

Licenciatura en Nutrición y Ciencia de los Alimentos



MANUAL DE PRÁCTICAS MICROBIOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS

Elaborado por:

Mtro. Oscar Robles Ramírez

Responsable del Laboratorio:

Dra. Elsa Patricia Hernández Ojeda

Veracruz, Veracruz

Julio 2025

INTRODUCCIÓN:

La microbiología de alimentos es una ciencia eminentemente práctica. La comprensión de los conceptos teóricos sobre el crecimiento microbiano, la contaminación y la inocuidad solo se consolida a través de la experiencia directa en el laboratorio. Es en este espacio donde el conocimiento se transforma en habilidad, y la teoría se materializa en resultados observables.

Este manual es la guía fundamental para el componente práctico de la asignatura. Ha sido diseñado para ser una herramienta de aprendizaje activo, donde cada procedimiento, desde la preparación de un medio de cultivo hasta la identificación de un microorganismo, tiene un propósito claro: construir las competencias necesarias para que el futuro profesional de la nutrición y la ciencia de los alimentos pueda tomar decisiones informadas para proteger la salud del consumidor.

Las diez prácticas aquí contenidas han sido cuidadosamente seleccionadas y adaptadas a los recursos disponibles, buscando maximizar el aprendizaje significativo. Se ha seguido un enfoque progresivo, comenzando con las normas de seguridad y las técnicas más básicas, y avanzando hacia procedimientos de análisis y proyectos aplicados que integran la totalidad de los conocimientos del curso.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar en el estudiante las competencias procedimentales y analíticas fundamentales para la ejecución de análisis microbiológicos en alimentos, aplicando técnicas estandarizadas de muestreo, cultivo, aislamiento, identificación y cuantificación de microorganismos, con el fin de que pueda integrar el conocimiento teórico con la evidencia experimental para evaluar la calidad sanitaria y la inocuidad de los productos alimenticios.

SUTENTO TEORICO

La formación de un profesional en Nutrición y Ciencia de los Alimentos exige una sólida comprensión de los principios que rigen la inocuidad alimentaria. La microbiología, como ciencia, proporciona el fundamento teórico para entender a los agentes invisibles que pueden alterar un alimento o causar enfermedades; sin embargo, es en el laboratorio donde este conocimiento abstracto adquiere una dimensión tangible y aplicable. El presente manual se sustenta en un enfoque de **aprendizaje por competencias**, donde el "saber hacer" es tan importante como el "saber".

El diseño de este manual se alinea con el modelo de la **Pirámide de Miller**, un esquema ampliamente aceptado para la evaluación de competencias en ciencias de la salud. A través de las prácticas, el estudiante transitará por los distintos niveles de la pirámide:

1. **Saber:** Reforzando en el laboratorio los conceptos teóricos aprendidos en el aula.
2. **Saber cómo:** Aplicando el conocimiento para resolver problemas prácticos, como calcular diluciones o interpretar el resultado de una tinción.

3. **Demostrar:** Ejecutando las técnicas y procedimientos en el entorno controlado del laboratorio (*evaluación in vitro*), demostrando destreza y precisión.
4. **Hacer:** Integrando todas las competencias en un proyecto aplicado final, donde actúa como un profesional que diseña, ejecuta, analiza y comunica los resultados de una investigación relevante para la inocuidad.

La secuencia de las prácticas está diseñada de manera **progresiva y constructivista**. Se inicia con la competencia más básica y transversal: la bioseguridad (Práctica 1). A partir de ahí, se construyen las habilidades de manera escalonada: preparación de insumos estériles (Práctica 2), manejo de muestras (Práctica 3), evaluación de fuentes de contaminación (Prácticas 4 y 5), análisis de factores de crecimiento (Práctica 6), y finalmente, las técnicas nucleares de aislamiento, observación y cuantificación (Prácticas 7, 8 y 9). Este recorrido culmina en un proyecto integrador (Práctica 10) que exige al estudiante movilizar todos los saberes adquiridos.

En definitiva, este manual no es un simple recetario de técnicas, sino una herramienta pedagógica diseñada para que el estudiante construya su propio aprendizaje, desarrolle el pensamiento crítico y adquiera las habilidades prácticas que le permitirán, en su futuro profesional, ser un garante de la inocuidad y la calidad alimentaria.

INTRODUCCIÓN Y NORMAS DE TRABAJO

El laboratorio de microbiología es un entorno con riesgos potenciales que requieren un manejo responsable y disciplinado. El cumplimiento estricto de las siguientes normas es obligatorio para garantizar la seguridad de todos los participantes y la validez de los resultados experimentales.

Reglamento de Bioseguridad:

1. **Vestimenta:** Es obligatorio el uso de bata de laboratorio de algodón, manga larga, limpia y abotonada en todo momento. Se requiere calzado cerrado y, en caso de tener cabello largo, este deberá estar recogido.
2. **Área de Trabajo:** Antes y después de cada práctica, la mesa de trabajo debe ser desinfectada con una solución apropiada (etanol al 70% o solución de hipoclorito).
3. **Material:** No se debe introducir material ajeno a la práctica (mochilas, libros, alimentos, bebidas). Todo el material necesario para la práctica debe estar contenido en el área de trabajo.
4. **Asepsia:** El principio de esterilidad es la base del trabajo microbiológico. Se debe trabajar siempre cerca de la flama de un mechero Bunsen para crear un ambiente estéril. Nunca dejar placas o tubos abiertos innecesariamente.

-
5. **Manejo de Cultivos:** Todos los cultivos microbianos deben ser tratados como potencialmente patógenos. Evitar cualquier contacto directo con la piel o mucosas. No oler ni pipetear cultivos con la boca.
 6. **Residuos:** Todo el material contaminado (placas de Petri, tubos, hisopos, etc.) debe ser desechado en los contenedores rojos para RPBI (Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos) para su posterior esterilización en autoclave antes de ser descartado.
 7. **Accidentes:** En caso de cualquier derrame de cultivo o accidente, notificar inmediatamente al profesor.
 8. **Higiene Personal:** Es obligatorio lavarse las manos con agua y jabón antes de salir del laboratorio.

PRÁCTICA 1

Bioseguridad y Fundamentos del Laboratorio Microbiológico

Fundamento: El trabajo seguro y eficiente en un laboratorio de microbiología se basa en dos pilares: el conocimiento profundo de las normas de bioseguridad para proteger al personal y al ambiente, y el dominio del equipo básico que permite la visualización y el cultivo de microorganismos. Esta práctica introductoria establece las bases para todo el trabajo subsecuente en el curso.

Competencia a desarrollar: Aplica los principios de bioseguridad y reconoce la infraestructura y equipo necesarios para el trabajo en microbiología, como base para el control de calidad.

Objetivos:

- Identificar los riesgos biológicos y químicos presentes en un laboratorio de microbiología y aplicar las normas de bioseguridad para minimizarlos.
- Conocer el funcionamiento, componentes, cuidados y limpieza del equipo fundamental del laboratorio (microscopio óptico, autoclave, estufa de incubación, balanza).

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Microscopio óptico
 - Autoclave
 - Estufa de incubación o bacteriológica
 - Balanza granataria y/o analítica
 - Campana de flujo laminar (para demostración)
- **Material General:**
 - Reglamento interno del laboratorio (impreso o digital)
 - Bitácora de laboratorio

Procedimiento:

1. **Discusión de Bioseguridad:** El profesor dirigirá una sesión de discusión sobre el reglamento de bioseguridad, enfatizando los puntos clave y resolviendo dudas.
2. **Recorrido Guiado:** Se realizará un recorrido por las instalaciones, identificando las áreas de trabajo (preparación de medios, siembra, incubación, esterilización) y la ubicación de los equipos de seguridad (extintor, regadera de emergencia, lavaojos).

Nombre del docente que lo elaboró

3. **Demostración de Equipo:** El profesor explicará y demostrará el funcionamiento de cada uno de los equipos fundamentales listados.
4. **Enfoque en el Microscopio:** Se dedicará tiempo a que cada estudiante identifique las partes del microscopio óptico (oculares, objetivos, platina, revólver, diafragma, tornillos macrométrico y micrométrico) y practique el enfoque correcto utilizando una laminilla preparada.

Resultados esperados: El estudiante será capaz de enunciar las principales normas de seguridad y describir la función y el manejo básico del equipo de laboratorio.

Cuestionario:

1. ¿Cuáles son los 3 principales riesgos a los que se enfrenta en este laboratorio?
2. Describa el procedimiento a seguir en caso de un derrame de un cultivo bacteriano.
3. ¿Cuál es la función del autoclave y cuáles son los parámetros estándar de tiempo, presión y temperatura para una esterilización efectiva?
4. Dibuje un esquema de un microscopio óptico y señale sus partes principales.
5. ¿Por qué es crucial trabajar cerca de la flama de un mechero al manipular cultivos?

Bibliografía:

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Introducción a la microbiología* (12ª ed.). Editorial Médica Panamericana. (Capítulo 3: Observación de microorganismos a través del microscopio; Capítulo 7: Control del crecimiento microbiano).

PRÁCTICA 2

Preparación de Medios de Cultivo y Técnicas de Esterilización

Fundamento: Los microorganismos requieren nutrientes específicos para crecer. Los medios de cultivo son mezclas equilibradas de nutrientes que simulan el ambiente ideal para su desarrollo *in vitro*. La preparación correcta y, sobre todo, la esterilización absoluta de estos medios son el prerrequisito indispensable para cualquier análisis microbiológico, ya que la presencia de contaminantes invalidaría cualquier resultado.

Competencia a desarrollar: Aplica procedimientos estandarizados para la preparación de insumos estériles (medios de cultivo), un requisito indispensable para el análisis microbiológico.

Objetivos:

- Aprender a preparar un medio de cultivo sólido (Agar Nutritivo) a partir de un medio deshidratado.
- Aplicar correctamente la técnica de esterilización por calor húmedo utilizando el autoclave.
- Desarrollar la destreza para verter placas de agar en condiciones de asepsia.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Balanza granataria
 - Agitador magnético con parrilla de calentamiento
 - Autoclave
 - Mecheros Bunsen
- **Material de Vidrio:**
 - Matraz Erlenmeyer de 1 L
 - Probeta de 500 ml
- **Reactivos:**
 - Agar Nutritivo (polvo)
 - Agua destilada
- **Material General:**
 - Papel estraza o aluminio
 - Cinta testigo para autoclave
 - Cajas de Petri estériles (plástico)

Procedimiento:

1. **Cálculo y Pesaje:** Calcular la cantidad de Agar Nutritivo necesaria para preparar 500 mL de medio, según las indicaciones del fabricante. Pesar la cantidad calculada en la balanza.
2. **Disolución:** En el matraz Erlenmeyer, añadir el polvo a 500 mL de agua destilada. Colocar en el agitador magnético con calentamiento hasta que el medio hierva suavemente y se disuelva por completo (la solución debe ser traslúcida).
3. **Preparación para Esterilizar:** Tapar la boca del matraz con un tapón de algodón envuelto en gasa y cubrirlo con papel estraza o aluminio. Colocar un trozo de cinta testigo en el matraz.
4. **Autoclavado:** Colocar el matraz en el autoclave y ejecutar un ciclo de esterilización estándar (121°C, 15 psi, 15-20 minutos).
5. **Enfriamiento y Vaciado:** Una vez finalizado el ciclo, y con la presión en cero, retirar el matraz con guantes de protección y dejarlo enfriar en un baño de agua a 45-50°C.
6. **Vaciado en Placas:** Trabajar en un área aséptica cerca de un mechero encendido. Verter aproximadamente 15-20 mL de agar en cada caja de Petri, lo suficiente para cubrir el fondo. Dejar solidificar con la tapa semiabierta.
7. **Almacenamiento:** Una vez solidificadas, cerrar las placas, invertirlas (para evitar que el agua de condensación caiga sobre el agar) y etiquetarlas. Almacenar en refrigeración hasta su uso.

Resultados esperados: El equipo obtendrá un conjunto de placas de agar nutritivo estériles, listas para ser utilizadas en prácticas posteriores.

Cuestionario:

1. ¿Por qué es necesario hervir el medio de cultivo antes de esterilizarlo?
2. ¿Cuál es el agente gelificante en el medio que preparamos y de dónde se obtiene?
3. ¿Qué indica la cinta testigo y por qué no es una garantía absoluta de esterilidad?
4. ¿Por qué se invierten las placas de Petri para su almacenamiento?
5. Si al día siguiente observa colonias en sus placas, ¿cuáles podrían ser las posibles fuentes de esa contaminación?

Bibliografía:

- NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

PRÁCTICA 3

Muestreo y Preparación de Muestras para Análisis

Fundamento: Un análisis microbiológico, por más preciso que sea, es inútil si la muestra analizada no es representativa del lote de alimento original. El muestreo es un proceso crítico que busca obtener una porción manejable del alimento que refleje la condición microbiológica del todo. Posteriormente, la preparación de diluciones seriadas es esencial para reducir la concentración de microorganismos a un nivel que permita su cuantificación en placa.

Competencia a desarrollar: Aplica los procedimientos y técnicas básicas para el muestreo y preparación de muestras, asegurando la representatividad y la correcta dilución para el análisis cuantitativo.

Objetivos:

- Aplicar los procedimientos básicos de la NOM-109-SSA1-1994 para la toma de una muestra de un alimento sólido.
- Realizar una homogenización de la muestra y preparar diluciones decimales seriadas (10^{-1} a 10^{-3}) de acuerdo con la NOM-110-SSA1-1994.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Balanza granataria
 - Vortex (Agitador de tubos)
 - Pipeta automática de 1000 microlitros con puntas estériles
- **Material de Vidrio:**
 - Mortero con pistilo estéril
 - Tubos de ensaye con taparroscas (16x150)
 - Pipetas graduadas estériles de 1 mL y 10 mL
- **Reactivos:**
 - Solución salina peptonada al 0.1% estéril (o agua peptonada)
- **Muestras:**
 - Muestra de alimento sólido (ej. jamón, queso fresco, fruta picada)

- **Material General:**

- Bisturí o cuchillo estéril
- Pinzas estériles
- Gradillas para tubos

Procedimiento:

1. **Preparación del Diluyente:** Asegurarse de tener al menos 100 mL de solución salina peptonada estéril. Rotular 3 tubos de ensaye como 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
2. **Dispensación del Diluyente:** Utilizando una pipeta estéril, colocar 9 mL de la solución salina peptonada en cada uno de los 3 tubos rotulados.
3. **Toma y Pesaje de la Muestra:** En un área aséptica, tomar con pinzas y bisturí estériles una porción del interior del alimento. Pesar asépticamente 10 gramos de la muestra.
4. **Homogenización (Dilución 10^{-1}):** Colocar los 10 g de muestra en un mortero estéril. Añadir 90 mL de la solución salina peptonada. Triturar y mezclar vigorosamente durante 1-2 minutos hasta obtener una suspensión lo más homogénea posible. Esta es la dilución 10^{-1} .
5. **Preparación de Diluciones Seriadas:**
 - Tomar 1 mL de la dilución 10^{-1} y transferirlo al tubo rotulado como 10^{-2} . Homogenizar en el vórtex por 10 segundos.
 - Tomando una nueva pipeta estéril, tomar 1 mL de la dilución 10^{-2} y transferirlo al tubo rotulado como 10^{-3} . Homogenizar en el vórtex.
6. **Almacenamiento:** Mantener las diluciones en refrigeración si no se van a utilizar de inmediato.

Resultados esperados: El equipo obtendrá una serie de 3 tubos con diluciones decimales de la muestra de alimento, listas para ser sembradas para el recuento microbiano.

Cuestionario:

1. ¿Por qué es importante tomar la muestra del interior del alimento y no de la superficie en este caso?
2. ¿Cuál es el propósito de la solución salina peptonada como diluyente? ¿Por qué no se usa solo agua destilada?
3. ¿Por qué se debe cambiar de punta de pipeta entre cada dilución?

4. Si contaras 50 colonias en una placa sembrada con 1 mL de la dilución 10^{-3} , ¿cuál sería la concentración de microorganismos en la muestra original (expresada en UFC/g)?
5. Mencione 3 errores comunes durante este procedimiento que podrían alterar drásticamente el resultado final.

Bibliografía:

- NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimiento para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.
- NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

PRÁCTICA 4

Evaluación de la Contaminación por Manipuladores

(Higiene de Manos)

Fundamento: El ser humano es uno de los principales reservorios de microorganismos, incluyendo patógenos como *Staphylococcus aureus*. Las manos del manipulador de alimentos son un vehículo de contaminación cruzada de alta eficiencia. Esta práctica visual y de alto impacto demuestra la importancia crítica de una de las barreras sanitarias más simples y efectivas: el correcto lavado de manos.

Competencia a desarrollar: Evalúa los riesgos asociados a la contaminación microbiana, reconociendo el mecanismo de contaminación humana y la importancia de las buenas prácticas de higiene.

Objetivos:

- Evidenciar de forma visual el impacto de la higiene de manos en la reducción de la carga microbiana.
- Comprender el rol del manipulador de alimentos como una fuente principal de contaminación.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Estufa de incubación (35-37°C)
- **Material Biológico:**
 - Placas de Agar Nutritivo o Agar Soya Tripticaseína (preparadas en Práctica 2)
- **Material General:**
 - Marcador indeleble
 - Jabón para manos y toallas de papel

Procedimiento:

1. **Rotulación:** Tomar una placa de agar y, con un marcador, dividir la base en dos mitades, etiquetando una como "Antes" y la otra como "Después".
2. **Muestreo "Antes":** Presionar suavemente las yemas de los cuatro dedos (índice a meñique) sobre la superficie del agar en la mitad correspondiente a "Antes". Asegurarse de que el contacto sea firme pero breve.

3. **Lavado de Manos:** Proceder a lavarse las manos siguiendo la técnica recomendada por la OMS (humedecer, enjabonar, frotar palmas, dorsos, entre los dedos, pulgares, uñas y muñecas por al menos 20 segundos). Secar con toallas de papel.
4. **Muestreo "Después":** Repetir el paso 2, presionando las yemas de los mismos dedos, ahora limpios, sobre la mitad de la placa marcada como "Después".
5. **Incubación:** Incubar la placa en posición invertida a 37°C durante 24 a 48 horas.
6. **Observación:** Pasado el tiempo de incubación, observar y comparar la cantidad y diversidad de colonias que crecieron en ambas mitades de la placa.

Resultados esperados: Se espera observar un crecimiento abundante y diverso en la mitad "Antes" y un crecimiento nulo o significativamente reducido en la mitad "Después", demostrando la eficacia del lavado de manos.

Cuestionario:

1. ¿Qué tipos de microorganismos forman parte de la microbiota normal de la piel?
2. ¿Qué patógeno de transmisión alimentaria se asocia comúnmente con los manipuladores de alimentos?
3. Además del lavado de manos, ¿qué otras 3 buenas prácticas de higiene personal debe seguir un manipulador de alimentos?
4. ¿Por qué el resultado en la sección "Después" podría no ser de cero colonias?
5. Describa una situación en una cocina donde una mala higiene de manos podría provocar una contaminación cruzada.

Bibliografía:

- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2009). *Guía de la OMS sobre Higiene de Manos en la Atención de la Salud*.

PRÁCTICA 5

Evaluación de la Carga Microbiana Ambiental y de Superficies

Fundamento: Los microorganismos son ubicuos; se encuentran en el aire, en el agua y en todas las superficies que nos rodean. En un entorno de procesamiento de alimentos, estas fuentes ambientales pueden convertirse en puntos críticos de contaminación. Evaluar la carga microbiana de superficies y del aire permite monitorear la eficacia de los programas de limpieza y desinfección y detectar focos de contaminación potencial.

Competencia a desarrollar: Evalúa los riesgos asociados a la contaminación microbiana reconociendo fuentes ambientales y superficies como vehículos de transmisión.

Objetivos:

- Evidenciar la presencia de microorganismos en el ambiente (aire) y en superficies de uso común (fómites).
- Comprender la importancia de la limpieza y desinfección en la prevención de la contaminación cruzada.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Estufa de incubación (35-37°C)
- **Material Biológico:**
 - Placas de Agar Nutritivo o Agar Soya Trypticaseína (2 por estudiante/equipo)
- **Material General:**
 - Hisopos de algodón estériles
 - Marcador indeleble

Procedimiento:

1. **Muestreo Ambiental (Aire):**
 - Tomar una placa de agar y rotularla como "Ambiente" y el lugar específico (ej. "Laboratorio", "Pasillo").
 - Colocar la placa en el lugar elegido y retirar la tapa completamente, dejando la superficie del agar expuesta al aire durante 15 minutos.
 - Pasado el tiempo, volver a tapar la placa.

2. **Muestreo de Superficie (Fómite):**

- Tomar la segunda placa y rotularla como "Superficie" y el objeto a muestrear (ej. "Celular", "Mesa", "Manija").
 - Humedecer ligeramente la punta de un hisopo estéril con agua peptonada estéril (si está disponible) o simplemente usarlo seco.
 - Frotar el hisopo firmemente sobre un área definida de la superficie elegida.
 - Inmediatamente, frotar el hisopo sobre toda la superficie de la placa de agar, girándolo para asegurar que toda la punta entre en contacto con el medio.
 - Desechar el hisopo en el contenedor de RPBI.
3. **Incubación:** Incubar ambas placas en posición invertida a 37°C durante 24-48 horas, o a temperatura ambiente por más tiempo para favorecer el crecimiento de hongos ambientales.
4. **Observación:** Observar y comparar la cantidad y, sobre todo, la diversidad de morfologías coloniales (diferentes colores, formas, texturas) en ambas placas.

Resultados esperados: Se espera observar crecimiento en ambas placas. La placa de ambiente probablemente mostrará colonias de hongos (aspecto algodonoso) y bacterias. La placa de superficie reflejará la microbiota específica del fómite muestreado.

Cuestionario:

1. ¿Qué es un fómite y por qué es importante en la microbiología de alimentos?
2. ¿Qué diferencias morfológicas principales observó entre las colonias de la placa de ambiente y la de superficie?
3. ¿Qué tipo de microorganismos (bacterias, hongos, levaduras) espera encontrar predominantemente en el aire?
4. Si esta práctica se realizara en un en una zona de preparación de alimentos, ¿qué resultados esperaría obtener? ¿Por qué?
5. Proponga un plan de muestreo simple (3 puntos críticos) para monitorear la higiene de una pequeña cafetería.

Bibliografía:

- Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., & Hill, C. (Eds.). (2019). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (5th ed.). ASM Press. (Chapter 25: Food Processing Plant Sanitation).

PRÁCTICA 6

Efecto de Factores Intrínsecos (pH) sobre el Crecimiento Microbiano

Fundamento: El crecimiento microbiano en los alimentos no es aleatorio; está gobernado por una serie de factores inherentes al propio alimento (intrínsecos) y a su entorno (extrínsecos). El pH es uno de los factores intrínsecos más importantes, ya que la mayoría de los microorganismos solo pueden crecer en un rango de pH estrecho. La industria alimentaria manipula el pH (acidificación) como uno de los métodos de conservación más antiguos y efectivos.

Competencia a desarrollar: Analiza cómo los factores intrínsecos modulan el crecimiento microbiano para predecir el impacto de diferentes procesos de conservación.

Objetivos:

- Observar cualitativamente cómo el pH del medio afecta la capacidad de crecimiento de una bacteria.
- Relacionar el concepto de pH con su aplicación como método de conservación en alimentos.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Potenciómetro (pH-metro)
 - Estufa de incubación (35-37°C)
 - Vortex
- **Material de Vidrio:**
 - Tubos de ensaye con taparroscas (16x150)
 - Pipetas graduadas estériles de 5 mL
 - Vasos de precipitado
- **Reactivos:**
 - Caldo Nutritivo (o Agar Nutritivo sin el agar)
 - Soluciones de HCl 0.1N y NaOH 0.1N
 - Soluciones buffer de calibración para pH-metro (pH 4, 7, 10)

- **Material Biológico:**
 - Cultivo de *E. coli* en caldo o una colonia aislada.
- **Material General:**
 - Asa de siembra bacteriológica
 - Mechero Bunsen
 - Gradillas

Procedimiento:

1. **Preparación de Medios:** Preparar 100 mL de Caldo Nutritivo. Dividirlo en 3 alícuotas de 30 mL en vasos de precipitado.
2. **Ajuste de pH:** Calibrar el potenciómetro.
 - Dejar un vaso como control (pH cercano a 7).
 - En otro vaso, añadir gota a gota HCl 0.1N hasta alcanzar un pH de 4.0.
 - En el tercer vaso, añadir gota a gota NaOH 0.1N hasta alcanzar un pH de 9.0.
3. **Dispensación y Esterilización:** Dispensar 5 mL de cada caldo (pH 4, 7 y 9) en tubos de ensaye rotulados. Esterilizar los tubos en el autoclave.
4. **Inoculación:** Una vez que los tubos estén a temperatura ambiente, y trabajando en condiciones de asepsia, inocular cada tubo con una asada del cultivo de *E. coli*. Dejar un tubo de cada pH sin inocular como control negativo (blanco).
5. **Incubación:** Incubar todos los tubos a 37°C durante 24-48 horas.
6. **Observación:** Observar la turbidez en los tubos. La turbidez es un indicador visual del crecimiento bacteriano. Comparar la turbidez de los tubos inoculados a diferentes pH contra sus respectivos blancos.

Resultados esperados: Se espera una turbidez máxima en el tubo con pH 7 (óptimo para *E. coli*), y una turbidez muy reducida o nula en los tubos con pH 4 y pH 9, demostrando el efecto inhibitorio de los pH extremos.

Cuestionario:

1. ¿Qué es un alimento de baja acidez y por qué es de mayor riesgo microbiológico que un alimento ácido?
2. Mencione 3 alimentos que basen su conservación en un pH bajo.

3. ¿Qué es la "actividad de agua" (A_w) y cómo se relaciona con el pH en la conservación de alimentos (tecnología de barreras)?
4. ¿Las levaduras y los mohos son generalmente más o menos tolerantes a los pH ácidos que las bacterias?
5. ¿Cómo podría modificarse esta práctica para obtener resultados cuantitativos en lugar de cualitativos?

Bibliografía:

- Hernández Urzúa, M. A. (2023). *Microbiología de los Alimentos: Fundamentos y aplicaciones en Ciencias de la Salud* (2ª ed.). Editorial Médica Panamericana. (Capítulo 3: Factores que afectan el desarrollo microbiano).

PRÁCTICA 7: Técnicas de Siembra, Aislamiento y Morfología Macroscópica

Fundamento: En la naturaleza y en los alimentos, los microorganismos raramente se encuentran como especies únicas; existen como poblaciones mixtas. La técnica de siembra por estría cruzada es un procedimiento fundamental que permite diluir mecánicamente una muestra sobre la superficie de un agar para obtener colonias individuales. Cada colonia, idealmente, surge de una sola célula, formando un cultivo puro. La observación de las características de estas colonias (morfología macroscópica) es el primer paso en el proceso de identificación.

Competencia a desarrollar: Aplica técnicas de cultivo para el aislamiento de microorganismos y analiza sus características macroscópicas como paso inicial para su identificación.

Objetivos:

- Aplicar la técnica de siembra por estría cruzada para obtener colonias aisladas a partir de un cultivo.
- Describir la morfología de las colonias (forma, tamaño, color, borde, elevación) de *E. coli* y *S. aureus*.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Estufa de incubación (35-37°C)
 - Mechero Bunsen
- **Material Biológico:**
 - Cultivos puros de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (en tubo o placa).
 - Placas de Agar Nutritivo o Agar Soya Trypticaseína.
- **Material General:**
 - Asa de siembra bacteriológica .
 - Marcador indeleble.

Procedimiento:

1. **Rotulación:** Rotular dos placas de agar, una para *E. coli* y otra para *S. aureus*.
2. **Esterilización del Asa:** Esterilizar el asa de siembra en la flama del mechero hasta que se ponga al rojo vivo. Dejar enfriar cerca de la flama.
3. **Toma del Inóculo:** Con el asa ya fría, tomar una pequeña cantidad del cultivo bacteriano.
4. **Siembra por Estría Cruzada:**
 - Abrir la placa de agar lo mínimo indispensable, cerca de la flama.

- **Primer Estríado:** Descargar el inóculo en un área pequeña de la placa, realizando estrías juntas.
 - **Segundo Estríado:** Volver a esterilizar y enfriar el asa. Girar la placa 90°. Tocar una sola vez el final del primer estríado y extenderlo sobre el segundo cuadrante.
 - **Tercer y Cuarto Estríado:** Repetir el proceso, girando la placa y esterilizando el asa cada vez, para los cuadrantes 3 y 4. La última estría debe ser una línea ondulada hacia el centro de la placa.
5. **Repetición:** Repetir todo el proceso en la segunda placa con la otra bacteria.
 6. **Incubación:** Incubar las placas en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
 7. **Observación Macroscópica:** Observar las placas, verificando la obtención de colonias aisladas en el tercer o cuarto cuadrante. Describir detalladamente la morfología de las colonias para cada bacteria (forma, tamaño en mm, color, tipo de borde, elevación, consistencia).

Resultados esperados: El estudiante obtendrá placas con crecimiento bacteriano donde se observen colonias perfectamente aisladas. Será capaz de diferenciar macroscópicamente las colonias de *E. coli* (generalmente blancas, cremosas, bordes regulares) de las de *S. aureus* (a menudo de color amarillo-dorado, lisas y brillantes).

Cuestionario:

1. ¿Por qué es fundamental obtener colonias aisladas antes de realizar cualquier prueba de identificación?
2. Dibuje un esquema de su placa de *S. aureus*, señalando los 4 cuadrantes del estríado y la zona de aislamiento.
3. ¿Qué significa el término "cultivo puro"?
4. Si en su placa de *E. coli* observa dos tipos de colonias morfológicamente distintas, ¿qué podría haber ocurrido?
5. Investigue y describa la morfología colonial de *Salmonella* en un agar selectivo como el Agar XLD.

Bibliografía:

- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Introducción a la microbiología* (12ª ed.). Editorial Médica Panamericana. (Capítulo 6: Crecimiento microbiano).

PRÁCTICA 8

Morfología Microscópica: Tinción de Gram

Fundamento: La Tinción de Gram, desarrollada en 1884, sigue siendo la técnica de tinción diferencial más importante en bacteriología. Permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos (Gram positivas y Gram negativas) basándose en las diferencias estructurales de su pared celular. Esta información, combinada con la morfología celular (forma y agrupación), es un paso crítico y rápido en la identificación presuntiva de un aislado bacteriano.

Competencia a desarrollar: Analiza las características morfológicas microscópicas de los microorganismos, aplicando técnicas de tinción diferencial para su clasificación básica.

Objetivos:

- Realizar correctamente la técnica de tinción de Gram.
- Observar la morfología celular (cocos, bacilos) y la reacción a la tinción de Gram utilizando el microscopio óptico con el objetivo de inmersión.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Microscopio óptico con objetivo de inmersión (100x)
 - Mechero Bunsen
- **Material de Vidrio:**
 - Portaobjetos
- **Reactivos:**
 - Kit de Tinción de Gram: Cristal violeta, Lugol (mordiente), Alcohol-acetona (decolorante), Safranina (contratinción).
 - Aceite de inmersión.
 - Agua destilada.
- **Material Biológico:**
 - Colonias aisladas de *E. coli* y *S. aureus* de la práctica anterior.
- **Material General:**
 - Asa de siembra
 - Pinzas para portaobjetos

Procedimiento:

1. Preparación del Frotis:

- Colocar una pequeña gota de agua en el centro de un portaobjetos limpio.
- Con un asa estéril, tomar una pequeña porción de una colonia de *S. aureus* y emulsionarla en la gota de agua, extendiéndola para formar una capa fina.
- Dejar secar al aire completamente.
- **Fijación por calor:** Pasar el portaobjetos rápidamente (2-3 veces) por la flama del mechero para fijar las bacterias al vidrio.

2. Tinción:

- Cubrir el frotis con **Cristal Violeta** por 1 minuto. Lavar con agua.
- Cubrir con **Lugol** por 1 minuto. Lavar con agua.
- Decolorar con **Alcohol-acetona**, añadiendo gota a gota hasta que el colorante violeta deje de escurrir (aprox. 10-15 segundos). Lavar inmediatamente con agua. **Este es el paso crítico.**
- Cubrir con la contratinción, **Safranina**, por 30-45 segundos. Lavar con agua y secar al aire.

3. Observación Microscópica:

- Colocar una gota de aceite de inmersión sobre el frotis teñido.
- Observar al microscopio con el objetivo de 100x. Identificar el color (violeta para Gram positivos, rosa/rojo para Gram negativos), la forma (cocos o bacilos) y la agrupación (cadenas, racimos, etc.).

4. Repetición: Repetir todo el proceso con una muestra de *E. coli*.

Resultados esperados: El estudiante observará *Staphylococcus aureus* como cocos (esferas) de color violeta, agrupados en racimos (Gram positivos). Observará *Escherichia coli* como bacilos (bastones) cortos de color rosa/rojo (Gram negativos).

Cuestionario:

1. ¿Cuál es el componente de la pared celular bacteriana responsable de la retención del cristal violeta en las bacterias Gram positivas?
2. ¿Qué ocurriría si omite el paso del Lugol?
3. ¿Qué observaría si decolora por demasiado tiempo una muestra de *S. aureus*?

4. Dibuje lo que observó al microscopio para ambas bacterias, indicando todas sus características.
5. Además de la morfología y el Gram, ¿qué prueba bioquímica sencilla permite diferenciar a los *Staphylococcus* de los *Streptococcus*?

Bibliografía:

- Kit de Tinción de Gram (inserto del fabricante).
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2017). *Introducción a la microbiología* (12ª ed.). Editorial Médica Panamericana. (Capítulo 3: Observación de microorganismos a través del microscopio).

PRÁCTICA 9

Cuantificación de Microorganismos (Recuento en Placa)

Fundamento: Determinar la cantidad de microorganismos en un alimento es fundamental para evaluar su calidad sanitaria, su vida útil y el cumplimiento de las normativas. El método de recuento en placa es la técnica estándar para cuantificar bacterias viables. Se basa en sembrar un volumen conocido de una dilución de la muestra en un medio de cultivo y asumir que cada célula viable dará origen a una colonia visible (Unidad Formadora de Colonias o UFC).

Competencia a desarrollar: Aplica técnicas de enumeración para determinar la carga microbiana de una muestra, interpretando los resultados cuantitativamente.

Objetivos:

- Aplicar la técnica de siembra por extensión en placa para cuantificar microorganismos.
- Aprender a utilizar el contador de colonias para realizar el recuento de UFC.
- Calcular la concentración de microorganismos en una muestra (UFC/g) a partir del recuento en placa y el factor de dilución.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Estufa de incubación (35-37°C)
 - Contador de colonias
 - Micropipetas automáticas (100-1000 µL) y/o pipetas de 1 mL
- **Material de Vidrio:**
 - Varilla de vidrio en forma de L ("asa de Drigalsky")
- **Material Biológico:**
 - Diluciones de la muestra de alimento preparadas en la Práctica 3.
 - Placas de Agar Nutritivo o Agar Soya Trypticaseína.
- **Material General:**
 - Puntas estériles para micropipeta
 - Vaso de precipitado con etanol
 - Mechero Bunsen

Procedimiento:

1. **Preparación:** Rotular las placas de agar con el número de la muestra y la dilución a sembrar (ej. 10^{-2} , 10^{-3}). Se recomienda sembrar por duplicado si hay suficientes placas.
2. **Siembra por Extensión:**
 - Tomar 0.1 mL (100 μ L) de la dilución 10^{-2} y dispensarlo en el centro de la placa correspondiente.
 - Esterilizar la varilla de Drigalsky pasándola por etanol y flameándola brevemente en el mechero (¡cuidado!). Dejar enfriar.
 - Utilizar la varilla fría para extender el inóculo por toda la superficie del agar, girando la placa para asegurar una distribución uniforme.
 - Repetir el proceso para la dilución 10^{-3} .
3. **Incubación:** Dejar que las placas se sequen por unos minutos e incubarlas en posición invertida a 37°C durante 24-48 horas.
4. **Recuento de Colonias:**
 - Seleccionar las placas que tengan entre 25 y 250 colonias para el recuento. Placas con más de 250 se reportan como "Incontables" y con menos de 25 como "No contables para reporte".
 - Colocar la placa seleccionada en el contador de colonias y marcar cada colonia contada. Registrar el número.
5. **Cálculo:** Utilizar la siguiente fórmula para calcular la concentración en la muestra original:
 $\text{UFC/g} = (\text{Número de colonias contadas}) / (\text{Volumen sembrado en mL} \times \text{Factor de dilución})$
Nota: El factor de dilución es el valor numérico, no el exponente (ej. para 10^{-2} , el factor es 1/100 o 0.01).

Resultados esperados: El estudiante obtendrá un valor numérico que representa la carga microbiana del alimento analizado, expresado en Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g).

Cuestionario:

1. ¿Por qué el rango ideal para el recuento es de 25 a 250 colonias?
2. Si sembró 0.1 mL de la dilución 10^{-2} y contó 150 colonias, ¿cuál es la concentración en UFC/g?

3. ¿Qué tipo de microorganismos está cuantificando con el Agar Nutritivo? ¿Es un recuento total o selectivo?
4. Investigue la técnica de siembra por vertido en placa (pour plate) y mencione una ventaja y una desventaja respecto a la siembra por extensión.
5. Según la NOM-130-SSA1-1995 para jamón cocido, el límite máximo para bacterias mesófilas aerobias es de 100,000 UFC/g. ¿Su resultado (si analizó jamón) cumple con la norma?

Bibliografía:

- NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.

PRÁCTICA 10

Proyecto Aplicado - Evaluación de un Método de Control Microbiano

Fundamento: El objetivo final de la microbiología de alimentos es el control. Basado en el conocimiento de las fuentes de contaminación y los factores que afectan el crecimiento, se diseñan intervenciones para reducir la carga microbiana y garantizar la inocuidad. Este proyecto integrador permite al estudiante actuar como un profesional: identificar un problema, proponer una solución (un método de control) y evaluar su eficacia de manera experimental.

Competencia a desarrollar: Fundamenta la selección de estrategias de control microbiano, evaluando experimentalmente la efectividad de una intervención de mejora e integrando las competencias del curso en un proyecto aplicado.

Objetivos:

- Diseñar y ejecutar un experimento sencillo para evaluar la efectividad de un método de control.
- Integrar las técnicas de siembra, recuento e interpretación de resultados para responder una pregunta de investigación.

Material, Equipo y Reactivos:

- **Equipo de Laboratorio:**
 - Estufa de incubación (35-37°C)
 - (El necesario según el diseño experimental del equipo y la disponibilidad)
- **Material Biológico:**
 - Placas de Agar Nutritivo
- **Muestras y Reactivos:**
 - A definir por cada equipo según su proyecto (ej. hortalizas, superficies, leche; desinfectantes comerciales, vinagre, hipoclorito, etc.)
- **Material General:**
 - El necesario para aplicar la intervención (recipientes, cronómetro, etc.)

Procedimiento:

1. Fase de Diseño (Fuera de la sesión práctica):

- En equipos, definir una pregunta de investigación. Ej: "¿El desinfectante A es más efectivo que el B para lechuga?", "¿La pasteurización casera reduce eficazmente la carga bacteriana de la leche cruda?".
- Plantear una hipótesis.
- Diseñar una metodología simple que incluya un control (sin tratamiento), el tratamiento a evaluar y un método para medir el resultado (ej. siembra por impronta o por hisopado antes y después del tratamiento).
- Presentar la propuesta al profesor para su aprobación.

2. Fase Experimental (En el laboratorio):

- Cada equipo trae sus materiales específicos (verduras, desinfectantes, etc.).
- Ejecutar el experimento diseñado, aplicando las técnicas de asepsia y siembra aprendidas en prácticas anteriores.
- Incubar las placas en las condiciones adecuadas.

3. Fase de Análisis y Comunicación:

- Observar los resultados (comparar el crecimiento entre el control y el tratamiento). Si es posible, cuantificar las colonias.
- Discutir los resultados en equipo: ¿Se comprobó la hipótesis? ¿Por qué? ¿Cuáles fueron las limitaciones?
- Elaborar un reporte final y/o una presentación con los hallazgos.

Resultados esperados: Cada equipo obtendrá evidencia experimental sobre la eficacia del método de control que evaluó. El resultado principal es la capacidad de integrar conocimientos y habilidades para resolver un problema práctico de inocuidad.

Evidencia de la Práctica: Reporte final del proyecto con la estructura de un informe científico (Introducción, Hipótesis, Metodología, Resultados, Discusión, Conclusión) y/o una presentación oral al grupo.

Cuestionario:

1. ¿Cuál fue la variable independiente y la variable dependiente en su experimento?
2. ¿Qué limitaciones tuvo su diseño experimental y cómo podrían mejorarse en un futuro estudio?
3. ¿Cómo se aplican los "factores extrínsecos" en el método de control que evaluó?
4. Basado en sus resultados, ¿qué recomendación práctica le daría a un consumidor o a un pequeño servicio de alimentos?
5. ¿Cómo este proyecto integra al menos 4 de las prácticas anteriores de este manual?

Bibliografía:

- A definir por cada equipo según el tema de su proyecto.

