldo triptona.
- Reactivo de Kovac's

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 a 44.5°C por 24 horas en baño maría para el caldo verde bilis brillante y a 37°C para el caldo triptona.
3. Pasado el tiempo se determina los tubos con producción de gas.

4. Anotar los tubos que muestren producción de gas y revelar el caldo triptona con el reactivo de Kovac's, agitar suavemente y observar la presencia de un anillo rojo en la superficie cuando el tubo es positivo; cuando el tubo es negativo no se observa cambio.
5. Otro procedimiento más rápido para determinar Coliformes totales y fecales conjuntamente es utilizar el medio lauryl sulfato más MUG.
6. De igual manera, existen comercialmente pruebas para una detección rápida de Coliformes totales y fecales como lo son las placas Peel Plate o Petrifilm® en las cuales si hay presencia de colonias de color rojo es indicativo para Coliformes totales y si hay presencia de colonias de color azul o púrpura es indicativo para *Escherichia coli*.

Figura 19. Prueba presuntiva para coliformes totales.



Fuente: Magallanes *et al.*, 2016

Interpretación

Se lee en la tabla del NMP (Número Más Probable) para saber el resultado de acuerdo con el número de tubos positivos, tanto para los coliformes totales, según el resultado de la prueba confirmativa y para los coliformes fecales, según el caldo brilla y el caldo triptona incubados a 44.5°C (ver Tabla 3).

- La lectura se da con respecto al NMP en la tabla. Para determinar el NMP de microorganismos por g o mL se tiene en cuenta 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).

- 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).
- Incubar las cajas invertidas a 37°C por 24-48 horas.
- Pasado este tiempo se hacen las lecturas de las colonias típicas de coliformes, aquellas que presentan un brillo verde metálico.
- 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 3. 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

Fuente: 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 por duplicado alícuotas de 1 mL de cada una de las diluciones 10^{-1} a 10^{-3} en cajas de Petri vacías estériles y previamente marcadas.
2. Inmediatamente verter en las cajas agar cuenta gérmenes fundidos (Plate Count Agar) manteniendo a una temperatura de 45°C .
3. Posteriormente mezclar el inóculo con el medio fundido; la manera más indicada para hacer esta operación es moviendo suavemente la caja en forma circular en varios sentidos (en sentido de las manecillas del reloj, en sentido contrario a las mismas y finalmente de arriba y abajo hasta la solidificación del medio).
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

Esta es una familia de importancia para la industria alimentaria, ya que permite identificar el grado de contaminación de un producto. Dentro de este grupo está *E. coli*, uno de los microorganismos más evaluados debido a la patogenicidad de algunas cepas y que se pre-

senta en los alimentos, incluyendo los productos cárnicos. A continuación, se describe el procedimiento para identificar a esta familia de microorganismos (Jurado, 2018).

Prueba de TSI

Materiales

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

Procedimiento

1. Preparar el agar TSI de acuerdo con la casa comercial y se distribuye en tubos tapa rosca estériles de 16 x 10 mm. Se esteriliza en autoclave a 121°C por 15 minutos y posteriormente se inclina.
2. Se inocula con el asa recta una colonia del microorganismo en estudio y se punciona el medio por el centro hasta el fondo del tubo y se hace estrías en la superficie. Se incuba por 24 horas y se interpreta.

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 realiza un examen macroscópico del medio observando una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación que se interpreta como una prueba positiva de movilidad.

Descarboxilasas

Materiales

- Medio LIA Descarboxilasa de Mueller
- Cultivo a evaluar

Procedimiento

- a) Se prepara, según instrucciones de la casa comercial, se distribuye en tubos tapa rosca. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos y se inclina.
- b) El medio debe ser incubado con el cultivo de microorganismos y se hace doble punción y se estría la superficie para incubarse entre 18 a 24 horas a 37°C.
- c) La reacción positiva es descarboxilación K/K.

Ureasa

Materiales

Medio LIA Descarboxilasa de Mueller

Cultivo a evaluar

Procedimiento

- a) Se prepara, según instrucciones de la casa comercial, se agrega el indicador, se distribuye en tubos tapa rosca.
- b) Se esteriliza los tubos a 121°C por 15 minutos y se inclinan.
- c) Se inocula el medio con un asa del cultivo a investigar y se llevan a incubación por 18 a 24 horas a 37°C.

Movilidad

Materiales

– Medio SIM (H₂S - Indol - Motilidad)

- a) Se prepara el medio de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial y se inocula con el cultivo a investigar.
- b) Se lleva a incubación por 24 horas a 37°C.
- c) Se realiza un examen macroscópico del medio observando una zona de desarrollo difuso que parte de la línea de inoculación que se interpreta como una prueba positiva de movilidad.

Indol

Materiales

- Medio SIM
- Reactivo de Kovac's

Procedimiento

1. Se prepara el medio de acuerdo a la casa comercial.
2. Se inocula con el cultivo mediante asa recta.
3. Se incuba de 18 a 24 Horas a 37°C, transcurrido este período se añade 5 gotas de reactivo de Kovac's.
4. La aparición de un anillo rojo indica una prueba positiva para indol.

Producción de ácido sulfhídrico (H₂S).

Materiales

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

Procedimiento

1. Se prepara todos los medios de acuerdo con la casa comercial y se inoculan con los cultivos a evaluar.
2. Se incuban entre 18 y 24 horas a 37°C.
3. El no ennegrecimiento de los medios se interpreta como una producción de H₂S negativa.

Utilización de Citrato

Materiales

- Agar Citrato de Simmons
- Cultivo de microorganismos

Procedimiento

- a) Agar Citrato de Simmons, el cual se prepara según instrucciones de la casa comercial, se distribuye en tubos tapa rosca, se esteriliza a 121°C por 15 minutos y se inclinan.
- b) Se inocula el medio con el cultivo mediante asa recta y se incuba a 37°C por 24 Horas.

Rojo metilo

Materiales

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

Procedimiento

1. Se prepara según instrucciones de la casa comercial.
2. Se distribuye en tubos tapa rosca y se esteriliza a 121°C por 15 minutos.
3. Se inocula el caldo con los microorganismos en estudio y se incuba de 18 a 24 horas a 37°C.
4. Transcurrido el tiempo, se agrega 4 gotas del indicador rojo de metilo.
5. Al agregarle el indicador, el medio desarrolla un color rojo, lo que indica una prueba positiva para la Prueba de Rojo del Metilo.

Prueba de Rojo de Metilo Voges Proskauer (RMVP)

Materiales

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

Procedimiento

1. Se prepara el caldo de acuerdo con la casa comercial.

2. Se inocula con el microorganismo a estudiar, se incuba a 37°C de 18 a 24 horas.
3. Al finalizar el tiempo de incubación se transfiere 1 mL del caldo a un tubo estéril, se añade 0.6 mL de alfa Naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40% exponiéndolo al oxígeno atmosférico.
4. La prueba se considera negativa cuando no desarrolla un color rojo a los 15 minutos de agregado el reactivo.

Prueba de oxidasa. La prueba de la oxidasa se utiliza como una característica fenotípica en la identificación de cepas bacterianas aeróbicas o aeróbicas facultativas. Esta prueba determina si la bacteria produce citocromo oxidasa (y por lo tanto, utiliza oxígeno en la cadena de transporte 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 porción de la bacteria y se estría sobre el borde de la tira. Espere 60 segundos.
2. La prueba se considera positiva cuando muestra una coloración púrpura en la tira o negativa cuando no hay cambio de color.

3.1.4 Identificación de *Escherichia coli*

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018) 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 abre la etiqueta superior.
2. Se macera 10 g de muestra y se depositan en un beaker con 10 mL de agua destilada.
3. Pipetee 1 mL de muestra.
4. Se sella con la etiqueta.
5. Se lleva a incubación por 35°C por 40 horas.
6. Se realiza el conteo de colonias de la siguiente manera: Puntos rojos muestran Coliformes, y azul, púrpura o negro muestra *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 (Prieto *et al.*, 2018). En los últimos años ha tomado mayor importancia este microorganismo por los problemas de salud pública. Uno de los procedimientos que puede utilizarse en su identificación se basa en la metodología propuesta por Agrolechero S.A. (2018).

Materiales

- Prueba Peel Plate®.

Procedimiento

1. Se toma 5 g de carne, se macera y mezcla con 5 mL de agua destilada. Del preparado se toma 1 mL y se deposita en la prueba de platos (Peel Plate).
2. La prueba se lleva a incubar por 24 h a 38°C.

3. La evaluación se realiza determinando la presencia de colonias en el medio de cultivo (color violeta con un centro blanco), lo que indica un resultado positivo.

Esta prueba se desarrolla mediante la prueba de Peel Plate®, la cual se basa en el agar selectivo de Baird Parker y sustratos de enzimas colorimétricas múltiples para apoyar el crecimiento e identificar colorimétricamente el crecimiento 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.

Materiales y Equipos

- Agua peptona bufferada (BPW)
- Caldo Rappaport – Vassiliadis con soja (caldo RVS)
- Caldo Müller – Kauffmann tetracionato + novobiocina (MKTTn)
- Agar xilosa lisina desoxicolato (XLD)
- Segundo medio sólido selectivo. 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.
- Peachímetro 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 140mm 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 durante 24 h. Transferir 1 mL del cultivo a un tubo con 10 mL de caldo MKTTn e incubar 37°C durante 24 h.

2. **Aislamiento e identificación.**

- a) Tomar una asada de los cultivos anteriores (RVS) y MKTTn, y estriar en placa de agar XLD.
- b) Utilizar placas de Petri grandes o 2 del menor tamaño usando la misma asada. Incubar las placas de XLD a 37°C durante 24 h y el segundo agar selectivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- c) Examinar las placas después de la incubación para la determinación la presencia de colonias típicas de *Salmonella* y colonias atípicas que podrían ser *Salmonella*.

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

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, Gamboa y Vargas, 2002). 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 o curvas de calibración

Control Positivo. Se siembra la cepa *Clostridium perfringens* ATCC 13124 en Agar Plate Count, luego se toma una asa (esteril) y mediante punción se inocula un tubo con Agar SPS (Agar Sulfito - Polimixina

- Sulfadiazina), luego, se incuba en cámara de anaerobiosis a 35°C +/- 1°C por 24, 48 y 72 horas.

Control Negativo. El procedimiento es similar al observado anteriormente, con la diferencia en la cepa a sembrar, que para el control negativo es *E. coli* ATCC 25922.

Preparación de la muestra

1. Realizar diluciones seriadas hasta 10⁻² bajo cabina de flujo laminar.
2. Se pipetea 1mL de cada una de las diluciones en tubos estériles. Luego se coloca los tubos en baño de María a 80°C durante 10 min. Se sacan y se dejan enfriar rápidamente en agua corriente
3. Se vierte 9 mL del Agar SPS en los tubos mediante siembra en profundidad. Se agita y se deja solidificar.
4. Se adiciona una segunda capa de medio y se deja solidificar.
5. Colocar los tubos en cámara de anaerobiosis y se incuban a 35°C ±1 durante 72 horas.

Lectura

- a) Se recomienda observar los tubos a las 24, 48 y 72 horas debido a que los microorganismos pueden producir a las 24 horas H₂S (Ácido sulfhídrico), tornando el medio de cultivo de color negro, impidiendo 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 et al. 2018).

Materiales

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

Procedimiento

Preparación del medio

1. Se prepara el medio de cultivo de listeria tomando 53 g de medio para *Listeria* y 1 g de suplemento para *Listeria* y se disuelven en 1 L de agua esterilizada a una temperatura de 30°C (este medio se puede utilizar hasta 5 horas después de su preparación y en refrigeración hasta 24 horas)
2. Se toman 25 g de muestra en bolsa Stomacher y se adiciona 225 mL del medio preparado a una temperatura de 30°C, se agita durante 30 segundos y se lleva a incubación por 40h a 30°C.
3. Los medios pueden autoclavarse para que tengan una duración de 2 semanas bajo refrigeración.

Enriquecimiento de la muestra

1. Se pesan 25 g de muestra en una bolsa stomacher
2. Se adicionan 225 mL de medio previamente calentado a 30°C.
3. Se agita el stomacher por 30 s.
4. Se realiza una incubación por 40 horas a 30°C.
5. Se realiza el montaje de la tirilla y se realiza la lectura.
6. Si se observa doble línea en la tirilla, se tendrá 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 (Gérvás, 2000).

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.

Materiales y equipos

- 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 a calentar antes de colocar la muestra.
5. El lector debe estar previamente caliente a una temperatura de 64°C, que se debe verificar con un termómetro externo.
6. Se deja el test en el lector por un periodo de 2 horas y media.
7. La prueba está lista cuando el hisopo ha cambiado 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.

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 (Sanchez *et al.*, 2015). 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 capturará todos los receptores, que no han interactuado con ningún antibiótico durante la primera incubación (Merck, 2000).

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

Materiales

- Equipo Rosa incubators

Procedimiento

1. Saca el kit del frigorífico.
2. Sacar un vial individual con el receptor y golpear suavemente el fondo del vial contra una superficie dura, para que caiga el material del interior hacia la parte inferior.
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.

Después de 3 minutos de incubación, se abre el envase blanco, se toma una tira de lectura y se la coloca en el interior del vial. Las flechas de la tira deben dirigirse hacia la parte inferior del vial en incubación. Continuar la incubación a 47.5°C. Cerrar el envase blanco.

Después de una incubación adicional durante 2 minutos, sacar la tira del vial y realizar la lectura inmediatamente. La tira puede ser guardada.

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**.

Figura 20. Determinación de antibióticos en leche.



Fuente: los autores

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 rápido obtención de resultados. 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.

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 21. Prueba para recuento de células somáticas.



Fuente: los autores

3.4 DETERMINACIÓN DE VOMITOXINAS

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 especialmente susceptibles a la vomitoxina y es muy común que rechacen consumir alimentos altamente contaminados. La vomitoxina afecta también a los vacunos, aves, perros, gatos y humanos.

Procedimiento

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 tapa-rosca 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 - μL -) 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 - μL -) del contenido total en el tubo eppendorf.
11. Se depositan estos 0.3 mL (300 microlitros - μL -) 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).

3.5 RECUESTO 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 por duplicado alícuotas de 1 mL de cada una de las diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) en cajas de Petri estériles previamente marcadas.
3. Inmediatamente verter el agar Saboraud fundido y mantenido a 45°C , mezclar suavemente.
4. Dejar solidificar
5. Invertir e incubar a temperatura ambiente durante 5 a 8 días
6. Se procede de aquí en adelante igual que en el recuento de mesófilas.

3.5.1 Prueba de la reducción de colorantes (azul de metileno)

Los test de reducción de colorantes se han utilizado durante muchos años como indicadores de la calidad microbiológica de la leche y otros productos alimenticios. Está basado en la medición de la actividad metabólica de las bacterias, ya que muchas de ellas poseen las enzimas deshidrogenasas, las cuales transfieren hidrógeno de un sustrato a un aceptor biológico reduciéndolo (Vásquez *et al.*, 2011). Se debe aclarar que se ha dejado de usar por problemas en la exactitud del método.

Materiales

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

Reactivos

- Azul de metilino

Procedimientos

1. Añadir 1 mL de la solución de azul de metileno en un tubo estéril.

2. Se vierte 10 mL de la leche en el tubo que contiene el azul de metileno sin mezclar. Rotular.
3. Durante la preparación de las diferentes muestras, los tubos pueden permanecer en un baño de agua fría (0-5°C), pero nunca por más de dos horas.
4. Los tubos ya preparados se llevan a baño maría (36°C) junto con un tubo testigo (leche sin indicador). Cuando la temperatura de la muestra alcance los 36°C ± 1°C, mezclar los tubos invirtiéndolos lentamente, dos a tres veces para mezclar el contenido.
5. El nivel del agua debe ser más alto que el de la leche, se cubren los tubos con la tapa para evitar luz. Revise los tubos cada 30 minutos con el fin de observar el cambio de color (si se presentará).
6. En el tubo testigo se vierte 10 mL de leche y 1 mL de agua corriente, se lleva a un recipiente con agua hirviendo durante 3 minutos, posteriormente se coloca en el baño con los otros tubos a 37°C. El tubo testigo ayudará a precisar cuando 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 tabla 4.

Tabla 4. 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

3.5.2 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 (Vásquez *et al.*, 2011).

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 es de la siguiente manera.

Tabla 5. Interpretación de los resultados de la prueba de la resazurina.

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

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 Jurado Gámez *et al.* (2013).

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.

Cuando hay un exagerado crecimiento, que impide un correcto conteo de las bacterias, según Crueger y Crueger (1993) hacen un ajuste en porcentaje de 10% v/v, para iniciar la fermentación. Después de este tiempo se calculará el número de bacterias por mL. Del caldo MRS comercial se toma 1 mL y se vierte en 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 a Guerrero et al. (2002) y Montes et al. (2003).

M_1 = población o densidad celular que se debe ajustar

M_2 = 0,125 densidad óptica equivalente a $1,50 \times 10^8$ UFC/mL. Densidad utilizada primera fermentación.

V_1 = 1 mL volumen proveniente del inóculo total (10/90)

X_1 = cantidad que contiene M_2

V_2 = lo que se agrega a 1 mL para ajustar a $1,50 \times 10^8$ UFC/mL

V_3 = 100 mL cantidad total del inóculo

X_2 = cantidad de caldo MRS comercial estéril que se agrega a V_3 para ajustar la población el valor de M_2

Se encuentra entonces X_1 ;

$$M_1 \rightarrow M_2$$

$$M_2 \rightarrow M_1$$

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

Se encuentra entonces V_2 :

$$V_2 = V_1 - X_1$$

Finalmente se obtiene el valor de X_2 :

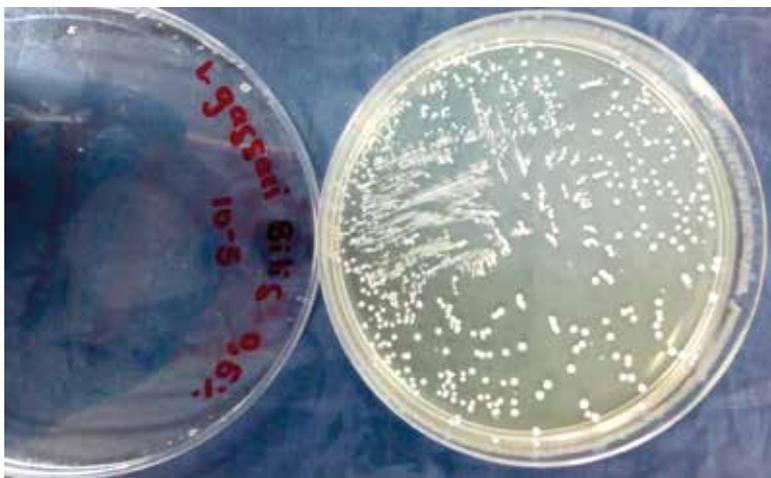
$$V_1 \rightarrow V_2$$

$$V_3 \rightarrow V_2$$

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

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

Figura 22. Reconstitución de la cepa láctica.



Fuente: los autores

4.2 CINÉTICAS DE FERMENTACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS

4.2.1 Conteo de microorganismos viables en placa UFC/ μ L.

La técnica de conteo en placa propicia la información del número de células viables durante el proceso en términos de UFC/ μ L, permitiendo determinar la evolución de la producción de biomasa. Para

los conteos se diluye 1 mL de muestra en 9 mL de agua peptonada al 0,1% y se realiza diluciones decimales; de cada dilución se transfiere 0,1 mL (100 μ L), de la cepa a cajas Petri con medio MRS que contiene azul de anilina para siembra en superficie. Las cajas se llevan a incubación a 32°C y se observan entre las 24 y 48 horas. Se considera las cajas de Petri con 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 evolución del pH se verificará mediante la medición con un potenciómetro.

4.2.3 Determinación de proteínas

Método de Lowry modificado (Lowry, 1990, Jurado-Gómez et al. 2012). Las proteínas reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu para dar un complejo color azul, (debido a la reacción del cobre alcalino con la proteína). La intensidad del color depende del número de aminoácidos presentes y enlaces peptídicos y cambiará según la clase de proteína; la solución azul muestra una absorbancia máxima a 750 nm. Rango de linealidad entre 0-300 mg/L. Se ajustará 1 mL de patrones de la curva estándar y se realizará muestras por duplicado. Posteriormente se adicionará 0.5 mL de NaOH 2N a todos los tubos, colocándose luego en baño maría a temperatura de ebullición durante 10 minutos, se deben dejar reposar en baño de agua fría, y luego agregar 0.5 mL de H₂SO₄ 2.6 N. Luego de que se agrega 0.9 mL de solución A, se debe llevar por 10 minutos a baño maría a 50°C, y se deja reposar en baño de agua fría. Posteriormente se añadirá 0.1 mL de solución B, se colocará por 10 minutos en la oscuridad, en el instante se debe preparar la solución C y consecutivamente adicionar 3 mL.

Se prepararán las soluciones de la siguiente manera:

- **Solución A:** Se debe diluir 0.5 g de tartrato de sodio potasio, 25 g de carbonato de sodio, 125 mL de hidróxido de sodio 1 N en 125 mL de agua destilada.

- **Solución B:** Se debe disolver 2 g de tartrato de sodio potasio, 1 g de sulfato de cobre en 10 mL de hidróxido de sodio 1 N.
- **Solución C:** Se debe preparar una solución de agua destilada y reactivo de Folin Cicolteu en proporción 14:1 (Preparada al momento de usar).
- **Solución estándar de seroalbumina bovina:** Se debe disolver la seroalbumina en 15 mg en 50 mL de agua destilada el resto se almacena en congelador. Concentración final 300 mg/L.

4.2.4 Determinación de consumo de azúcares totales

La cuantificación de azúcar permite determinar el consumo para el crecimiento de los microorganismos y establecer la relación de consumo/crecimiento celular. Los azúcares serán determinados por el método de Dubois (1956) (Anexo B), conocido por el método de Antrona. Se debe preparar previamente una curva patrón con diferentes concentraciones de la solución patrón glucosa; los valores obtenidos de la lectura de densidad óptica (D.O.) a 525 nm. Se debe graficar versus la concentración en mg/L para obtener la ecuación de la recta. La dosificación de los azúcares presentes en las muestras en estudio será efectuada sobre 2.5 mL de muestra previamente diluida en agua destilada y se adiciona 5 mL de Antrona preparada en ácido sulfúrico. Los valores obtenidos de las muestras se calcularán por la ecuación de la recta, obtenidos en la curva patrón y multiplicados por el factor de dilución.

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.

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:

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

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:

$$M = Mt - Mo$$

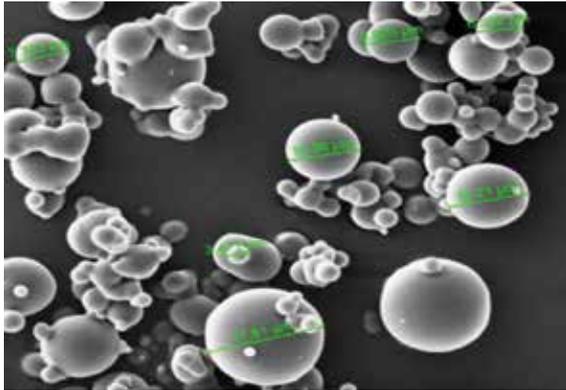
Siendo, Mt la biomasa en el tiempo t y se calculó en el momento de la fase estacionaria en el que el número de células es más elevado y Mo la biomasa del inóculo. El resultado se expresará en $\ln \text{ UFC} / \mu\text{L}$.

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 utiliza un equipo de secado por aspersion **Secador Spray Bilon 6000s®**, con una temperatura de entrada de 170°C y una temperatura de salida de 65 a 67°C, con ciclo completo de 2 horas y 30 minutos. El material obtenido (microencapsulado)

finalmente se envasa en recipientes plásticos oscuros previamente esterilizados y se almacena a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Figura 23. Microfotografía del microencapsulado.



Fuente: los autores

4.7 EVALUACIÓN DEL MICROENCAPSULADO

4.7.1 Estudio de supervivencia y estabilidad

Para evaluar el efecto de los materiales microencapsulantes (maltodextrina e inulina) sobre la viabilidad de los microorganismos encapsulados se debe seguir lo establecido en la metodología de Montes-Ramírez (2013) y Rodríguez-Barona et al. (2016). Se emplearán como criterios de estabilidad: la viabilidad de las BAL evaluadas durante el almacenamiento ($>10^8$ UFC/g), caracterización física (actividad de agua, humedad relativa, solubilidad, eficiencia de microencapsulación, humectabilidad e higroscopicidad), y caracterización estructural (morfología y tamaño de las microcápsulas). Estos parámetros se determinarán por duplicado a los 8, 15, 20, 30, y 45 días de almacenamiento a condiciones ambientales ($20 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.7.2 Viabilidad

De acuerdo a lo propuesto por Rodríguez-Barona et al. (2016) se realizará el recuento de células viables sobre 1 g de material encapsulado, rehidratado a temperatura ambiente en 9 mL de agua de peptona

tamponada al 0.1% p/v (pH 7.2±2) homogeneizado en vórtex y se dejará reposar durante 30 minutos para favorecer la liberación del microorganismo. Un volumen de 150 µL de dilución se sembrará en superficie sobre medio MRS con azul de anilina y se llevará a incubación en condiciones aerobias a 37°C por 48 horas. Los recuentos serán realizados por duplicado y expresados como UFC/g en base seca, para cada condición experimental de acuerdo a Semnoyov et al. (2010). El porcentaje de viabilidad para cada muestra se calculó según la ecuación (1).

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

Donde N_0 es el número de bacterias por mL de solución antes del proceso y N es el número de bacterias por mL de solución después de la etapa de secado.

4.7.3 Humedad

Para determinar la humedad se tomará 2 g de material microencapsulado y se analizará en un determinador de Humedad KERN DBS 60-3 (Balingen - Germany) a una temperatura de 105°C con una Resolución: 0,001 g. (0.01%). El resultado se expresará en porcentaje base seca (% bs).

4.7.4 Actividad de agua

La actividad de agua (A_w) se determinará usando un Termohigrometro Hygrolab Rotronic (Núremberg - Alemania) previamente calibrado. El resultado se expresará en porcentaje base seca (% bs).

4.7.5 Solubilidad

En base a lo descrito por Cano-Chauca et al. (2005) y por el Instituto de Biotecnología y Agroindustria (2011), la solubilidad se obtendrá al disolver 1 g de muestra en 100 mL de agua destilada, esta solución se mantendrá durante 5 minutos a una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$ a 120 r.p.m. en una placa de calentamiento. Posteriormente esta suspensión se centrifugará a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. Luego se deberá tomar una alícuota de 25 mL del líquido sobrenadante y se transferirá

a una caja Petri previamente pesada; se llevará a una estufa a 105°C por 5 h hasta que alcance peso constante. Los sólidos recuperados se deben pesar después del secado (*mf*) y se calcula el porcentaje de solubilidad con la diferencia de pesos mediante la ecuación (2).

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

Donde, *mi* es 0,25 g.

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-Barona *et al.* (2016) y adaptada por los autores. Para esto se utilizará un beaker de 100 mL de 5 cm x 7 cm. Una cantidad de material microencapsulado (1 g) se colocará en una placa removible que cubrirá un depósito de agua, el cual al ser retirada la capa de polvo sin perturbación se pondrá en contacto con el agua. El tiempo de humectación expresado en minutos corresponde al tiempo que se tarda la inmersión completa de un 1 g muestra de polvo depositado suavemente sobre 100 mL de agua a 20°C.

4.7.7 Eficiencia de la microencapsulación

De acuerdo a lo descrito por Gonzales *et al.* (2015) para evaluar la eficiencia de la microencapsulación, la suspensión de microcápsulas serán centrifugadas a 5000 r.p.m. por 15 minutos con el fin de separar las células libres de Bacterias Ácido Lácticas (BAL), como por ejemplo *L. plantarum* y *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.

4.8 PRUEBAS *IN VITRO*

4.8.1 Resistencia a diferentes niveles de temperatura

Este procedimiento se basa en lo descrito por Cai *et al.* (1999). Para ello, se toma una alícuota de la bacteria láctica cultivada en caldo MRS por 24 horas; posteriormente, se efectúa pruebas de viabilidad en agar MRS por 48 horas a 37°C y se selecciona las cajas de Petri con viabilidades de 30 y 300 UFC/150 µL y valores de dilución iguales o superiores a 10⁷ UFC/mL. La incubación se realiza a las temperaturas deseadas.

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. (1989).

4.8.3 Actividad de catalasa

Se colocará una gota de peróxido de hidrógeno sobre una gota con colonias de las bacterias lácticas; la reacción resultante será considerada como positiva por la formación de burbujas de acuerdo a Cai et al. (1998).

4.8.4 Crecimiento de la BAL a diferentes concentraciones de NaCl

Las concentraciones de ácido láctico producidas por la cepa bacteriana se cuantifica siguiendo el método propuesto por Borshchevskaya et al (2016). 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 usan 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 o 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 exponer el material microencapsulado a condiciones gastrointestinales se realizarán pruebas donde se evaluará su resistencia a sales biliares (0.3 y 1%) y bilis (0.3 y 0.5%) utilizando bilis y sales biliares bovinas (Sigma) a niveles de pH de 3.0 (fase gástrica) y pH 5.0 y 7.0 (fase intestinal). Para esto siguiendo el criterio establecido por Crueger y Crueger (1993), se tomará el 10% del material microencapsulado para la determinación, así como también se seguirá lo propuesto por Bruschi y Záchia (2011) citado por Gonzales Cuello et al. (2015). Las microcápsulas de BAL como por ejemplo de *L. gasseri* y *L. plantarum* (2 g), se pasarán a adicionar en 18 mL de caldo MRS mezclado con el porcentaje de bilis y sales biliares ajustados a los pH respectivos, posteriormente se llevará a incubación a 37°C por 48 horas para la liberación y establecimiento del material microencapsulado. A continuación, se efectuará la prueba de viabilidad bajo la metodología de Cai et al. (1998). La variable estudiada consistirá en determinar esta viabilidad de las BAL microencapsuladas expresada en concentraciones iguales o mayores de 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 Coppola y Gil & Gil-Turnes (2015).

Por otra parte, la tolerancia a pH bajo es una importante característica probiótica para la sobrevivencia 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 Marteau et al. (2001) éstos pueden resistir por más de 4 horas a las enzimas proteolíticas y a los bajos valores de pH (1.8-3.2) prevalcientes 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 et al. (1999). Adicionalmente se evalúa la resistencia a lisozima, de acuerdo a lo descrito por Rodríguez-González (2009) donde se someten las cepas lácticas a diferentes preparaciones de lisozima: (i) 0,6 μ L de cultivo y 0,60 μ g de lisozima, (ii) 0,6 μ L de cultivo y 120 μ g de lisozima, (iii) 0,6 μ L de cultivo y 180 μ g de lisozima. Se llevan a incubación durante 24 h a 37°C, trascurrido este tiempo se inocularán en cajas Petri donde se considerarán resistentes a lisozima si se presentan crecimientos superiores o iguales 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 y Tellioglu Harsa (2015), al cual se realizó 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 μ m. 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 & Tellioglu 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 microcápsulas (Ağçam, Akyıldız y Dündar, 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 y 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 μ L 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 ($28 \pm 2^\circ\text{C}$, $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y $42 \pm 2^\circ\text{C}$), y se llevarán a incubación durante 7 días, 48 horas a las temperaturas respectivas. Después de la incubación, la producción de EPS se evalúa en base a la formación de una colonia mucoide alrededor de los discos. La producción de este biopolímero por los aislados se confirmará además mezclando una porción de la sustancia mucoide en 2 mL de alcohol absoluto donde la precipitación de esta porción confirmará la presencia del EPS.

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

4.8.9 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. Incuba a 30 °C por 72 h.

Se revela la hidrólisis del almidón con la exposición de las cajas de cultivo sólido a vapores de yodo 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 (Gamadiel *et al.* 2015). Tenga la precaución de no respirar los vapores ya que estos son tóxicos.

4.8.10 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 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, activa.

El de (Visser *et al.*, 1986). Utiliza discos de agar con la cepa examinada inoculados invertidos sobre la cepa indicadora de inhibición tabla 6.

Tabla 6. 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 adi-

cionando 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 tabla 7.

Tabla 7. Microorganismos y sus medios de cultivo.

Bacterias	Medios de cultivo
Salmonella typhimurium	Todd Hewitt (BBL) TSA (BBL) Hecktoen (Merck)
Shigella boydii	Todd Hewitt TSA Hecktoen
Yersinia enterocolitica	Todd Hewitt TSA Hecktoen
Escherichia coli	Todd Hewitt (BBL) TSA (BBL)

Manual de Microbiología Clínica. Instituto Nacional de Salud. Colombia (2010)

4.8.11 Capacidad de adherencia al epitelio intestinal - ensayos *Ex Vivo*

Se usa un modelo *Ex Vivo* siguiendo la metodología descrita por Serna-Cock, Pabón-Rodríguez, y Giraldo-Gómez (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.

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).

$$\%Ad = \left(\frac{\text{Log concentración bacteriana final}}{\text{Log concentración inicial bacteriana}} \right) \times 100$$

4.8.12 Evaluación in vivo

4.8.12.1 Inclusión y viabilidad en la ración de *Lactobacillus* sin microencapsular

Inicialmente se realizó un ajuste del inóculo de *Lactobacillus casei* (procedimiento anteriormente descrito).

Posteriormente, el inóculo fue adicionado por aspersión sobre el alimento balanceado, que se distribuyó de manera homogénea en bandejas y se puso en incubadora a 37°C por 30 minutos para su secado. Luego, el alimento fue empacó en bolsas al vacío para minimizar su deterioro (figura 24). Se trabajó una cantidad de inóculo

probiótico adicionado (relación v/p) del 20%, según lo recomendado por Ramírez (2005).

Figura 24. Aspersión del concentrado e incubación, secado y almacenamiento del concentrado con *L. casei*.



Fuente: los autores

4.8.12.2 Inclusión del probiótico microencapsulado en la ración

Una vez microencapsulado, el probiótico se suministró 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 24).

Figura 25. Preparado final.



Fuente: los autores

4.8.13 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 rumiante, 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 inoculara varias cajas de Petri con agar MRS y se lleva a incubación por 24 h 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 *et al.*, 1998).

Capítulo 5

Microbiología de alimentos balanceados y el agua

5.1 MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS BALANCEADOS

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 ICA*, en donde se señalan los valores máximos permitidos que son los que se indican a continuación:

- Recuento de Mesófilos Aerobios: 50 x 10³.
- Recuentos de Coliformes totales: 10 x 10².
- Determinación Escherichia coli: Negativo.
- Recuento de esporas sulfito reductor: cero.

- Determinación de Salmonella sp.: Negativo.
- Recuento de Mohos y Levaduras: 50 x 102.
- Recuento de Clostridium sulfito reductor: 10 x 101.
- Determinación de Clostridium perfringens: Negativo.

*MARIN LASSO Salomon. Directivas técnicas de alimentos para animales y sales mineralizadas. Publicado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural en Asociación con el Instituto Colombiano Agropecuario. Bogotá, Colombia: 1999.

Procedimiento

- ✓ Preparar y diluir las muestras.
- ✓ Desinfectar con alcohol al 70% el sitio por donde se va a extraer la muestra.
- ✓ Preparar la dilución 101 de muestras según criterio determinado para cada una de ellas.
- ✓ Preparar la dilución 101 de muestras líquidas, colocando 11 g de muestra macerada y mezclada en un Erlenmeyer que contenga 99 mL de agua peptonada al 0,1%.
- ✓ Agitar el frasco y dejar en reposo por un espacio de 10 minutos.
- ✓ Preparar dilución 102, transfiriendo 1 mL de la dilución 101 a un tubo con 9 mL de agua peptonada al 0,1%. Agitar con mucha precaución de no regar su contenido.
- ✓ Preparar dilución 103, transfiriendo 1 mL de la dilución 102 a otro tubo que contenga 9 mL de agua peptonada.

Recuento de Esporas Clostridium Sulfito Reductor

- ✓ Preparar la muestra y realizar las diluciones respectivas.
- ✓ Pipetear 1 mL de cada una de las diluciones con tubos estériles.
- ✓ Llevar los tubos con diluciones a 80°C/10 minutos y enfriar rápidamente en agua corriente.
- ✓ Colocar 10 más 2 mL de agar SPS (Agar Sulfito Ciclosenina).

- ✓ Depositar la segunda capa de medio SPS.
- ✓ Incubar a 35°C/72 horas.
- ✓ Observar diariamente los tubos que presenten la producción de color negro (presencia de H₂S).
- ✓ Realizar la lectura con base en los tubos que presenten de 5-50 colonias de color negro.
- ✓ Calcular el número total de colonias.

Recuento de *Clostridium perfringens*.

- ✓ Preparar la muestra y las diluciones respectivas.
- ✓ Pipetear por duplicado 1 mL de cada una de las diluciones en cajas de Petri.
- ✓ Verter 15 mL del agar SPS y mezclar según lo indicado.
- ✓ Colocar las cajas de Petri en la cámara de anaerobiosis.
- ✓ Incubar a 35°C/48 horas.

5.2 MICROBIOLOGÍA DEL AGUA

Los análisis microbiológicos se deben efectuar teniendo en cuenta las siguientes recomendaciones:

- ✓ Coliformes totales y fecales según la 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 los Coliformes totales y fecales se tendrá en cuenta la siguiente metodología: Utilizar el medio de cultivo caldo fluorocult (permite identificar al tiempo los dos grupos de microorganismos en 24 h). Se caracteriza porque este medio de cultivo presenta dos sustratos (el X-Gal que reacciona específicamente con la enzima exclusiva de los coliformes totales la β-D glucoronidasa, y el fluorogénico llamado MUG, que reacciona con la enzima características de la *E. coli*, la β-D galactosidasa, dando un compuesto fluorescente, a

la luz U.V. de 366 nm). Además, contiene triptófano para realizar la prueba del Indol, adicionándole 0.5 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. Las correspondientes lecturas se harán en espectrofotómetro a 357 nm (positivos, los tubos que presenten pigmento verde o fluorescencia).

Posteriormente, se sembrará por estrías el contenido de los tubos positivos de la prueba presuntiva en Agar Cetrimide (41,5°C/24 h); se seleccionarán colonias típicas (verde azuladas y fluorescentes a la luz UV), y serán transferidas a cajas de Petri con Agar Tripticasa de Soya (TSA), incubándose a 35°C/24 h.

Finalmente, se harán pruebas de catalasa y oxidasa, seleccionando las colonias que presenten una reacción positiva en ambas. A partir de las cepas oxidasa (+) y catalasa (+) se realizarán las siguientes pruebas bioquímicas: crecimiento a 4°C y 41,5°C, reducción de nitratos y producción de piocianina. De las cepas positivas se calculará el número más probable (NMP) reportándose como NMP/100 mL de *Pseudomonas aeruginosa*.

Capítulo 6

Microbiología Predictiva

6.1 INTRODUCCIÓN

La microbiología predictiva es una herramienta informática que permite simular los diversos aspectos del crecimiento microbiano, por lo que su aplicabilidad es amplia, abarcando diversos sectores como el alimentario (Yarse, 2013).

Actualmente, se usa la microbiología predictiva como herramienta para el estudio de los alimentos y su inocuidad, por ello, utiliza técnicas matemáticas y estadísticas para modelar el comportamiento de los microorganismos en los alimentos teniendo en cuenta diversos parámetros que afectan su crecimiento (Klotz, 2011). Esto es importante, dado que permite anticipar la respuesta de los microorganismos a partir de unas condiciones iniciales y ver cómo se desarrolla a través del tiempo (Juncal et al. 2018). El término microbiología predictiva se puede definir como el campo de estudio que hace uso de la microbiología, matemáticas y estadística para desarrollar modelos que permitan describir y predecir el comportamiento de poblaciones de los microorganismos sometidos a diversas condiciones (Huang, 2014).

A partir del conocimiento de las respuestas microbianas ante tales elementos del entorno, se formulan ecuaciones matemáticas que indican un comportamiento, ya sea de crecimiento, supervivencia o

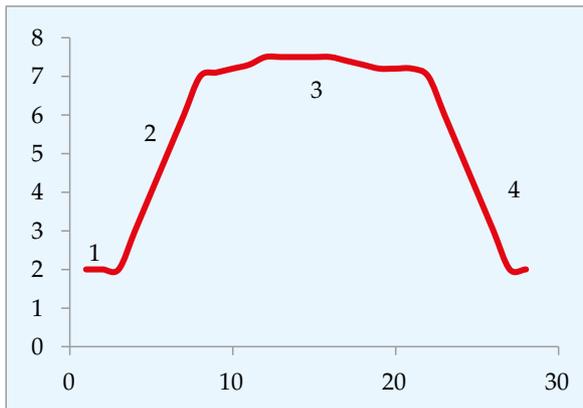
inactivación; a las cuales, se les identifica como modelos predictivos microbiológicos (Huang, 2014).

Los análisis realizados por la microbiología predictiva permiten clasificar diferentes modelos: primarios, secundarios y terciarios. Los primeros, se encargan de determinar el crecimiento microbiano con el fin de generar curvas de crecimiento. Los segundos ayudan a comprender como estas curvas de crecimientos se ven alteradas si existe un cambio en diversas condiciones. Los terceros modelan estas variables comparando con su vida de anaquel o la vida útil del producto, generalmente son modelos mucho más complejos, que necesitan el desarrollo de programas informáticos, y que son desarrollados por sectores públicos o privados que ponen a disposición de los interesados esta herramienta.

Como la microbiología predictiva tiene sus bases en la estadística y el manejo de datos, se debe tener un conocimiento básico en esta área del conocimiento, especialmente en lo referente a la modelación de curvas de crecimiento.

Por ello, para iniciar el estudio de la microbiología predictiva, primero se definirá los parámetros que componen las curvas de crecimiento (Figura 26). Una curva de crecimiento se secciona en cuatro partes principales o momentos denominados **fase lag (latencia)**, **fase exponencial**, **fase estacionaria** y **fase de muerte** como se puede observar en la siguiente figura.

Figura 26. Curva de crecimiento microbiano.



Fuente: los autores. 1 fase de latencia, 2 fase exponencial, 3 fase estacionaria, 4 fase de muerte.

Durante la primera fase (*fase de latencia*), el crecimiento de la bacteria es muy lento, casi nulo, como consecuencia de la adaptación de esta al sustrato y su colonización. La *fase exponencial* se caracteriza por ser el momento de mayor crecimiento poblacional y por consiguiente un mayor consumo de sustrato. Aquí debemos aclarar que la curva observada en la figura 25 se desarrolla cuando la cantidad de sustrato es limitado; si se realiza en un medio donde el consumo de nutrientes se reemplaza a medida que se va consumiendo, entonces la fase exponencial continuará en ascenso hasta que el sustrato se convierta en limitante (sistema continuo).

La *fase estacionaria* es consecuencia directa de una disminución del sustrato que ralentiza el crecimiento y lo mantiene estable durante un periodo de tiempo. La *fase de muerte*, como su nombre lo indica, 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.

Existe una gran variedad de modelos matemáticos para modelizar las curvas de crecimiento microbial, se empieza con los modelos más sencillos como son las polinomiales, entre las que se destacan los cuadráticos y los cúbicos; o los no lineales, en donde se observan modelos de Gompertz, Bertalanffy, logarítmica, entre otros.

Los modelos terciarios, como se mencionó anteriormente, son programas creados a través de información recolectada en los diferentes laboratorios y matrices de alimentos, que ayudan a comprender el comportamiento microbiano bajo distintas condiciones. Actualmente existen muchos programas de este tipo, por lo que invitamos a nuestro querido lector a realizar una búsqueda de este tipo de programas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adhikari, A., Yemmireddy, V. K., Costello, M.J., Gray, P.M., Alvaladlena, R., Rasco, B., Killinger, K. (2018). Effect of storage time and temperature on the viability of *E. coli* O157: H7, *Salmonella* spp., *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium sporogenes* vegetative cells and spores in vacuum-packed canned pasteurized milk cheese. *International journal of food microbiology*, 286, 148-154.
- 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.
- Andrade, R.M., Espinoza, M.M., Rojas, J.A., Tirado, P.O., Salas, R.G., Falcón, V.V. (2017). Mastitis bovina y su repercusión en la calidad de la leche. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 18(11), 1-16.
- Arce Gil, Z., & Asalde Ramos, R. (2012). *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio, ed. Mogrovejo-Chiclayo 2009. *Rev. Cuerpo Méd. Hosp. Nac. Almanzor Aguinaga Asenjo*, 33-35.
- Ballesteros Trujillo, M., Hernández Berriel, M. D. C., De la Rosa Gómez, I., Mañón Salas, M. D. C., & Carreño de León, M. D. C. (2018). Crecimiento microbiano en pilas de compostaje de residuos orgánicos y biosólidos después de la aireación. *Centro azúcar*, 45(1), 1-10.
- Barbano, D.M., Santos, M.V. (2006). Influence of raw milk quality on fluid milk shelf life. *Journal of dairy science*, 89, E15-E19.
- Bedoya-Mejía, O., Posada, S.L., Rosero-Noguera, R. (2012). Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes. *Desarrollo y Transversalidad serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Corporación Universitaria Lasallista.
- Bruno Salabarría, M. S., y Fuentes Bedoya, E. A. (2021). Análisis de peligros y puntos críticos de control (haccp): sistema para la gestión de la inocuidad en las industrias agroalimentarias en Colombia.
- 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.

- Capacho, G. G. (2019). Limpieza y desinfección relacionada con transmisión de microorganismos patógenos. *Revista Criterios*, 26(1), 71-79.
- Castillo, R., Lagarriga, R. (2010). Productos lácteos: tecnología. Politex.
- Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). Manual de microbiología aplicada a la industria farmacéutica, cosmética y de productos médicos.
- Delgado, P.A., Rivera, M.S., Duque, J.A., Guevara, F.A. (2014). Factores inherentes a la calidad de la leche en la agroindustria alimentaria. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 223-242.e
- Donnelly WJ, Horne DS. (1986). Relationship between ethanol stability of bovine milk and natural variations in milk composition. *Journal of Dairy Research* 53:23-33.
- Doval, C. G. (2013). *Estructura de fibras de bacteriófagos* (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Madrid).
- Duque-Quintero, M., Duque-Quintero, S.P., Duque, D. (2018). La cadena láctea popular: Una mirada desde las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en Antioquia, Colombia (2008-2015). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 19(8), 7-8.
- Elles Navarro, E. (2018). *Guía de laboratorio bromatología y microbiología de alimentos*. Corporación Universitaria Rafael Núñez.
- Espinoza-Santillán, D., Martínez-Juárez, V., Peralta-Ortiz, J., Molina-Mendoza, P., Olave-Leyva, J., & Ávila-Castillo, R. (2016). Bacterial study in uterus from slaughtered cows at the municipal slaughterhouse in Tulancingo, Hidalgo. *Abanico Veterinario*, 6(1), 22-28.
- Estacio, R. C., Kron, M. A., Janlav, M., Yu, G. F. B., & Macaulay, J. O. (2020). Post-graduate 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*.
- FAO. Composición de la leche. Online: PORTAL LÁCTEO. Online [Citado el 6 julio de 2019]. Disponible en: <http://www.fao.org/dairy-production-products/products/composicion-de-la-leche/es/>
- Ferreras, J. A., Buemo, C. P., del Pozo, M. R., Kuhlmann, P. A., Argüelles, C. F., Uribe Cruz, C., ... & Depasquino, A. F. (2018). Manual de bioseguridad y buena conducta en el laboratorio.
- Fox, P. F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., Mcsweeney, P.L. (2017). *Fundamentals of cheese science* (pp. 185-229). New York: Springer.

- García Alba, L. M. O. (2020). Riesgos Biológicos en los Trabajadores de la Salud, Una revision documental.
- González, L., Medina, G. (2005). Determinación de cloruros en leche pasteurizada consumida en el estado de Mérida. Venezuela y su incidencia en el punto crioscópico. *INHRR*, 36(2), 2-17.
- González-Hernández, J.C., Peña, A. (2002). Estrategias de adaptación de microorganismos halófilos y *Debaryomyces hansenii* (Levadura halófila). *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 44(3-4), 137-156.
- Guevara-Freire, D., Montero-Recalde, M., Rodríguez, A., Valle, L., Avilés-Esquivel, D. (2019). Calidad de leche acopiada de pequeñas ganaderías de Cotopaxi, Ecuador. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(1), 247-255.
- Harrigan, W. F., & McCance, M. E. (1968). *Métodos de laboratorio en microbiología* (No. 576 HARm). Madrid: Academia.
- Higuera-Marin, J.V., Aguirre-Castillo, R.N., Arenas-Gil, F., Correa-Londoño, G.A. (2019). Análisis fisicoquímico y sensorial de queso fresco con reemplazo de grasa por lípidos de aguacate (Persea Americana Mill V. Hass). *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 22(1), 34-56.
- Huang, L. (2014). IPMP 2013—a comprehensive data analysis tool for predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 171, 100-107.
- Jaimes-Albornoz, J. (2014). Estudio de la calidad microbiológica del aire interior de la Biblioteca Agrícola Nacional (BAN) en la Universidad Nacional Agraria La Molina en base a los hongos ambientales. [Tesis de Pregrado, Universidad Agraria la Molina]. <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2438>
- Jaramillo Prado, L. D. (2015). Optimización de un proceso de digestión anaerobia de vinaza usando una estrategia de enriquecimiento con microorganismos pre-adaptados.
- Jiang, Y., Li, N., Wang, Q., Liu, Z., Lee, Y. K., Liu, X., Chen, W. (2020). Microbial diversity and volatile profile of traditional fermented yak milk. *Journal of dairy science*, 103(1), 87-97.
- Jurado-Gámez, H., Muñoz-Domínguez, L., Quitiaquez-Montenegro, D., Fajardo-Jiménez, G., Tobón, J., Abuabara, Y. (2018). Elementos de gestión empresarial en la ganadería bovina del trópico de altura en Colombia (No. Doc. 20112) CO-BAC, Bogotá).
- Klotz, B. (2011). La Microbiología Predictiva. *Alimentos Hoy*, 11(11), 306-307.
- 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.
- 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.
- Ocampo, R., Gómez, C., Restrepo, D., Cardona, H. (2016). Estudio comparativo de parámetros composicionales y nutricionales en leche de vaca, cabra y búfala, Antioquia, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8(2), 177-186.
- Olivero, R., Aguas, Y., Cury, K. (2011). Comercialización de leche cruda en Sincelejo, Sucre, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 9(3), 157-163.
- Ortiz Texon, J. A., Delgadillo Martínez, J., Rodríguez Mendoza, M. D. L. N., & Calderón Zavala, G. (2016). Inoculación bacteriana en el crecimiento y calidad del fruto de cinco variedades de fresa en suelos con pH contrastante. *Terra Latinoamericana*, 34(2), 177-185.
- Parés, R., & Juárez, A. (2020). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: Reverté.
- Patiño, E.M. (2011). Producción y calidad de la leche bubalina. *Tecnología en marcha*, 24(5), 25-35.
- Pérez, M. Á. D., Benavides, D. X. M., & Hernández, P. A. C. (2009). Contaminación microbiológica del aire al interior y el síndrome del edificio enfermo. *Biociencias*, 10(2), 37-50.
- Perez, M., Mota, M. (2008). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*, 2, 23-42.
- Pérez, C., Peluffo, G., Giachetto, G., Menchaca, A., Pérez, W., Machado, K., ... & 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*, 91, 30-31.
- Prieto-Manrique, E., Vargas-Sánchez, J.E., Angulo-Arizala, J., Mahecha-Ledesma, L. (2017). Grasa y ácidos grasos en leche de vacas pastoreando, en cuatro sistemas de producción. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 19-42.
- Quevedo, V.L. (2019). Control de calidad de leche cruda en las provincias de Azuay y Cañar. *Revista Ecuatoriana de Ciencia Animal*, 3(3), 1-6.
- Ramos, A.C. (2008). Refrigeración de la leche en la granja. *Frisona Española*, 28(165), 84-90.
- Rivera, V.M. (2008). *Bases de la Alimentación Humana*. Netbiblo.

- Rodríguez, J.A., Santoyo, M.A., Miranda, L.V., Méndez, A.A. (2018). Parámetros químicos de cremas de leche regulares, light y vegetales. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3, 381-386.
- Rosselló, G.A., Pérez, M.Á. (2016). Antibiograma rápido en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(1), 61-68.
- Salcedo-Jaramillo, L.F. (2009). Acuerdo de competitividad de la cadena láctea colombiana. Carta Fedegan (Colombia)(no. 57) p. 54-61ISSN 0123-2312.
- Samaniego-Moreno, L., Vidales-Contreras, J. A., García-Zambrano, R. A., Rodríguez-Fuentes, H., Olivares-Sáenz, E., Vázquez-Alvarado, R. y Gortares-Moroyocui, P. (2012). Sobrevivencia de bacteriófagos en una presa recreativa del noreste de México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 28(3), 187-194.
- Sánchez, J. A., 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.
- Sánchez, T., Lamela, L., López, O., Benítez, M. (2015). Influencia del probiótico Sorbifauna en la producción y calidad de la leche de vacas mestizas en pastoreo. *Pastos y Forrajes*, 38(3), 183-188.
- Simova, E., Beshkova, D., Angelov, A., Hristozova, T., Frengova, G., Spasov, Z. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 1-6.
- Singh H., Mccarthy O.J., Lucey, J.A. (1997). Physico-chemical properties of milk: Advanced dairy chemistry. 3. Lactose, water, salts and vitamins. Fox P.F., ed. Chapman & Hall, Londres.
- Soria Freire, S. E. (2016). *Esterilización de desechos biocontaminados en laboratorios de microbiología que producen contaminación* (Doctoral dissertation, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Escuela de Graduados).
- Vargas-Díaz, S., Sepúlveda, J.U., Ciro, H.J., Mosquera, A.J., Bejarano, E. (2019). Physicochemical, sensory and stability properties of a milk caramel spread sweetened with a glucose-galactose syrup from sweet whey. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8995-9005.
- Vargas-Flores, T., & Kuno-Vargas, A. (2015). Morfología bacteriana.
- Vázquez, C., Martín, A.; de Silóniz, M. I. & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*, 3(5).
- Velásquez, S.D., Higuera, L.T., Arango, J.P., Bautista, J.R., Castro, F.G., Burbano, E.P. (2019). Perfil de resistencia antimicrobiana en aislamientos de *Staphylococcus*

- spp. obtenidos de leche bovina en Colombia. *Revista Argentina de Microbiología* 28(4), 34-42.
- Verhelst, A. (2017). Evaluación del efecto de la adición de oligofructosa sobre las características fisicoquímicas, sensoriales, microbiológicas y el aporte calórico de leche condensada de búfala. *Vitae*, 24(2), 23-34.
- Wanjala, G.W., Mathooko, F.M., Kutima, P.M., Mathara, J.M. (2017). Microbiological quality and safety of raw and pasteurized milk marketed in and around Nairobi region. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 17(1), 11518-11532.
- Wildbrett, G. (2000). *Limpieza y desinfección en la industria alimentaria*. Ed. Acribia.
- Yang, X., Wang, D., Zhou, Q., Nie, F., Du, H., Pang, X., ... & Xu, Y. (2019). Antimicrobial susceptibility testing of Enterobacteriaceae: determination of disk content and Kirby-Bauer breakpoint for ceftazidime/avibactam. *BMC microbiology*, 19(1), 1-7.
- Yarce, C. J. (2013). Microbiología predictiva: Una ciencia en auge. *INGE@ UAN-Tendencias en la Ingeniería*, 3(6).
- Zúñiga-Carrasco, I. R., & Jesús, M. D. (2021). Evidencia epidemiológica. Secadores de manos como dispersores de patógenos para el ser humano y su entorno. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 33(135), 1804-1808.



Editorial
Universidad de **Nariño**

Este libro se terminó de imprimir
en el mes de junio de 2021,
en Graficolor Pasto sas
Calle 18 No. 29-67
Tels. 7310652 - 7311833
graficolorpasto@hotmail.com

Se imprimieron 100 ejemplares

SOBRE LOS AUTORES

Henry Jurado Gámez

Es Doctor (Ph.D) en Ingeniería con Énfasis en Ingeniería de Alimentos de la Universidad del Valle; Magíster (M.Sc) en Microbiología Agropecuaria de la Universidad Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal de Sao Paulo, Brasil; Especialista en Microbiología de la Universidad Católica de Manizales y Zootecnista de la Universidad de Nariño.



Actualmente es Profesor Tiempo Completo con Categoría de Profesor Titular del Programa de Zootecnia, Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad de Nariño y Director del Grupo de Investigación Probiotec - Forapis. Además, es Investigador en la línea de Investigación Procesos Biotecnológicos aplicados a la Producción Animal y autor de varios libros y artículos científicos en revistas reconocidas.

John Jairo Parreño Salas

Es candidato a Magister (M.Sc) en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción Animal de la Universidad de Nariño y Zootecnista de la misma Universidad.

Actualmente es Investigador en las líneas de fisiología, apicultura y biotecnología (bioestadística) en el grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS de la Universidad de Nariño, además de contar con la experiencia laboral en bioestadística y biomodelación.



Ivonne Catalina Fajardo Argoti

Es Magister (M.Sc) en Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín y Zootecnista de la Universidad de Nariño. Actualmente es investigadora del grupo de Investigación PROBIOTEC-FORAPIS en la línea de investigación Procesos Biotecnológicos Aplicados a la Producción Animal y autora de varios artículos científicos en revistas reconocidas.



El presente libro, es fruto de las actividades de Investigación y Docencia desarrolladas por los Autores como Profesores de la Universidad de Nariño con el fin de incentivar el conocimiento de las Prácticas de Laboratorio de Microbiología Zootécnica.

Por esta razón, este libro es contribución valiosa para la enseñanza de la Microbiología en el campo de la Zootecnia y de Profesiones afines que les permitirá a estudiantes, profesionales y productores complementar su formación.

En este libro se abordan temas relacionados con los fenómenos de fermentación, descomposición, la aplicación de procesos biotecnológicos con diferentes microorganismos, el análisis en diferentes matrices alimenticias que permiten cuantificar el nivel de posibles contaminantes, que pueden ser causales de toxiinfecciones.

Finalmente, el Libro: “Procedimientos de Laboratorio de Microbiología Zootécnica”, brinda los conocimientos necesarios para desarrollar planes de bioseguridad, que son necesarios para trabajar con microorganismos patógenos y benéficos de diversos ambientes de laboratorio. Todo lo anterior, permitirá comprender mejor el impacto favorable que se debe tener en cuenta en la inocuidad alimentaria.



Editorial
Universidad de **Nariño**