



SEP
SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mazatlán

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MAZATLÁN

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOQUÍMICA

MANUAL DE PRÁCTICAS MICROBIOLOGÍA DE ALIMENTOS MARINOS

MC. IRMA LORENA SÁNCHEZ HUMARÁN

DICTAMEN No. AS-1-115/2019

MAZATLÁN, SINALOA, A 20 DE ENERO 2020



C. Corsario I No. 203, Colonia Urías, C.P. 82070; Mazatlán, Sinaloa.
Tels. (669)983-84-00, 990-02-09, 991-10-61,
e-mail: dirección@itmazatlan.edu.mx
www.itmazatlan.edu.mx



AGRADECIMIENTOS

La validación de este manual fue posible gracias a la acertada decisión del Instituto Tecnológico de Mazatlán, de incluir en los planes de estudio de la Carrera de Ingeniería Bioquímica, un curso de Microbiología de Alimentos Marinos para los estudiantes de séptimo semestre. Expreso mi agradecimiento al Director General del Tecnológico Nacional de México, a la Secretaria Académica de Investigación e Innovación del Tecnológico Nacional de México, al Director del Instituto Tecnológico de Mazatlán, al Subdirector del Instituto Tecnológico de Mazatlán, a la Jefa del Departamento de Desarrollo Académico, al Jefe del Departamento de Ing. Química y Bioquímica, así como a otras autoridades por su apoyo por permitirme validar e implementar el programa y adaptar los materiales, equipos y reactivos a las necesidades de los estudiantes de la institución.

Quiero destacar la colaboración de los profesores de la Carrera de Ingeniería Bioquímica que imparten la materia de Microbiología de Alimentos Marinos en el Tecnológico Nacional de México en sus diferentes campus y que contribuyeron a validar las unidades de estudio del programa.





INDICE

	Página
Indice	iii
Indice de figuras	iv
Indice de tablas	viii
Introducción	ix
Objetivo general del manual	xii
Justificación	xiii
Utilidad del manual	xiv
Medidas de seguridad e higiene	xv
Primeros auxilios en el laboratorio	xviii
Práctica No. 1. Métodos para estimar el contenido microbiano	1
Práctica No. 2. Recuento de organismos mesofilos aerobios	23
Práctica No. 3. Analisis microbiologico del agua de mar	35
Práctica No. 4. Recuento de organismos coliformes	51
Práctica No. 5. Recuento de organismos enterococos	65
Práctica No. 6. Recuento de <i>Bacillus cereus</i> en alimentos marinos	78
Práctica No. 7. Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en alimentos marinos .	93
Práctica No. 8. Identificacion de <i>Vibrio cholerae</i> en alimentos marinos	106
Práctica No. 9. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos.	119
Práctica No. 10. Recuento de hongos y levaduras en alimentos.	133
Práctica No. 11. Recuento de <i>Salmonella</i> en alimentos marinos.	146
Práctica No. 12. Identificación de <i>Shigella</i> en alimentos marinos	159
Práctica No. 13. Análisis microbiológico de alimentos marinos envasados	171
Práctica No. 14. Analisis bacteriologico del equipo para controlar la eficiencia del saniamiento.	193
Práctica No. 15. Evaluacion de la actividad de un desinfectante	207



INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Desarrollo colonial por vaciado en placa	15
Figura 2. Vista interior del microscopio durante el conteo directo	16
Figura 3. Conteo directo de microorganismos	16
Figura 4. Diluciones de la muestra	17
Figura 5. Desarrollo colonial tecnica demiles y misra	17
Figura 6. Diluciones	18
Figura 7. Siembra de la muestra por extensión en superficie	18
Figura 8. Resultados caldo lactosado: A) Formación de burbuja en tubo 10^{-1} , B) Formación de burbuja en tubo 10^{-2} y C) Formación de burbuja en tubo 10^{-3}	19
Figura 9. Resiembra en caldo verde brillante	20
Figura 10. Incorporación de Azul de metileno a la muestra	20
Figura 11. Resultado final	20
Figura 12. Diagrama de flujo metodo para la cuenta de bacterias aerobias en placa (NOM-092-SSA1-1994).....	29
Figura 13. Muestra de Patas de mula	31
Figura 14 Elaboración de dilución de la muestra de Patas de mula	31
Figura 15. Siembra de la muestra	32
Figura 16. Siembra en Agar para método estándar	32
Figura 17. Desarrollo colonial en agar para método estándar	32
Figura 18. Preparación de diluciones para serie A	32
Figura 19. Desarrollo colonial en caja serie A.....	32
Figura 20. Desarrollo colonial en caja serie B	32
Figura 21. Diagrama de flujo para la determinación de Bacterias Coliformes por la técnica del NMP (NOM-112-SSA1-1994)	43
Figura 22. Toma de las muestras de agua de mar	45
Figura 23. Siembra de las muestras de agua de mar	45
Figura 24. Desarrollo colonial Mesófilos aerobios	45
Figura 25. Tubos caldo lactosado	45
Figura 26. Siembra en caldo bilis.....	45
Figura 27. Caldo bilis positivo	45
Figura 28. Desarrollo colonial agar EMB	45
Figura 29. Tinción Gram	47
Figura 30. Bacilos Gram (-) (<i>E. coli</i>).	47

Figura 31. Bacilos Gram (-), (<i>Klebsiella</i>)	47
Figura 32. Citrato positivo	47
Figura 33. SIM motilidad (+), Indol (-) y H ₂ S	47
Figura 34. Urea (-) negativa.....	47
Figura 35. Diagrama de flujo para determinación de Bacterias Coliformes en placa (NOM-112-SSA1-1994).....	57
Figura 36. Preparacion de la muestra para su analisis	61
Figura 37. Preparacion de diluciones	61
Figura 38. Siembra en placa.....	61
Figura 39. Desarrollo colonial agar bilis rojo violeta.....	62
Figura 40. Bacterias Coliformes NMP. a) Prueba presuntiva b) Prueba confirmativa	62
Figura 41. Coliformes Fecales NMP a) Prueba presuntiva b) Prueba confirmativa.....	62
Figura 42. Diagrama de flujo para el recuento de Enterococos (NOM-210-SSA1-2014)	72
Figura 43. Homogeneización de la muestra	74
Figura 44. Sembrado en placa.....	74
Figura 45. Agar KF estreptocócico	74
Figura 46. Agar BHI	75
Figura 47. Examen microscópico.....	75
Figura 48. Agar bilis esculina.....	75
Figura 49. Crecimiento en NaCl.....	75
Figura 50. Crecimiento en BHI.....	75
Figura 51. Recuento de <i>Bacillus cereus</i> a partir de alimentos (ISO 7932: 2006)..	86
Figura 52. Técnica de aislamiento de <i>Bacillus cereus</i>	88
Figura 53. Muestra de moluscos.....	90
Figura 54. Diluciones de la muestra	90
Figura 55. Desarrollo colonial agar MYP	90
Figura 56. Tinción gram <i>B. cereus</i>	90
Figura 57. Voges- Proskauer	90
Figura 58. Reducción de nitratos a nitritos	90
Figura 59. Diagrama de flujo para determinación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (NOM-031-SSA1-1993).	101
Figura 60. Muestra de camarón.....	103
Figura 61. Dilución de la muestra de camarón	103
Figura 62. Desarrollo colonial agar sangre <i>V. parahaemolyticus</i>	103



Figura 63. String test	103
Figura 64. Diagrama de flujo <i>Vibrio cholerae</i> (NOM-016-SSA2-2012)	114
Figura 65. Preparación muestra de camarón.....	116
Figura 66. Diluciones de la muestra de camarón.....	116
Figura 67. Desarrollo colonial agar sangre <i>V. cholerae</i>	116
Figura 68. Prueba del collar	116
Figura 69. Recuento de <i>S. aureus</i> en alimentos (NOM-115-SSA1-1994)	127
Figura 70. Muestra de camarón blanco en SRFT	129
Figura 71. Siembra de muestra de camarón.....	129
Figura 72. Desarrollo colonial en Agar Baird Parker.....	129
Figura 73. Prueba coagulasa.....	130
Figura 74. Prueba termonucleasa positiva.....	130
Figura 75. Tinción gram cocos en forma de racimo de uvas Gram (+)	130
Figura 76. Diagrama de flujo hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).	140
Figura 77. Estructuración de la muestra	142
Figura 78. Preparación de agar papa dextrosa.....	142
Figura 79. Vaciado de agar papa dextrosa	142
Figura 80. Desarrollo de hongos en camarón blanco.....	142
Figura 81. Desarrollo de hongos en pez cochito.....	142
Figura 82. Desarrollo de hongos en patas de mula	142
Figura 83. Desarrollo de levaduras en camarón blanco	143
Figura 84. Desarrollo de levaduras en pez cochito.....	143
Figura 85. Desarrollo de levaduras en patas de mula	143
Figura 86. Investigación de <i>Salmonella</i> en alimentos (NOM-114-SSA1-1994).	153
Figura 87. Muestra para <i>Salmonella</i>	156
Figura 88. Caldo selenito cistina.....	156
Figura 89. Caldo tetracionato	156
Figura 90. Agar TSI	156
Figura 91. Agar LIA	156
Figura 92. Investigación de <i>Shigella</i> en alimentos (NOM-210-SSA1-1994)	166
Figura 93. Preparación muestra de camarón blanco	168
Figura 94. Sembrado muestra de camarón	168
Figura 95. Desarrollo colonial agar Mac Conkey.....	168
Figura 96. Desarrollo colonial agar XLD	168
Figura 97. Desarrollo colonial agar entérico de hektoen.....	168
Figura 98. a) <i>Shigella</i> en TSI, b) <i>Shigella</i> en LIA	168



Figura 99. Examinar la lata e identificarla.....	179
Figura 100. Lavar con agua y detergente	179
Figura 101. Expulsion de gas	179
Figura 102. Desinfectar de 10-15 minutos.....	179
Figura 103. Abrelatas sanitario	180
Figura 104. Abrir la lata	180
Figura 105. Análisis de alimentos enlatados con PH 4.5 o mayor	182
Figura 106. Análisis de alimentos enlatados con PH menor a 4.5	183
Figura 107. Lata de atún Tuny.....	188
Figura 108. Lavado de latas	190
Figura 109. Desinfección de latas	190
Figura 110. Apertura de latas	190
Figura 111. Análisis de las muestras	190
Figura 112. Recuento de microorganismos para controlar la eficacia del saneamiento (NOM-244-SSA1-2016).....	183
Figura 113. Toma de muestra de superficie sucia mediante método del hisopo	203
Figura 114. Desarrollo colonial mesófilos (superficie sucia)	203
Figura 115. Desarrollo colonial coliformes (superficie sucia).....	203
Figura 116. Desarrollo colonial <i>Enterococos</i> (superficie sucia)	203
Figura 117. Toma de muestra de superficie limpia	203
Figura 118. Desarrollo colonial mesófilos (superficie limpia)	203
Figura 119. Desarrollo colonial coliformes (superficie limpia)	204
Figura 120. Desarrollo colonial <i>Enterococos</i> (superficie limpia)	204
Figura 121. Toma de muestra de superficie sucia mediante método del hisopo	215
Figura 122. Desarrollo colonial mesófilos (lechuga sucia).....	215
Figura 123. Desarrollo colonial coliformes (lechuga sucia).....	215
Figura 124. Desarrollo colonial <i>Enterococos</i> (lechuga sucia)	215
Figura 125. Toma de muestra de lechuga lavada.....	215
Figura 126. Desarrollo colonial mesófilos (lechuga lavada).....	215
Figura 127. Desarrollo colonial coliformes (lechuga lavada).....	215
Figura 128. Desarrollo colonial enterococos (lechuga lavada)	215

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Número Más Probable(NMP)	12
Tabla 2. Prueba de Reductasa.....	13
Tabla 3. Cuenta de colonias por vaciado en placa (UFC/mL)	15
Tabla 4. Cuenta microscopica directa	16
Tabla 5. Resultados técnica número más probable	19
Tabla 6. Resultados de la Serie A y serie B	33
Tabla 7. Descripción y características de colonias desarrolladas en agar EMB ...	46
Tabla 8. Resultados Pruebas Bioquímicas.....	48
Tabla 9. Número Más Probable (NMP) de Bacilos Coliformes por 100 mL de muestra, utilizando 5 tubos de 10, 1 y 0.1 en volumen.....	49
Tabla 10. Recuento de organismos coliformes (OC) y de organismos coliformes fecales (OCF)	62
Tabla 11. Resultados <i>Enterococos</i>	74
Tabla 12. Recuento de <i>Bacillus cereus</i>	91
Tabla 13. Diferenciación bioquímica entre <i>V. parahaemolyticus</i> y otras bacterias	100
Tabla 14. Diferenciación bioquímica entre <i>V. cholerae</i> y otras bacterias	113
Tabla 15. Colonias sospechosas de <i>S. aureus</i>	128
Tabla 16. Prueba de Coagulasa y Termonucleasa para colonias de <i>S. aureus</i> . ..	130
Tabla 17. Cuantificación de hongos y levaduras en las muestras.....	143
Tabla 18. Resultados pruebas bioquímicas.	157
Tabla 19. Características de colonias en muestras de camarón blanco	169
Tabla 20. Clasificación de los grados de abombamiento	178
Tabla 21. Especificaciones y características de lata de atún	189
Tabla 22. Análisis microbiológico de alimentos envasados	191
Tabla 23. Recuento de microorganismos para controlar la eficacia del saneamiento	204
Tabla 24. Especificaciones a seguir para evaluar calidad de desinfectante	213
Tabla 25. Evaluación de la calidad de un desinfectante	216



INTRODUCCION

El estudio de los agentes infecciosos que pueden ser patógenos para el hombre, los animales u otras formas de vida comparten riesgos que varían según el agente infeccioso y los procedimientos utilizados. Las normas de seguridad biológica pretenden reducir a un nivel aceptable el riesgo inherente a la manipulación del material peligroso, siendo muy rigurosas para los agentes más peligrosos y menos exigentes para los que causan problemas de menor entidad. Deben ser consideradas como compromisos destinados a conseguir que las personas que trabajan con agentes infecciosos en el Laboratorio de Microbiología estén expuestas al mínimo riesgo posible, pero también para los visitantes e incluso para la comunidad.

Por otra parte, el personal del Laboratorio de Microbiología está expuesto a riesgos no biológicos (químicos y físicos) comunes a otros laboratorios. Entre las personas ajenas al Laboratorio de Microbiología, e incluso entre los trabajadores, existe la percepción muy extendida de que el riesgo más importante es el biológico, cuando la experiencia y las estadísticas demuestran que los accidentes más frecuentes son los físicos y los químicos. Por lo tanto, es fundamental que las personas que trabajan allí sean conscientes de cuáles son los peligros reales, tanto en la parte teórica como en la práctica. La formación es, pues, 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 de laboratorio: personal técnico y administrativo, de mantenimiento, de limpieza, etc.





Los alimentos son susceptibles a ser contaminados por microorganismos que se multiplican fácilmente en éste, lo cual implica una alteración en sus propiedades físicas, químicas y sensoriales, produciéndose alimentos que no son aptos para consumo humano, debido a que en estas condiciones son vía de transmisión de enfermedades tales como infecciones intestinales como intoxicaciones alimenticias.

Por lo antes expuesto, se presentan a continuación algunos lineamientos generales que buscan ayudar al alumno a encontrarse con la microbiología de alimentos experimental de una manera amena, agradable y segura. Guía general para el trabajo en laboratorio y recomendaciones para la elaboración del pre-informe y reporte final. Antes de la realización de cada practica de laboratorio se recomienda realizar una retroalimentación teórica por parte de todos (profesor y alumnos), depende del tema a trabajar. Aplicar preguntas orales o exámenes cortos sin previo aviso de los conocimientos que debe poseer el estudiante para determinada práctica de laboratorio y de los aspectos de seguridad y manejo de situaciones de riesgo en el laboratorio. Realizar la retroalimentación, como los exámenes cortos o preguntas orales al comienzo de la práctica de cada semana.

Es responsabilidad del estudiante prepararse para cada sesión, ya que una pobre preparación de dicha práctica es causal de no poder realizar el experimento correspondiente. Cada estudiante debe llevar un cuaderno de notas (que deberá ser llenado con bolígrafo) con todo lo concerniente a la práctica (del punto 1 al 7).





A los ocho días de finalizada una práctica cada grupo de trabajo debe entregar el respectivo reporte final.

1. Fecha de realización de la práctica
2. Nombre de la Práctica
3. Introducción (aspectos teóricos y técnicas a emplear)
4. Objetivos.
5. Manera de preparación de los reactivos y sustancias relacionados con la práctica.
6. Aspectos de seguridad de la manipulación de reactivos y productos relacionados con la práctica.
7. Procedimiento a seguir (preferiblemente en forma de esquema).
8. Datos, resultados y observaciones.
9. Discusión de resultados y conclusiones
10. Bibliografía consultada





OBJETIVO GENERAL DEL MANUAL

El conjunto de prácticas de laboratorio que se presentan a continuación constituye el resultado de una cuidadosa selección que se realizó entre las diversas prácticas posibles que se pueden encontrar en la literatura científica disponible. Cada práctica fue inicialmente comprobada por el autor junto con los alumnos de séptimo semestre en la materia Microbiología de Alimentos Marinos en el Laboratorio de Especialidades. La forma en que se desarrolla cada uno de los experimentos se ajusta, al programa de estudios de la materia de Microbiología de Alimentos Marinos de la Carrera de Ing. Bioquímica del Instituto Tecnológico de Mazatlán en su más reciente reforma académica. Son varios los errores formativos que se han evidenciado en los alumnos que por primera vez asisten a un Laboratorio de Microbiología de este tipo. Sin embargo, también se observa en muchos casos que las expectativas y el interés por aprender a realizar los experimentos y corroborar los conceptos teóricos de la Microbiología de Alimentos Marinos, entre los mismos alumnos, van en significativo aumento.

Es por ello, que en este manual se ha pretendido incluir el mayor número de herramientas posibles, de modo que pueda guiar a los estudiantes de Microbiología hacia una formación sólida y con un alto componente científico. Se debe mencionar que las experiencias aquí reunidas se han adaptado de diversas fuentes bibliográficas, todas ellas de alto nivel académico y pedagógico. La finalidad de este manual, es que sea una herramienta de trabajo y permita que el encuentro de los alumnos con la Microbiología de Alimentos Marinos sea motivador, didáctico, en lo posible correctivo y formativo, buscando estimular la intuición microbiológica en los estudiantes a partir del entrenamiento experimental para seleccionar los métodos adecuados para la detección, cultivo y recuento de los grupos de microorganismos basándose en sus requerimientos nutricionales y metabólicos según las normas oficiales mexicanas.





JUSTIFICACIÓN

El Modelo Educativo para el Siglo XXI: Formación y desarrollo de competencias profesionales orienta el proceso educativo central a la formación de profesionales que impulsen la actividad productiva en cada región del país, la investigación científica, la innovación tecnológica, la transferencia de tecnologías, la creatividad y el emprendedurismo para alcanzar un mayor desarrollo social, económico, cultural y humano. Se debe estar seguros de que los egresados sean aptos para contribuir en la construcción de la sociedad del conocimiento, participar en los espacios comunes de la educación superior tecnológica y asumirse como actores protagónicos del cambio.

Este manual de prácticas aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, de los microorganismos en la producción de alimentos marinos, de los métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, del control de los microorganismos en alimentos marinos, y de esta manera, aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarlo se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de recursos marinos, de los alimentos como sustrato, microorganismos importantes en microbiología, contaminación y alteración de alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.





UTILIDAD DEL MANUAL

Con las actividades prácticas descritas en este manual se guía a los estudiantes para que ellos hagan la elección de los métodos apropiados para el desarrollo de su aprendizaje de manera independiente. El conocimiento y el manejo del lenguaje propio de la disciplina de Microbiología de Alimentos Marinos le permite al estudiante comprender, desarrollar, identificar y seleccionar desde un punto de vista científico, la inocuidad de los alimentos marinos, además de adquirir formas de estudio que se traduzcan en la elaboración de informes de laboratorio, exposiciones, e interpretar con su propio lenguaje los planteamientos utilizados en el tratamiento del objeto de estudio.

Las actividades integradoras del conocimiento como actividades prácticas promueven el desarrollo de habilidades para la experimentación a través del método científico; trabajo en equipo; asimismo, propician procesos intelectuales como inducción-deducción y análisis-síntesis con la intención de generar una actividad intelectual compleja; por esta razón varias de las actividades prácticas se han descrito como actividades previas al tratamiento teórico de los temas, de manera que no sean una mera corroboración de lo visto previamente en clase, sino una oportunidad para conceptualizar a partir de lo observado.

El manual de prácticas consiste en la explicación de una serie de criterios de ejecución y reglas prácticas, así como la descripción de procesos o pasos a seguir, para actuar en concordancia. La Microbiología es el espacio de integración teórico-práctico, donde se da la construcción e integración de conocimientos que favorecen la formación y desarrollo de competencias profesionales y la evaluación continua, es una construcción basada en vivencias que permite la articulación entre el pensar, el sentir y el actuar, con un ciclo continuo de acción-reflexión-acción, frente al compromiso social que se adquiere, cuando se elige y ejerce la profesión de Ingeniero Bioquímico.





MEDIDAS DE SEGURIDAD E HIGIENE

Los laboratorios de microbiología constituyen ambientes de trabajo especiales, que pueden presentar riesgos de enfermedades infecciosas para las personas que se encuentren en o cerca de ellos. El trabajo diario en el laboratorio es un trabajo de grupo, en donde la actitud de cada uno de los integrantes ante las prácticas, así como el entrenamiento que posean en las técnicas requeridas para el manejo de material contaminado, determinan su propia seguridad, así como la de sus compañeros y la de la colectividad en general. Es por ello que antes de comenzar con las actividades prácticas, todas las personas involucradas (estudiantes y profesores) están obligados a conocer cuáles son las normas de seguridad a seguir en el laboratorio de manera tal, que el trabajo se realice con un riesgo mínimo de exposición, tanto para las personas que lo ejecutan como para el medio ambiente. Las siguientes reglas básicas serán útiles seguramente en todo momento.

1. Entrar al laboratorio en forma ordenada, dejar las carteras, libros y otros objetos personales en el lugar que se les indique para tal fin.
2. Es imprescindible el uso de bata de seguridad (debe permanecer completamente cerrada), guantes, cubre bocas y cofia
3. Antes de iniciar una práctica lea cuidadosamente toda la información de que disponga en relación con él. Tenga presente cualquier precaución recomendada para su realización. Atienda las indicaciones.
4. Limpiar y desinfectar las superficies de trabajo, antes de comenzar y al finalizar la sesión práctica. Lavar las manos con agua y jabón antes de realizar las actividades programadas, antes de salir del laboratorio y siempre después de manejar materiales que se sabe o se sospecha que son contaminantes.
5. Trabajar cerca del mesón, adoptando una buena postura y estando físicamente cómodo.



6. Llevar un calzado apropiado, preferiblemente cerrado y de suela antideslizante en las áreas de laboratorio.
7. Evitar llevar accesorios al laboratorio que pudieran ser fuente de contaminación (aretes, pulseras, collares, anillos, relojes).
8. Recoger el cabello largo (usar cofia).
9. Evitar desplazamientos innecesarios, movimientos bruscos. Hablar sólo lo indispensable.
10. No comer, beber, fumar, almacenar comida, objetos personales o utensilios, aplicarse cosméticos ni ponerse o quitarse lentes de contacto en ningún área del laboratorio.
11. Conocer el manejo de todos los equipos y reactivos a emplear antes de iniciar las actividades indicadas en la práctica. Si usted tiene alguna duda, diríjase al profesor.
12. Mantener el área de trabajo ordenada, libre de libros, cuadernos u objetos personales, exceptuando aquellos equipos y materiales necesarios para la realización del trabajo práctico.
13. Tener cuidado con el alcohol cuando manipule el mechero. Nunca debe dejar éste desatendido.
14. Regresar los reactivos y equipos empleados (microscopio, mechero, etc.), limpios y de manera ordenada a su respectivo lugar una vez finalizada la actividad. Reporte cualquier daño de los mismos al profesor.
15. Colocar los materiales de vidrio contaminados en los recipientes dispuestos para tal fin, por ejemplo: las pipetas en los pipeteros, tubos y placas de Petri en las ollas de desecho, etc.
16. No usar ningún reactivo que no esté debidamente identificado, verificar las etiquetas de los mismos y estar seguro de cómo emplearlo.
17. No devolver sustancias a sus envases originales.



18. Emplear la propipeta al medir líquidos. Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca. De igual manera las pipetas tendrán tapones de algodón para reducir la contaminación de estos dispositivos de pipeteo.
19. Realizar solamente aquellas actividades indicadas por el profesor, no llevar a cabo experimentos no autorizados.
20. Reportar inmediatamente cualquier accidente al profesor (derrame de material contaminado, heridas, quemaduras, etc.), ninguno puede ser catalogado como menor.
21. Reducir al mínimo la formación de aerosoles durante la realización de cualquier trabajo práctico.
22. Extremar las precauciones cuando se utilicen agujas y jeringas para evitar la inoculación accidental y la generación de aerosoles durante su manipulación y desecho.
23. Emplear técnicas asépticas para el manejo de cultivos de microorganismos.
24. No tire desechos que no sean solubles en agua en el vertedero del laboratorio.
25. Conserve limpio el material, los aparatos y su mesa de trabajo. Limpie inmediatamente cualquier derrame accidental.
26. Antes de abandonar el laboratorio asegúrese de que las llaves de agua y gas estén cerradas.





PRIMEROS AUXILIOS EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

En caso de ocurrir un accidente en el laboratorio, es importante tener en mente unas cuantas reglas básicas, cuya aplicación adecuada, puede ser esencial para prevenir daños mayores a las personas afectadas.

1. Comunique al responsable del laboratorio inmediatamente cualquier accidente, por pequeño que sea.
2. En el laboratorio de Microbiología las emergencias más frecuentes son los derrames de agentes químicos y biológicos y los conatos de incendio.
3. La actuación en este último caso es un proceso complejo que debe estar incluido y ser coherente con el Plan de Emergencia general de cada institución, que puede requerir el aviso a servicios externos y considerar posibles medidas de evacuación.
4. En caso de derrame, el personal del laboratorio debe avisar al personal próximo, detener el derrame lo más pronto posible, y delimitar y aislar la zona.
5. De la misma manera, el laboratorio debe contar con un plan de actuación en caso de accidente, que contenga la información necesaria para la actuación en caso de que se produzca, y debe colocarse en un lugar bien visible.
6. Este plan debe contemplar los siguientes supuestos: a) accidente por contacto; b) accidente por inhalación; c) accidente eléctrico; d) accidente térmico; e) accidente por ingestión, y f) accidente por inoculación o corte.



PRÁCTICA No. 1

MÉTODOS PARA ESTIMAR EL CONTENIDO MICROBIANO

OBJETIVOS

1. Determinar la eficiencia de un proceso de desinfección o de cualquier tipo de tratamiento que tienda a mejorar su calidad a base de reducir la carga microbiana.
2. Determinar la aceptabilidad de un producto en términos del cumplimiento de una norma microbiana.
3. Estimar el grado de peligrosidad de un alimento involucrado en un brote de intoxicación alimentaria de acuerdo con el número de microorganismos potencialmente patógeno que contenga.
4. Determinar el grado de frescura o el posible tiempo de vida de anaquel de un alimento con base al número de microorganismos de algún grupo especial.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.

- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Dentro de los métodos existentes para llevar a cabo el recuento algunos son directos, en el sentido de contar directamente cada microorganismo, este tipo de recuento no permite distinguir las células viables de las células muertas. Otros métodos son indirectos; en ellos el analista no observa directamente al microorganismo, sino algún producto del mismo que guarda relación en su intensidad o abundancia, con los originalmente presentes en el material en estudio. Únicamente participan en la prueba los microorganismos viables y dentro de estos un grupo seleccionado de acuerdo con las condiciones ambientales, la composición del medio de cultivo y otros señalamientos específicos del método aplicado. A este último grupo pertenecen las técnicas de recuento en placa. Existe una gran variedad de tales técnicas, cada una con ventajas y limitaciones sobre



las demás, que el microbiólogo debe conocer a fin de seleccionarlás e interpretarlas correctamente (Medina, 2014).

Uno de los sistemas más importantes para la identificación y recuento de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el Medio de Cultivo, el cual crea condiciones necesarias para el desarrollo y el crecimiento de microorganismos. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano. Por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y Peptona a la que se añadirán otros ingredientes (Brock, 2012).

El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40 grados. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él. La gelatina es otro agente solidificante pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación. En los diferentes medios de cultivo se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como hidratos de carbono, suero, sangre completa, bilis, etc. (Medina, 2014).



Los hidratos de Carbono se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes. También se añaden colorantes que actúan como indicadores para detectar, por ejemplo, la formación de ácido o como inhibidores del crecimiento de unas bacterias y no de otras (el Rojo Fenol se usa como indicador ya que es rojo en pH básico y amarillo en pH ácido. La Violeta de Genciana se usa como inhibidor ya que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gram positivas) (Medina, 2014).

Según García (2015) argumenta que existen los siguientes tipos de medio de Cultivo: Sólidos y líquidos, Medio definido (sintético) y medio complejo, Medio mineral o basal: compuestos inorgánicos, Medio mínimo: medio basal y una fuente de carbono, Medio rico: todos los requerimientos nutritivos, Medio de enriquecimiento, Medio selectivo, Medio diferencial.

De acuerdo con García (2015) la obtención de un cultivo puro, a partir de una población mixta se lleva a cabo en dos etapas:

1. La muestra debe diseminarse de manera tal que los diferentes microorganismos queden lo suficientemente separados sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, de manera que luego de la incubación ellos formen colonias visibles aisladas. Este proceso se conoce como aislamiento. En esta placa tendremos diferentes tipos de colonias correspondientes a los diferentes microorganismos presentes en la población original.
2. Luego de tener las colonias aisladas, éstas deben transferirse con el filamento a un tubo que contenga agar nutritivo estéril para cultivar esa colonia aislada; este procedimiento se conoce como trasplante.



Para garantizar la pureza del cultivo obtenido, es conveniente, a partir de cada tipo de colonia aislada, repetir el proceso de aislamiento antes descrito. Se considerará que se ha obtenido un cultivo puro, cuando al realizar este proceso, todas las colonias obtenidas presenten las mismas características. El medio de cultivo utilizado en el proceso de aislamiento dependerá, entre otros factores, de los requerimientos nutricionales de los microorganismos que se espera aislar y de la presencia de microorganismos que, por sus características y/o por la cantidad en que se encuentren en la muestra, dificulten la obtención del microorganismo objeto del aislamiento. En este último caso, se deben utilizar medios de enriquecimiento y medios selectivos que inhiban el desarrollo de gérmenes contaminantes (Gutiérrez y Pedrique, 2014).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.1 Los alimentos como sustrato de los microorganismos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.



Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

3 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
30 cajas Petri
24 Tubos de ensaye de 16 x 150
10 Pipetas de 1 mL
10 Pipetas de 5 mL
10 Pipetas de 10 mL
1 Balanza analítica
1 Incubadora
1 Asa
1 Varilla de vidrio doblada en ángulo recto

REACTIVOS

6 Muestras de alimento determinado previamente (Leche)
Solución reguladora de fosfato como diluyente
Agar o Medio de cultivo
Caldo lactosado
Caldo verde brillante
Azul de metileno

METODOLOGÍA

Según la NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa

A) Cuenta de colonias por vaciado en placa

1. Homogeneizar cada muestra agitando vigorosamente el recipiente.
2. Transferir 10 mL o gramos a un frasco con 90 mL de diluyente y agitar.
3. Efectuar diluciones usando alícuotas de 1 mL en tubos con 9 mL de diluyente.
4. Al concluir cada dilución, inocular 1 mL de esta en una caja de Petri antes de preparar la siguiente dilución.
5. Agregar a cada caja de Petri aproximadamente 15 mL de medio de cultivo, correspondiente al grupo microbiano en estudio, fundido y mantenido de 43 a 45°C en baño de agua.
6. Inmediatamente incorporar el inóculo al medio mediante 6 movimientos de derecha a izquierda, 6 en el sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante. Evitar el derrame del líquido y su contacto con la cubierta de la caja. El tiempo transcurrido desde la preparación de la primera dilución hasta la incorporación del medio de cultivo a todas las cajas, no excederá de 20 min.
7. Incubar a la temperatura y el tiempo de incubación señalados para el grupo microbiano en estudio.

B) Cuenta microscópica directa

1. Medir el diámetro del campo microscópico con la ayuda de un micrómetro de platina, enfocando con el objetivo de inmersión, con la mayor exactitud hasta la 3ª decimal.
2. Determinar el área del campo microscópico en mm².

a. $A = \pi r^2$

3. Calcular el número de veces que cabe el área del campo microscópico en 1 cm² (expresado en mm: 1 cm²= 100 mm²).

$$a. \frac{1 \text{ cm}^2}{A} = \frac{100 \text{ mm}^2}{\pi r^2}$$

4. Como solamente se extiende 0.01 mL de muestra en 1 cm² y el recuento se expresa por mL, es necesario multiplicar por 100.

$$a. \text{Factor del microscopio} = \frac{100 \text{ mm}^2}{\pi r^2}$$

5. Calcular el factor del microscopio (FM) con la siguiente formula expresando el radio (r) en mm:

$$FM = \frac{10\,000}{3.1416 r^2}$$

La fórmula anterior expresa el número de campos del microscopio que “existen en 1 mL de muestra”. Por ejemplo: para 160 micras de diámetro, el FM es de 500 000. Notar que la presencia, en promedio, de un grupo bacteriano por campo, se traduce en un recuento de 500 000 grupos bacterianos por ml de muestra.

C) Cuenta de colonias por inoculación en superficie

➤ Técnica de Miles y Misra.

1. Vaciar 15 mL del medio de cultivo en cada una de 2 cajas de Petri y dejar solidificar. Colocar las cajas en la incubadora con la tapa ligeramente removida durante unas 3 horas (si se cuenta con incubadora a 50°C, dejarlas durante 2 horas). No utilizar placas conservadas durante más de 24 horas a temperatura ambiente o 7 días de refrigeración.
2. Preparar diluciones sucesivas de las muestras desde 10⁻¹ a 10⁻⁴.
3. Utilizando una caja para cada dilución, dividir el fondo en 3 segmentos iguales. Dejar caer cuidadosamente dos gotas de cada dilución por

segmento, a distancia suficiente para evitar su confluencia. Utilizar una pipeta Pasteur por dilución.

4. Tapar las cajas y dejar 15 minutos a temperatura ambiente, sin invertirlas.
5. Incubar en posición invertida a la temperatura y tiempo de incubación señalados para el grupo microbiano en estudio.
6. Contar las colonias en aquellas gotas que muestren 20 colonias o menos.
7. Calcular la media del recuento, multiplicar por 50 y por la inversa de la dilución correspondiente.

➤ **Técnica por extensión en superficie.**

1. Vaciar 15 mL del medio de cultivo en cada una de las 6 cajas de Petri y dejarlas solidificar y secar como en la técnica anterior.
2. Preparar diluciones sucesivas de las muestras desde 10^{-1} a 10^{-4} .
3. Inocular de cada dilución (de 10^{-2} a 10^{-4}), 0.1 mL sobre la superficie de una placa, por duplicado.
4. Extender con la varilla el inóculo en toda la superficie de la placa, pasando la varilla repetidas veces. Depositar el inóculo en las placas, conforme se progresa en las diluciones. Utilizar una varilla para cada dilución.
5. Dejar las cajas a temperatura ambiente durante 15 minutos, incubarlas en posición invertida a la temperatura y tiempo de incubación señalados para el grupo microbiano en estudio.
6. Seleccionar las placas que muestren un máximo de 100 colonias.
7. Multiplicar la cuenta por 10 y por la inversa de la dilución correspondiente.

D) Técnica del Número Más Probable

➤ Prueba presuntiva de microorganismos coliformes totales

1. Inocular series de tubos con un medio de cultivo y algún dispositivo o indicador que permita poner de manifiesto un microorganismo o un grupo particular de ellos.
 2. Un cierto número de tubos se inocula con volúmenes definidos de muestra; por ejemplo 3 tubos con 10 mL, 3 tubos con 1 mL y 3 tubos con 0.1 mL.
- Después de la incubación es de esperarse, si la distribución de microorganismos viables es homogénea en la muestra original, un número de tubos positivos en proporción directa al contenido microbiano de la muestra. Para cada combinación de tubos positivos, con respecto a los inoculados, existe un número que puede consultarse en la tabla 1.

➤ Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales

1. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva a otro tubo de 16 x 150 mm que contiene caldo de bilis verde brillante (brila), con campana de Durham. Agitar los tubos para su homogeneización.
2. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 a 48 h.
3. Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe crecimiento y producción de gas, después de un período de incubación de 24 a 48 h.
4. Consultar la tabla 1 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes totales por mL.

Tabla 1. Número Más Probable (NMP).

No. de tubos positivos			NMP/10 0 mL	Límites de confianza (95%)	
3 (10 mL)	3 (1 mL)	3 (0.1 mL)		Mínimo	Máximo
0	0	1	3	0.5	9
0	1	0	3	0.5	13
1	0	0	4	0.5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	150
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	380
3	1	0	43	7	210
3	1	3	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1,300
3	3	1	460	71	2,400
3	3	2	1, 100	150	4,800

Fuente: Medina, 2014

E) Prueba de reductasa

1. En un tubo estéril de 16 x 150 con tapón de rosca poner 10 mL de leche y 0.25 mL de azul de metileno.
 - ✓ La solución de azul de metileno se prepara a partir de 5 mL de una solución alcohólica saturada más de 195 ml de agua destilada.
2. Agitar e incubar a 37°C en baño de agua.
3. Realizar las lecturas en las primeras 3/4 partes del tubo cada 15 minutos, hasta observar cambio o desaparición del color. No agitar el tubo durante la incubación. Azul de metileno: Color blanco (+) Color azul (-)

Tabla 2. Prueba de Reductasa

Clase de leche (según Barthel y Orla-Jensen)	Tiempo de reducción del azul de metileno (en minutos)	Contenido microbiano por mL	
		Cuenta en placa	Cuenta microscópica de Breed (millones)
(I) Buena	Más de 330	Hasta 0.5	Hasta 0.6
(II) Mediana	120 a 330	0.5 a 4	0.6 a 2.1
(III) Mala	15 a 120	4 a 20	2.1 a 12
(IV) Muy mala	Hasta 15	Más de 20	Más de 12

Fuente: Medina, 2014.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.

- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

A) Cuenta de colonias por vaciado en placa

Las muestras analizadas fueron de leche bronca fresca (sin hervir). Las personas encargadas de la venta de este producto no portaban indumentaria adecuada

(guantes, cofia, cubrebocas, bata, etc.) para la manipulación del producto. El área donde se exhibía la muestra si estaba limpia a la vista.

Tabla 3. Cuenta de colonias por vaciado en placa (UFC/mL).

Muestra	UFC / mL			Cuenta final
	1:10	1:100	1:1000	
A	220	208	187	70,000 UFC/mL

Según la NOM-184-SSA1-2002, productos y servicios. Leche fresca, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias, la leche fresca no debe contener más de 20 UFC/mL en punto de venta, por lo que, de acuerdo al análisis de cultivo por vertido en placa para método estándar, se indica un alto índice de contaminación (Figura 1), considerándose que la muestra analizada no es apta para consumo humano, considerándose una leche de mala calidad.



Figura 1. Desarrollo colonial por vaciado en placa.

B) Cuenta microscópica directa

A la muestra de leche fresca se le realizó la cuenta microscópica en 10 campos, obteniéndose las cantidades que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Cuenta microscópica directa

Campo	No. de grupos
1	3
2	3
3	5
4	8
5	4
6	4
7	7
8	5
9	5
10	6

En promedio de grupos microbianos por campo fue = 5.0

Con el micrómetro de platina se mide el campo del microscopio $d = 0.16 \text{ mm}$;

$$r^2 = 0.0064 \text{ mm}^2$$

$$\text{Área del Microscopio} = 3.1416 \times 0.0064$$

$$\text{FM} = 10,000 / (3.1416) (0.0064) = 10,000 / 0.2 = 500,000 \text{ UFC/mL de leche}$$

$$(\text{FM}) (\text{promedio grupo/campo}) = \text{No. de grupos microbianos/mL leche}$$

$$(500,000) (5.0) = 2,500,000 \text{ grupos microbianos/mL de leche}$$



Figura 2. Vista interior del microscopio durante el conteo directo.



Figura 3. Conteo directo de microorganismos.

C) Cuenta de colonias por inoculación en superficie

➤ Técnica de Miles y Misra.

Se contaron las colonias en las gotas con 20 colonias o menos, se calculó la media del recuento, se procedió a multiplicar por 50 y por la inversa de la dilución correspondiente:

$$\text{UFC} = 16 + 19 + 15 = 50 / 3 = 16.6$$

$$16 * 50 = 833.3 * (1 / 10^1) = 83.33 \text{ U.F.C/ mL muestra}$$

$$\text{UFC} = 13 + 18 + 14 = 45 / 3 = 15$$

$$16 * 50 = 750 * (1 / 10^3) = 0.75 \text{ U.F.C/mL muestra}$$

$$\text{UFC} = 4 + 9 + 5 = 18 / 3 = 6$$

$$6 * 50 = 300 * (1 / 10^4) = 0.03 \text{ U.F.C/mL muestra}$$



Figura 4. Diluciones de la muestra

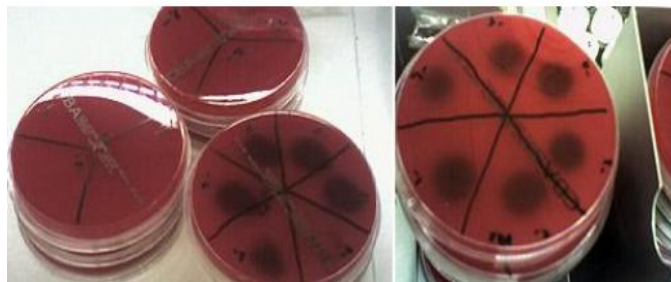


Figura 5. Desarrollo colonial técnica de Miles y Misra

➤ Técnica por extensión en superficie.

Se seleccionaron las placas que mostraban un máximo de 100 colonias, posteriormente se multiplicó la cuenta por 10 y por la inversa de la dilución correspondiente.

$$\text{UFC} = 44 + 36 + 38 = 118 / 3 = 39.3$$

$$39.3 * 10 = 393.3 * (1 / 10^1) = 39.33 \text{ U.F.C/mL muestra}$$

$$\text{UFC} = 25 + 32 + 34 = 91 / 3 = 30.3$$

$$30.3 * 10 = 303.3 * (1 / 10^2) = 3.03 \text{ U.F.C/mL muestra}$$

$$UFC = 24 + 39 + 25 = 88 / 3 = 29.3$$

$$29.3 * 10 = 293.3 * (1 / 104) = 0.0293 \text{ U.F.C./mL muestra}$$



Figura 6. Diluciones



Figura 7. Siembra de la muestra por extensión en superficie

D) Técnica del Número Más Probable (NMP)

➤ Prueba presuntiva

Se realizaron las diversas diluciones de la muestra y se procedió a vaciar en los tubos con caldo lactosado, los resultados se tomaron después de 24 horas:

$$NMP = \frac{(N^{\circ} \text{ en tabla}) (\text{factor de dilución})}{100}$$

$$NMP = (220) (3) / 100$$

$$NMP = 6.6 / \text{mL de muestra}$$

Según la Norma Oficial Mexicana-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado, este producto no debe contener más de 10 NMP/mL en punto de venta, por lo que, de acuerdo al análisis de coliformes totales mediante la técnica del Número Más Probable, se indica un bajo índice de contaminación, por lo tanto, se considera a la muestra analizada que si es apta para su consumo.

Tabla 5. Resultados técnica número más probable.

Diluciones	Numero de tubos positivos	NMP
10^{-1}	5	220 Bacterias Coliformes por 100 mL de muestra
10^{-2}	4	
10^{-3}	2	

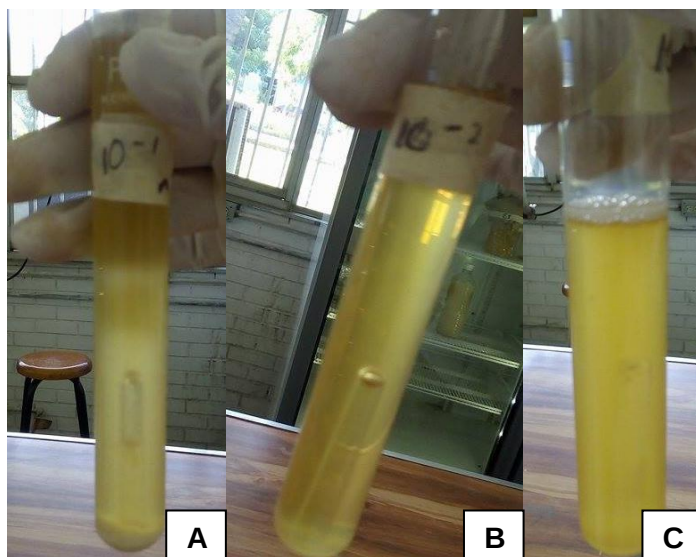


Figura 8. Resultados caldo lactosado: A) Formación de burbuja en tubo 10^{-1} , B) Formación de burbuja en tubo 10^{-2} y C) Formación de burbuja en tubo 10^{-3}

➤ Prueba Confirmativa

La prueba confirmativa presentó formación de burbuja en los tubos con caldo Verde Brillante, por lo que es indicativo de la presencia de contaminación por bacilos coliformes considerándose a la muestra analizada como no apta para consumo humano, según la NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado.



Figura 9. Resiembra en caldo verde

E) Prueba de reductasa

La presencia de microorganismos en la leche y por su acción reductora produce una modificación del color del azul de metileno, pasando de color azul intenso a azul claro, pudiendo desaparecer totalmente de acuerdo a la carga microbiana presente. Una leche con un contenido bajo en microorganismos, no modifica el tinte azul del colorante o tarda mucho tiempo en modificarlo. Mediante la prueba de reductasa se comprobó que la calidad de la muestra de leche es mediana, ya que transcurrieron aproximadamente dos horas para que la reacción llegara a su fin. El contenido microbiano aproximado por mililitro de muestra fue de 0.5 hasta 4 millones.



Figura 10. Incorporación de Azul de metileno a la muestra.



Figura 11. Resultado final.

CONCLUSIONES

Actualmente los alimentos son el principal transporte de infecciones sanitarias debido a las malas prácticas de calidad e higiene. Existen diversos métodos mediante los cuales se pueden obtener resultados certeros respecto al contenido microbiano en alguna muestra determinada. Dentro del grupo de recuentos microbianos a base de siembra en cultivos la técnica por vaciado en placa es la más utilizada debido a su sencillez, ya que muestra resultados en aproximadamente 48 horas. Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos, es necesario contar con microorganismos que funcionen como indicador de contaminación fecal. Cuando los productos alimenticios han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), estos microorganismos se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias, como en el caso de la leche. Finalmente, se comprobó que la prueba de la reductasa resulta muy útil a la hora en la industria láctea puesto que la velocidad a la que se produce el cambio de color del indicador azul de metileno es directamente proporcional al número de gérmenes presentes. De esta manera se puede determinar de manera indirecta la calidad higiénica de la leche.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Brock, M. (2012). Microbiología general: Cultivo de microorganismos. Disponible en línea. Recuperado el 26 de febrero de 2017, de:
<http://www.unavarra.es/genmic/microgral/Tema%2002.-%20Cultivo%20de%20microorganismos.pdf>



García, E. (2015). Seminarios de Microbiología. Disponible en línea. Recuperado el 25 de febrero de 2017, de:

<http://www.uib.cat/depart/dba/microbiologia/seminarios/1%20Medios%20de%20cultivo.pdf>

Gutiérrez, S. y Pedrique, M. (2014). Obtención de cultivos puros. Disponible en línea. Recuperado el 25 de febrero de 2017, de:
http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Obtenci%C3%B3n_de_cultivos_puros.pdf

Medina, M. (2014). Medios de cultivos en microbiología. Disponible en línea. Recuperado el 25 de febrero de 2017, de:
<https://libroslaboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-de-microbiologc3ada.pdf>



PRÁCTICA No. 2

RECuento DE ORGANISMOS MESOFILOS AEROBIOS

OBJETIVOS

1. Conocer las características generales de los organismos mesofílicos aerobios como grupo indicador.
2. Interpretar su presencia en los alimentos.
3. Emplear la técnica recomendada oficialmente para su recuento.
4. Conocer los conceptos de precisión y especificidad.
5. Conocer la importancia de realizar las técnicas microbiológicas de recuento de microorganismos dentro de las especificaciones señaladas (temperatura, tiempo de incubación, etc.)

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar

herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ Competencias sistémicas

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

En general las enfermedades transmitidas por alimentos, la mayoría de la cuales son de origen microbiano, constituyen uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, donde los alimentos y el agua contaminada son fuentes importantes de contagio (ICMSF, 1998). En Estados Unidos de América se estima que cada año ocurren 76 millones de enfermedades de origen alimentario, lo que conlleva a 350,000 hospitalizaciones y alrededor de 5000 muertes (Mead *et al.*, 1999). En México durante el periodo de 1980 a 1989 el Laboratorio Nacional de Salud Pública confirmó 58 brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario a nivel nacional (Parrilla- Cerrillo, 1993), en el año 2002 el Sistema Nacional de Información en Salud reportó a nivel nacional 3612 casos de intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano, de los cuales 76 se presentaron en el estado de Sonora (Anuario Estadístico de la Secretaría de Salud, 2002).

El control sanitario en la preparación de alimentos es determinante para reducir los factores de riesgo que influyen en la transmisión de enfermedades por alimentos para proteger la salud del consumidor (NOM-093-SSA1-1994). Los criterios microbiológicos ofrecen a la industria alimentaria y a los organismos



reguladores las directrices para controlar los sistemas de elaboración de alimentos de acuerdo con (Doyle *et al.*, 2001). Como criterios microbiológicos se pueden utilizar microorganismos indicadores de contaminación, la presencia de microorganismos patógenos específicos, la detección de una toxina específica producida por un patógeno.

Según Fernández (2001) argumenta que los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar calidad sanitaria de alimentos son mesofílicos aerobios, mohos, levaduras, coliformes totales, coliformes fecales, entre otros. Algunos de los microorganismos patógenos implicados en infecciones o intoxicaciones alimentarias son: *Salmonella spp.* bacilo corto gram negativo que pertenece a la familia de las Enterobacterias. Entre las especies de mayor importancia se encuentran *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi* que son causantes de septicemia, además existen más de 2300 serotipos que producen una infección intestinal conocida como salmonelosis. Los alimentos de mayor riesgo de contaminación por *Salmonella* son las carnes crudas, aves de corral, pescado, camarón, huevo, leche, productos lácteos, ensaladas, pasteles con relleno, mantequilla de cacahuete, cocoa, chocolate y el agua. Se estima que en Estados Unidos se producen de 2 a 4 millones de casos de Salmonelosis al año, la mayoría como resultado a la exposición a alimentos crudos (carne cruda), pollo, leche y huevos (Watson, 2005).





CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.2 Microorganismos importantes en microbiología de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

5 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

4 Matraz Erlenmeyer de 100 mL

15 cajas Petri

4 Tubos de ensaye de 16 x 150

10 Pipetas de 5 o 10 mL



C. Corsario I No. 203, Colonia Urías, C.P. 82070; Mazatlán, Sinaloa.

Tels. (669)983-84-00, 990-02-09, 991-10-61,

e-mail: direccion@itmazatlan.edu.mx

www.itmazatlan.edu.mx

1 Balanza analítica

1 Incubadora

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Agar para método estándar

METODOLOGÍA

Según la NOM-092-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

1. Realizar diluciones seriadas de la muestra de 10^{-1} a 10^{-5} .
2. Inocular 1 mL de las diluciones 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-5} en las cajas Petri estériles previamente rotuladas.
3. Adicionar 15 a 20 mL de Agar Cuenta Estándar fundido y mantenido a 45°C en baño de agua.
4. Homogeneizar el inóculo en el medio de cultivo y dejar solidificar.
5. Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.

Para determinar la precisión del método se realizara lo siguiente:

- I. Realizar dos series de diluciones: serie A: Utilizar frascos de dilución con 90 mL de solución diluyente y serie B: utilizar tubos de dilución con 9 mL de solución diluyente.

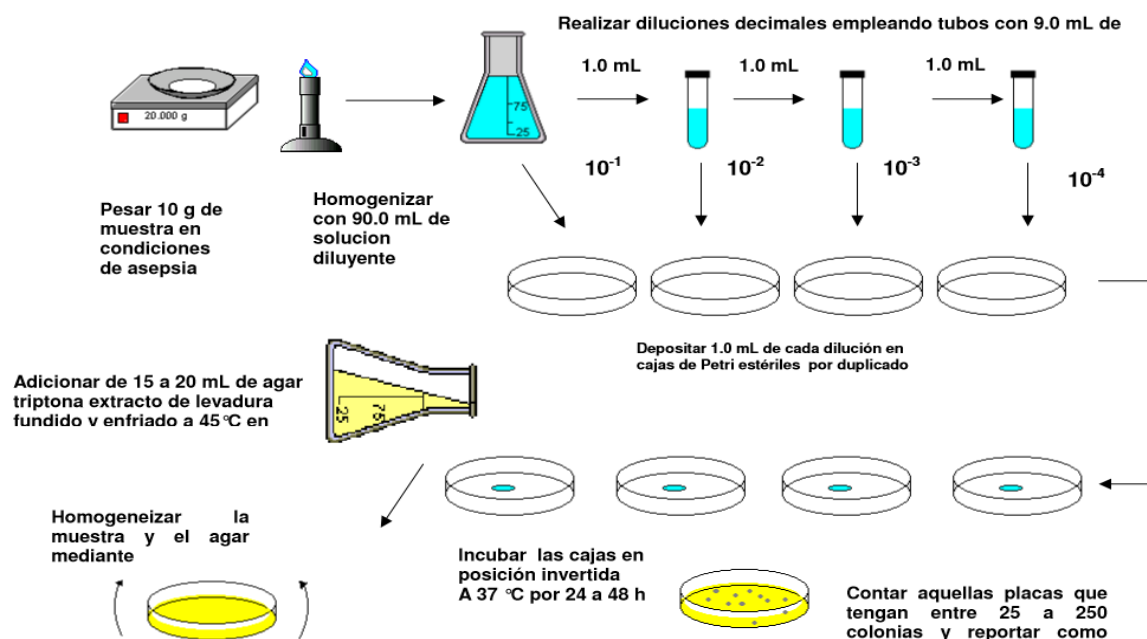


Figura 12. Diagrama de flujo método para la cuenta de bacterias aerobias en placa (NOM-092-SSA1-1994).

I. Seguir el procedimiento para cada serie desde el punto No. 1

Para determinar la especificidad del método se realizaran recuentos de colonias a las 24, 48 y 72 horas.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la

inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental.

- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las muestras analizadas fueron patas de mula, compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no portaban indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia, cubrebocas, mandil, etc. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista. Se lavaron, se desinfectaron y se

procedió a abrir las conchas para extraer el contenido de su interior, como se muestra en figuras 13 y 14.



Figura 13. Muestra de Patas de mula.

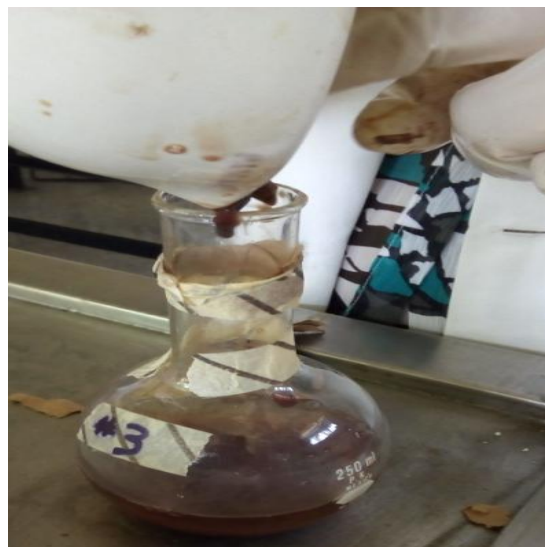


Figura 14. Elaboración de dilución de la muestra de Patas de mula.

Recuento de mesófilos aerobios

El conteo de las diluciones tanto para la serie A como la serie B, no excede los límites permisibles según la Norma Oficial Mexicana 031-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-Refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, los moluscos bivalvos como las patas de mula no debe contener más de 500 000 UFC/g en punto de venta, por lo que, de acuerdo al análisis de cultivo en agar para método estándar, se indica un bajo índice de contaminación. En cuanto a la determinación de la precisión del método, los resultados se encuentran dentro del límite permisible.



Figura 15. Siembra de la muestra.

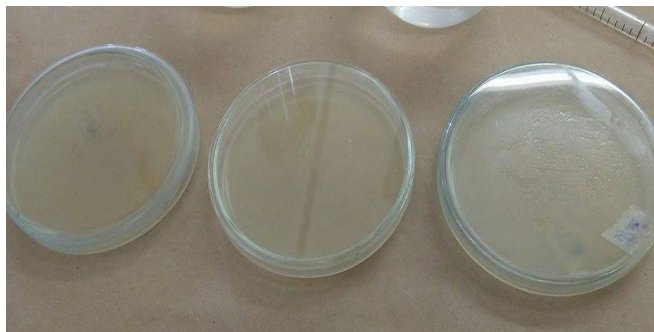


Figura 16. Siembra en Agar para método estándar.



Figura 17. Desarrollo colonial en agar para método estándar.



Figura 18. Preparación de diluciones para serie A.

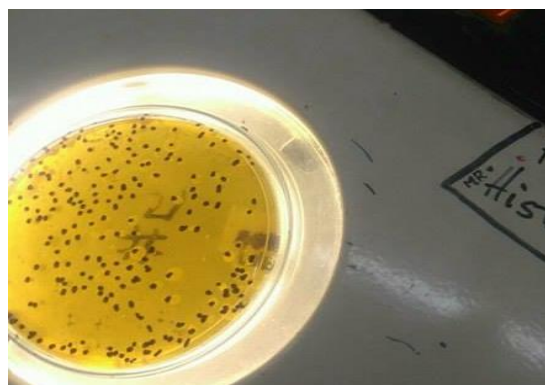


Figura 19. Desarrollo colonial en caja serie A.

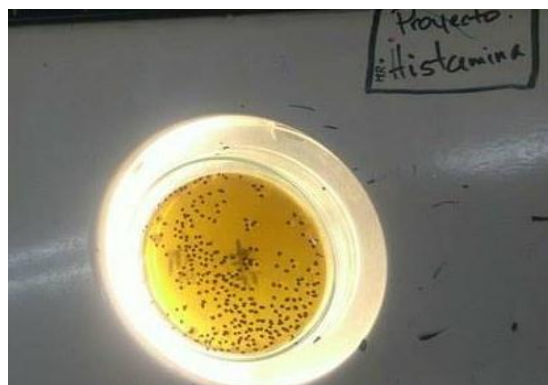


Figura 20. Desarrollo colonial en caja serie B.

Tabla 6. Resultados de la Serie A y Serie B

Dilución		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	UFC/g o mL
Serie A	48 hrs	1500	1000	980	1160
	24 hrs	1000	500	402	634
Serie B	48 hrs	1500	1000	990	1163
	72 hrs	2300	2002	1980	2094

CONCLUSIONES

Según la Norma Oficial Mexicana 031-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-Refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias y los resultados obtenidos del análisis microbiológico, las muestras de pata de mula, responden a una mínima contaminación de mesófilos aerobios, ubicándose dentro de los límites permisibles (500 000 UFC/g muestra) de la norma correspondiente. El desarrollo de la práctica además demostró la seguridad de emplear este método para la determinación de mesófilos aerobios, no obstante al realizar el experimento de la serie A y B los resultados no son tan exactos y diferir de un resultado certero. Es importante al realizar análisis microbiológicos no prolongar la incubación de la muestra por más de 48 horas ya que el conteo puede resultar con falsos positivos.

En cuanto a la muestra, se recomienda conservar vivas las patas de mula en refrigeración de 2 a 5°C, envueltas en un lienzo húmedo, y por un máximo de dos días. Además, es recomendable que el consumidor, deje a las patas de mula bajo el chorro de la llave algunos segundos para quitar el excedente de lodo y tierra que por naturaleza se encuentran contenido en su concha, esto con el fin de minimizar la contaminación causada de manera natural por la suciedad de este molusco. Se recomienda evitar el consumo excesivo de este alimento, y optar por el mejor intermediario de donde éste provenga, el cual acate las prácticas correctas de higiene, almacenaje y refrigeración necesarias para incrementar la inocuidad de dicho alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anuario Estadístico de la Secretaría de Salud. 2002. Sistema Nacional de Información en Salud <http://sinais.salud.gob.mx/publicaciones/publicaciones.htm#>
- Doyle, P.M., Beuchat, R.L. y Montville, T.J. 2001. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. 1ra. Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 69 11.
- Fernández, E. 2001. Microbiología sanitaria: agua y alimentos. Vol. I Universidad Guadalajara, México D.F. p 175. 12.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1998. Microorganismos de los alimentos. Características de los patógenos microbianos. Acribia. Zaragoza 606 p.
- Mead, P.S., Slutsker, I., Diert, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S. y Shapiro, C. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5:607-25.
- Norma Oficial Mexicana 031-SSA1-1993. Bienes y Servicios. Productos de la Pesca. Moluscos Bivalvos Frescos-Refrigerados y Congelados. Especificaciones Sanitarias. Diario Oficial de la Federación. Gobierno constitucional de los Estados Unidos Mexicanos. México, D.F.
- Parrilla-Cerrillo, M.C., Vázquez-Castellanos, J.L., Saldate-Castañeda, E.O. y Nava-Fernández, L.M. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública de México. Vol 35 No.5:456-463.
- Watson, A. D. 2005. Salmonella spp. Center of Food Safety & Applied Nutrition, U.S. Food & Drug Administration. (FDA). <http://www.cfsan>.

PRÁCTICA No. 3

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA DE MAR

OBJETIVOS

1. Conocer las características que deben cumplir un grupo indicador de contaminación fecal reciente.
2. Interpretar la presencia de los organismos coliformes como indicadores de contaminación fecal reciente.
3. Interpretar la presencia de los mesófilos en el análisis microbiológico del agua.
4. Emplear las técnicas oficiales para determinar la potabilidad del agua.
5. Conocer la importancia de la frecuencia del análisis microbiológico del agua.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.

- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo

- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

En la literatura científica reciente, el agua de mar se presenta como una potencial ayuda para resolver una variedad de problemas de salud, por su contenido de minerales y oligoelementos, con un enfoque dirigido al fortalecimiento del medio interno o terreno que rodea las células. El uso terapéutico y nutricional del agua de mar se remonta a los orígenes de la cultura occidental, y en la modernidad se destacan las investigaciones científicas del fisiólogo francés René Quinton al inicio del siglo xx, hasta las investigaciones recientes de médicos japoneses y europeos, en las que se han estudiado la toxicidad, la fisiopatología y la bioquímica, en respuesta a la ingesta del agua de mar. A pesar de la existencia de estudios, falta todavía más investigación en el tema para concluir sobre el impacto, los beneficios y los riesgos de su consumo para la salud (Durango *et al.*, 2010).



En la actualidad, el agua de mar la comercializan laboratorios americanos, europeos y japoneses, en diversas presentaciones y diluciones: bebible en ampollas o botellas, en aerosol y gotas nasales, tratada por electrodiálisis (que retiene iones monovalentes como Na^+ y Cl^- y microfiltrada). Con esta agua comercial obtenida a más de 200 m de profundidad y de superficie se han realizado importantes investigaciones de intervención en humanos y animales, en las que se ha mostrado efecto significativo en problemas de eccema y dermatitis, rinitis alérgica y efecto antidiabético y antiobesidad en ratones, entre otros. La explicación que se ha dado para este efecto inespecífico, en tal variedad de trastornos, es el contenido de minerales como Ca^{++} , Mg^{++} y K^+ , de los cuales se conocen sus propiedades nutricionales y terapéuticas, además del amplio contenido de oligoelementos. Uno de los obstáculos para el uso masivo del agua de mar comercial ha sido el de los altos costos de recogida, transporte, desinfección y envasado, que se traducen en precios elevados para el usuario, en particular en los países en desarrollo (García *et al.*, 2004).

Partiendo de la posibilidad de utilizar para el consumo humano el agua de mar de la orilla de sitios alejados de los centros urbanos, industriales y turísticos, es de todas maneras importante asegurar su calidad microbiológica, para lo cual nos apoyamos en las técnicas que se han utilizado en la desinfección del agua de mar en la acuicultura, a fin de garantizar la calidad de alimentos marinos. Entre estos están: radiación uv, antibióticos, ozono, calor, cloro y microfiltración (Mahé, 2009). Adicionalmente, consideramos técnicas sencillas y prácticas que han permitido mejorar la calidad del agua dulce para consumo humano, como es el de la desinfección solar o sodis, método de tratamiento del agua a escala doméstica que se ha investigado para implementar en países en desarrollo (Soler *et al.*, 2008).



CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.2 Microorganismos importantes en Microbiología de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

1 Frasco estéril

1 Matraz Erlenmeyer de 125 mL (con 0.2 mL de Tiosulfato de sodio 10%)

2 Matraz Erlenmeyer de 125 mL con agar método estándar (solo una caja) y agar EMB (solo una caja)

1 Matraz Erlenmeyer de 125 mL con caldo verde brillante bilis al 2% (caldo

brilla) (Tubos de ensaye con 10 mL cada uno)

1 Matraz Erlenmeyer de 125 mL con caldo lauril sulfato o caldo lactosado (5 tubos de ensaye con 10 mL cada uno)

1 Matraz Erlenmeyer de 125 mL con caldo lactosado al 50% (5 tubos con 20 mL cada uno)

2 Matraz Erlenmeyer de 125 mL con 90 mL de solución reguladora de fosfatos cada uno (para realizar las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3})

2 gradillas

15 tubos de ensaye de 20x150

15 tubos durham

2 cajas Petri

5 Pipetas de 1 mL

5 Pipetas de 5 mL

5 Pipetas de 10 mL

1 Probeta de 250 mL

1 Piseta

1 Espátula

1 Tripie

1 Mechero

1 Tela de asbesto

1 Asa

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Tiosulfato de sodio al 10%

Agar método estándar

Caldo verde brillante bilis 2%

Caldo lactosado al 150%



Caldo lauril sulfato

Solución reguladora de fosfato como diluyente

METODOLOGÍA

Según NOM-112-SSA1-1994. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número Más Probable.

1. Colocar 0.2 mL de tiosulfato de sodio al 10% a un frasco y esterilizar en autoclave.

A) Prueba Presuntiva

2. Recuento de bacterias mesófilas aerobias: Colocar 1mL de la muestra problema en una caja petri estéril, adicionarle 15 mL de agar fundido para método estándar a 40-45°C e incubar a 37°C por 24h. Proceder a contar en el cuenta colonias Quebec.
3. Realizar los cálculos del Número Más Probable de organismos coliformes (NMP) con la siguiente fórmula:

$$\text{NMP} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ en tabla}) (\text{factor de dilución})}{100}$$

Ver tabla

B) Prueba Confirmativa

4. Con un pipeta estéril transferir 10 mL de la muestra problema a un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contiene 90 mL de solución reguladora de fosfatos para realizar la dilución 10^{-2} , de esta dilución tomar 10 mL y agregarlos a un segundo matraz Erlenmeyer con 90 mL de solución reguladora de fosfato para hacer la dilución 10^{-3} .



5. Por cada una de las 3 diluciones anteriores colocar 5 tubos de ensaye con caldo lactosado al 150 %, es decir, se deberán tener un total de 15 tubos. A los primeros se le agregan 10 mL de la solución 10^{-1} (muestra original) a los siguientes 5 tubos se le adicionaran 1 mL de la solución 10^{-2} y a los últimos 5 tubos se les agregaran 0.1 ml de la dilución 10^{-3} . Mezclar y proceder a incubar a 37°C durante 24- 48 horas.
6. Examinar los tubos a las 24 horas y observar si hay formación de gas en la campana de fermentación, si no existe gas volver a incubar hasta las 48 horas. La presencia de gas en cualquier cantidad dentro del tiempo de incubación hace positiva la prueba. Los tubos positivos mostraran además denso desarrollo bacteriano. La ausencia de gas hace negativa la prueba.
7. Prueba confirmativa: Transferir individualmente de cada tubo positivo 2 asadas del cultivo a un tubo de ensaye con campana de fermentación con 10 mL de caldo verde brillante bilis al 2%.
8. Incubar a 37°C durante 24- 48 horas, la formación de gas en cualquier cantidad dentro de la campana de fermentación hace positiva la prueba.
9. Determinar el número más probable de organismos coliformes en la muestra con ayuda de la tabla.
10. Elegir un tubo de caldo verde brillante y sembrar por estría cruzada en una caja con agar EMB e incubar a 37°C de 24- 40 horas.
11. De colonias que resulten sospechosas de coliformes, tomar una pequeña porción de muestra e inocularla en un tubo con caldo lactosa (preparación normal).
12. Investigar géneros que formen parte del grupo de coliformes y sus características coloniales, color, aspecto, etc.
13. Incubar a 37°C durante 24- 48 horas

14. De las colonias sospechosas sembrar 2 juegos de las bioquímicas, citrato de Simmons, caldo MR-VP (recuerda que de este tubo deberán ser 4) y SIM.
15. Tomar una pequeña porción de muestra para realizar tinción gram.
16. Reportar resultados.

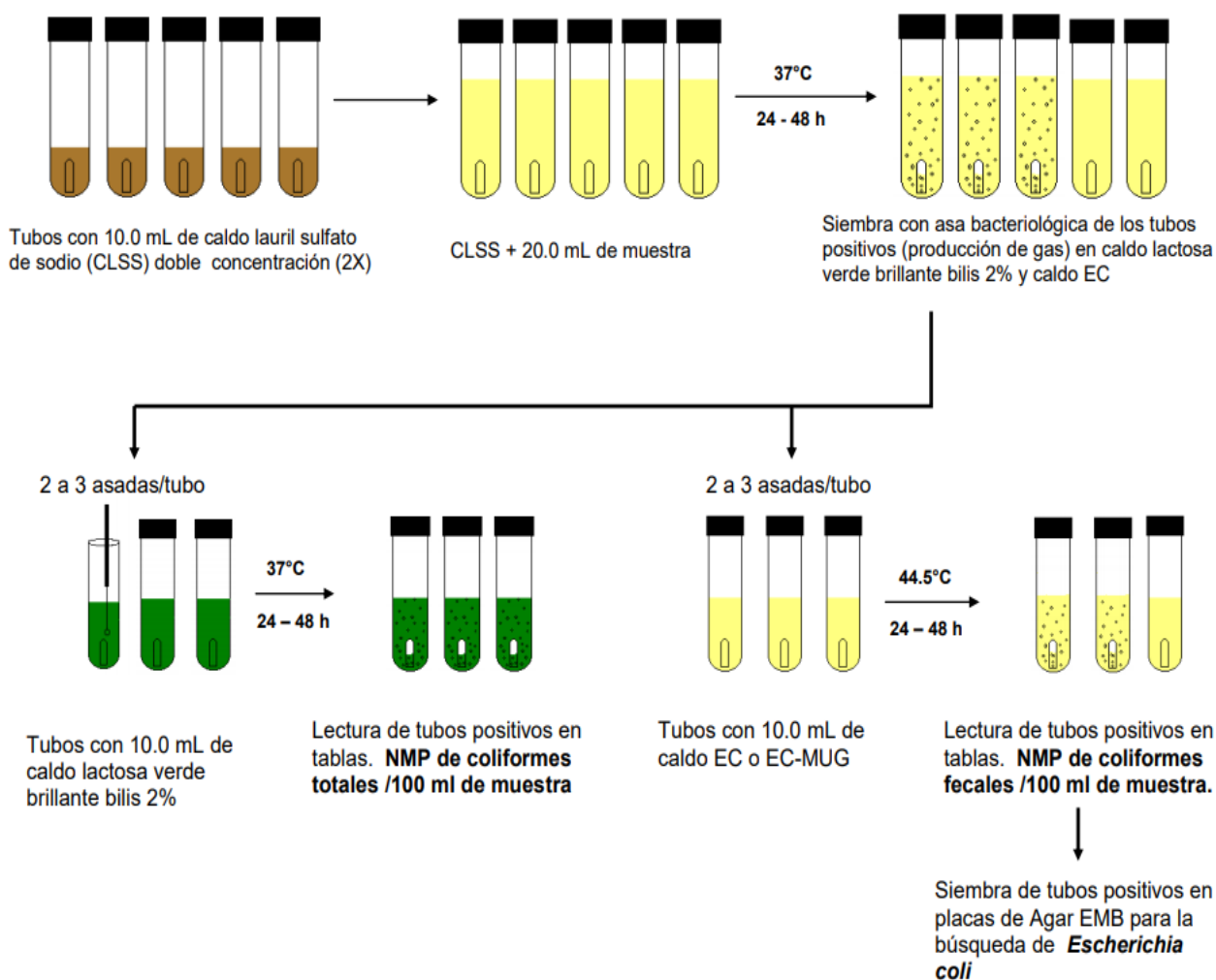


Figura 21. Diagrama de flujo para la determinación de Bacterias Coliformes por la técnica del NMP (NOM-112-SSA1-1994).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se tomaron muestras de agua de mar (Figura 22) en la playa Norte de Mazatlán, Sinaloa para su posterior análisis (Figura 23).



Figura 22. Toma de las muestras de agua de mar.



Figura 23. Siembra de las muestras de agua de mar.



Figura 24. Desarrollo colonial Mesófilos aerobios.



Figura 25. Tubos Caldo Lactosado.



Figura 26. Siembra en caldo bilis.



Figura 27. Caldo Bilis positivo.

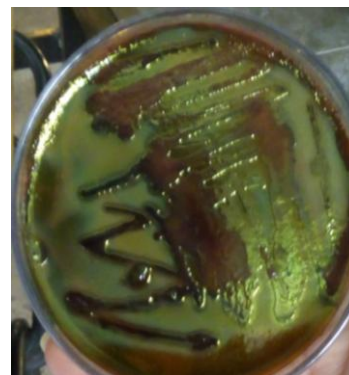


Figura 28. Desarrollo colonial agar EMB.

$$\text{NMP} = \frac{(\text{N}^\circ \text{ en tabla}) (\text{factor de dilución})}{100}$$

$$\text{NMP} = (19) (3) / 100$$

$$\text{NMP} = 0.57 / \text{mL de muestra}$$

Se puede apreciar que en la zona de muestreo los resultados 0.57 NMP/g de muestra se encuentran dentro del límite permisible (230 NMP/g) según la NOM-112-SSA1-1994 considerando que no existen áreas de descargas de drenaje cercanas a la zona. En cuanto a bacterias mesófilas aerobias se determinó que existe la presencia de 456 UFC/mL de agua de mar, se encuentra dentro del límite permisible (500,000 UFC/mL), esta cifra puede deberse a la gran cantidad de especies marítimas que existen en la zona, así como también a que la playa está abierta a todo público las 24 horas del día.

Examen macroscópico

En el examen macroscópico de las muestras se observaron las colonias descritas en la Tabla 7.

Tabla 7. Descripción y características de colonias desarrolladas en agar EMB.

Medio de cultivo EMB	Descripción	Características
10⁻¹	A simple vista se observaron un desarrollo abundante de colonias de color verde metálico (<i>E.coli</i>), rosa tenue mucoso (<i>Enterobacter</i>).	<i>E. coli</i> : forma irregular, elevación plana, elevada, margen entero. <i>Enterobacter</i> : forma irregular, elevación convexa, margen ondulada.
10⁻²	Se observó desarrollo abundante de colonias de color verde metálico (<i>E.coli</i>), lila tenue mucoso (<i>Klebsiella</i>).	<i>E. coli</i> : forma irregular, elevación plana, elevada, margen entero. <i>Klebsiella</i> : forma circular e irregular, convexa, margen ondulada.

Examen microscópico

En el examen microscópico de las muestras mediante tinción Gram se observaron bacilos Gram (-) esporulados (Figuras 30 y 31).



Figura 29. Tinción Gram



Figura 30. Bacilos Gram (-) (*E. coli*).

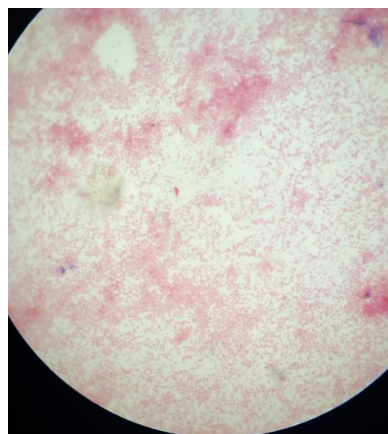


Figura 31. Bacilos Gram (-) (*Klebsiella*).

Pruebas bioquímicas

Se sembraron las siguientes pruebas bioquímicas: Citrato, SIM y Urea, los resultados se muestran en las Figuras 32, 33, 34 y en Tabla 8.



Figura 32. Citrato (+)



Figura 33. SIM motilidad (+), Indol (-) y H₂S (-)



Figura 34. Urea (-) negativa

Tabla 8. Resultados Pruebas Bioquímicas.

Prueba Bioquímica	Resultado
Citrato	+
Urea	-
H ₂ S	-
Indol	-
Motilidad	+

Identificación de Especies bacterianas

Se identificaron colonias características de *Escherichia coli* y de *Klebsiella pneumoniae*

CONCLUSIONES

Los mares producen más de la mitad del oxígeno en la atmósfera y absorben la mayor cantidad de carbono que hay en ella. Esto quiere decir que el oxígeno que estas respirando es gracias a los mares. Incluso muchas de las cosas que consumimos o utilizamos provienen del mar o son transportadas a través de este. Actualmente se han descubierto gran cantidad de propiedades farmacéuticas que posee el agua de mar, incluso se han desarrollado tratamientos (aun en proceso) para usarla para consumo humano. Es por todo lo anterior que se requiere estar evaluando su calidad microbiológica, así como también para cuidar las especies marinas y contribuir a la preservación de las mismas.

Tabla 9. Número Más Probable (NMP) de Bacilos Coliformes por 100 mL de muestra, utilizando 5 tubos de 10, 1 y 0.1 en volumen.

No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos				No. de Tubos Positivos			
10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP	10ml	1.0ml	0.1ml	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	35	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.4	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	25	5	1	2	64
0	1	3	7.2	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.0	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	35	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	25	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	95
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	36	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	38	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	49	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	61	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	72	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	84	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	72	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	300
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	380
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	25	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	470
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	560
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: AOAC 18ª Edición. Revisión 2 2007.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Durango, H., Soler, J. P. y Soler, T. W. 2010. Control microbiano de agua de mar mediante microfiltración.

García, I., Cortés, A. y Sierra, A.P. 2004. La marea roja causada por el dinoflagelado *Alexandrium tamarense* en la Costa Pacífica Colombiana. Revista de Biología Tropical. 52(1): 59-68.



Mahé, A. 2009. El plasma de Quinton. El agua de mar nuestro medio interno.
Barcelona: Icaria editorial S.A. P. 190.

Soler, W., Velásquez, N.D.C. y Soler, J.P. 2008. Baja genotoxicidad de extracto
orgánico de agua de mar de Coveñas (Sucre, Colombia). Vitae; 15(1): 96-
102.



PRÁCTICA No. 4

RECuento DE ORGANISMOS COLIFORMES

OBJETIVOS

1. Conocer las características generales de los organismos coliformes como grupo indicador.
2. Diferenciar a los organismos coliformes de los organismos coliformes fecales.
6. Interpretar la presencia de los organismos coliformes en alimentos.
7. Interpretar la presencia de los organismos coliformes fecales en alimentos.
8. Emplear las técnicas recomendadas oficialmente para cada uno de estos grupos.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.

- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Los organismos coliformes constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra. A fin de simplificar su manejo en el laboratorio, se ha establecido una definición en base a las características más constantes que exhibe la especie tipo del grupo, *Escherichia coli*. Esta simplificación sin embargo da lugar a que se incluyan en el grupo, bacterias de origen no intestinal, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter*, porque comparten las características que la definición impone, por lo que no necesariamente guardan una relación directa con la contaminación de origen fecal y en consecuencia, tampoco con la presencia de patógenos entéricos. El uso de los coliformes como

indicador sanitario significativo, debe restringirse al agua y hielo potable, a los alimentos sometidos a procesos térmicos y a la evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higienización del equipo (Camacho *et al.*, 2009).

La definición del grupo coliforme los describe como bacilos Gram negativos no esporulados, aerobios o anaerobios facultativos que fermentan la lactosa con producción de gas, dentro de las 48 hrs de incubación a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas y/o diferenciales (Ramos *et al.*, 2011).

La definición que se ha dado para los organismos coliformes es de orden funcional. En efecto, cuando se investiga su presencia en el agua, la lectura de los cultivos iniciales se realiza a las 24 horas y posteriormente a las 48 horas, limite este (congruente con la definición) para descartar un tubo como negativo (Castro, 2013).

Por diversas razones, entre otras, la facilidad de operación y economía, se ha introducido el medio de agar bilis-rojo-violeta para el recuento de organismos coliformes, principalmente a partir de alimentos en los que se espera en número más bien alto. En este caso, la lectura de las placas se realiza a las 24 horas, lo cual se aparta de la definición claramente (Doyle *et al.*, 2011).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.2 Contaminación de los alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar

C. Corsario I No. 203, Colonia Urías, C.P. 82070; Mazatlán, Sinaloa.

Tels. (669)983-84-00, 990-02-09, 991-10-61,

e-mail: dirección@itmazatlan.edu.mx

www.itmazatlan.edu.mx



equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

5 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
15 cajas Petri
15 Tubos de ensaye de 16 x 150
5 Pipetas de 1 mL
5 Pipetas de 5 mL
5 Pipetas de 10 mL
1 Balanza analítica
1 Incubadora
1 Autoclave

REACTIVOS

Muestra determinada previamente
Solución reguladora de fosfato como diluyente
Agar rojo violeta bilis
Caldo lactosado
Caldo bilis verde brillante





METODOLOGÍA

Según NOM-112-SSA1-1994. Determinación de Bacterias Coliformes. Técnica del Número Más Probable.

Organismos coliformes en placa

1. Realizar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-5} .
2. Transferir 1 mL de cada dilución a cajas de Petri estériles.
3. Agregar de 12 a 15 mL de medio de Agar Rojo Violeta Bilis mantenido de 45 a 48°C en baño de agua.
4. Mezclar correctamente el medio en la muestra. Dejar solidificar sobre una superficie plana y horizontal.
5. Agregar 4 mL del mismo medio extendiéndolo para cubrir completamente la superficie.
6. Dejar solidificar.
7. Incubar las cajas en posición invertida a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas.
8. Contar el número de colonias en cada placa y multiplicar por la inversa de la dilución.
9. Reportar: Cuenta de organismos coliformes en placa de agar rojo violeta bilis incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 horas por gramo o mililitro de muestra.



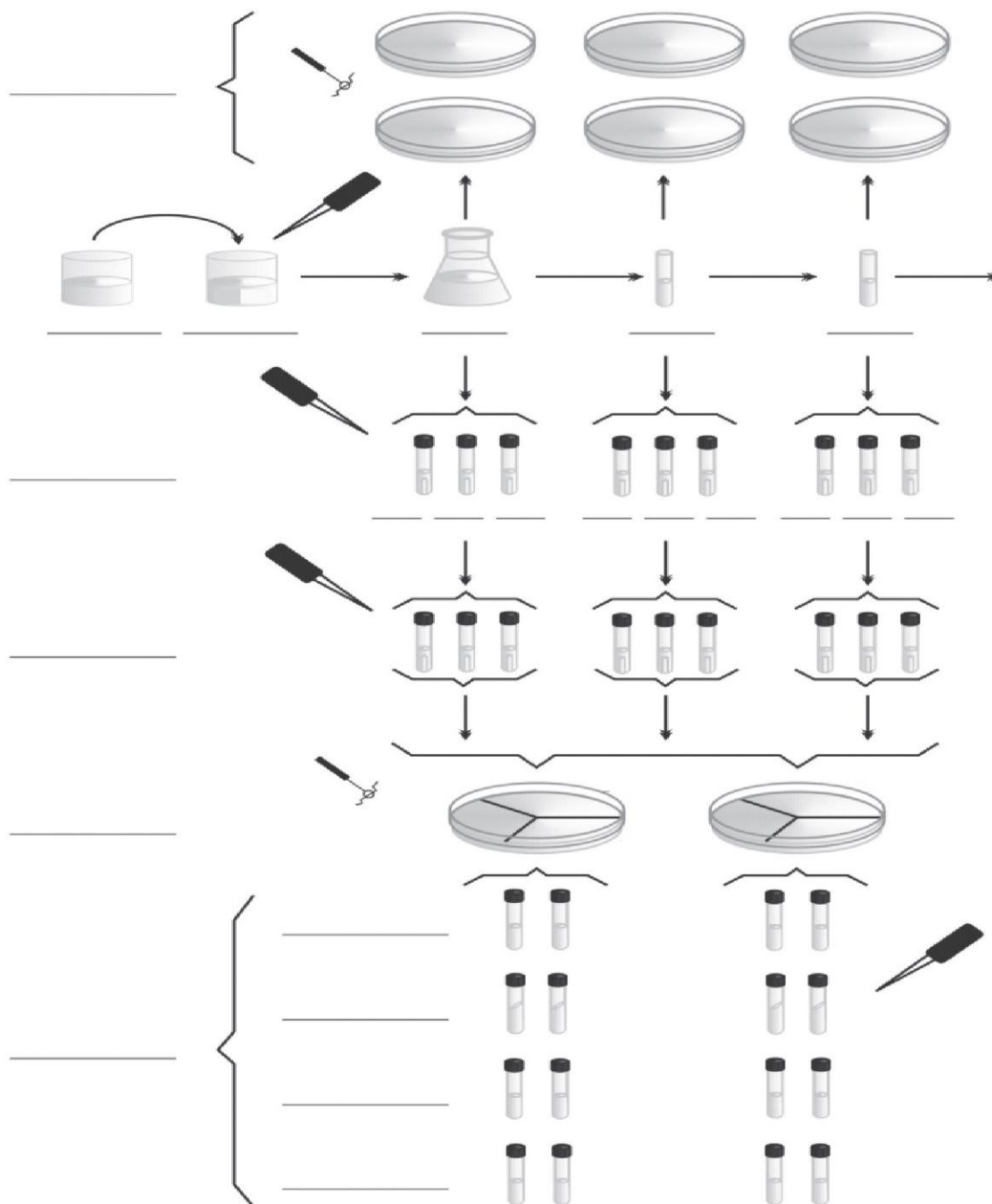


Figura 35. Diagrama de flujo para determinación de Bacterias Coliformes en placa (NOM-112-SSA1-1994).

Organismos Coliformes por NMP (ver figura 21)

➤ Prueba presuntiva.

1. Realizar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3}
2. Inocular 1 mL de cada dilución en cada uno de los tres tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa.
3. Incubar los tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.
4. Examinar los tubos a las 24 ± 2 horas y observar si hay producción de gas en la campana de fermentación, si no lo hay, seguir incubando hasta las 48 ± 2 horas.

La presencia de gas, en cualquier cantidad, dentro del tiempo de incubación hace positiva la prueba.

➤ Prueba confirmativa.

1. Agitar suavemente los tubos de caldo lauril triptosa que resultaron positivos en la prueba presuntiva.
2. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo a caldo lactosado bilis verde brillante.

Al efectuar la reinoculación sostener el tubo primario (Lauril sulfato triptosa) en ángulo tal que se pueda tomar la asada evitando la película que existiera en el medio. Sacar el asa del líquido en sentido perpendicular a su superficie de manera que se forme un menisco bien definido.

3. Incubar el caldo lactosa bilis verde brillante a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 horas.
4. Considerar la prueba positiva si hay formación de gas en cualquier cantidad.
5. Determinar el número de organismos coliformes de acuerdo con la tabla correspondiente, tomando como base el número de tubos en que se observe producción de gas.

6. Reportar: Numero más probable (NMP) de coliformes por gramo o mililitro de muestra.

Organismos Coliformes Fecales por NMP (ver figura 21)

➤ **Prueba presuntiva.**

1. Realizar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3} .
2. Inocular 1 mL de cada dilución a cada uno de 3 tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa.
3. Examinar los tubos a las 24 ± 2 horas y observar si hay producción de gas en la campana de fermentación, si no lo hay seguir incubando hasta las 48 ± 2 horas.

La presencia de gas, en cualquier cantidad, dentro del tiempo de incubación hace positiva la prueba.

➤ **Prueba confirmativa.**

1. Agitar suavemente los tubos de caldo lauril sulfato triptosa que resulten positivos.
2. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo a tubos de caldo EC. (Eijkman).
3. Incubar los tubos de $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ en baño de agua y observar si hay producción de gas a las 24 o 48 horas.
4. La presencia de gas en cualquier cantidad, dentro de las 48 horas de incubación, hace positiva la prueba.
5. Alternativamente transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo en la prueba presuntiva, a tubos con caldo lactosa bilis verde brillante y agua peptonada. (Mackenzie).

6. Incubar los tubos a $44.5 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar si hay producción de gas a las 24 o 48 horas.
7. Adicionar al tubo de agua peptonada de 2 a 3 gotas de reactivo de Kovac (prueba indol). Una coloración roja hace positiva la prueba.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.

- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Las muestras analizadas fueron moluscos bivalvos (patas de mula), compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas.



Figura 36.
Preparación de la muestra
para su análisis.



Figura 37. Preparación
de diluciones

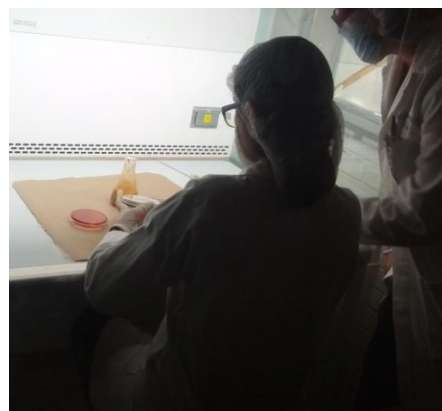


Figura 38. Siembra en placa.



Figura 39. Desarrollo colonial
Agar Bilis Rojo Violeta.

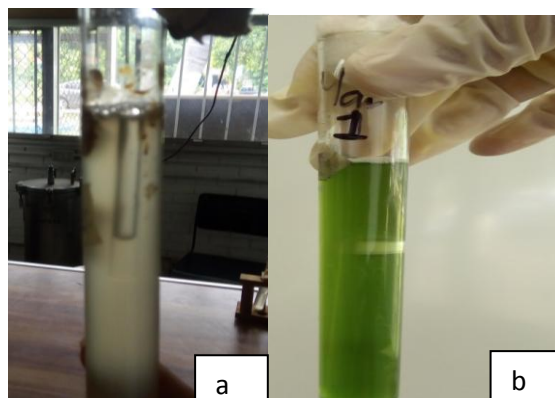


Figura 40. Bacterias Coliformes NMP
a) Prueba presuntiva b) Prueba confirmativa

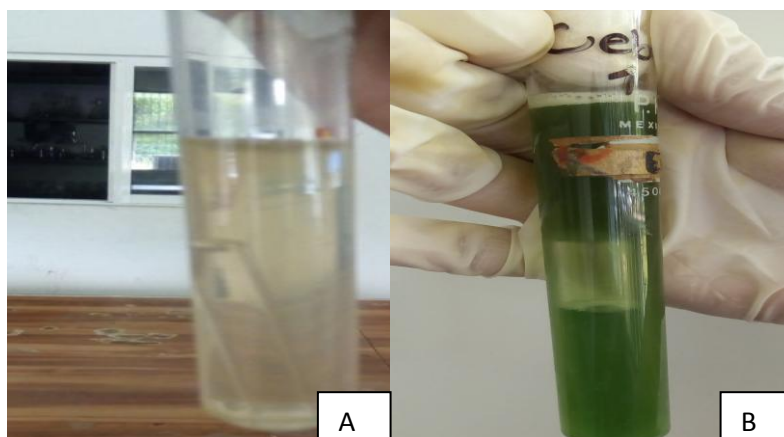


Figura 41. Coliformes Fecales NMP a) Prueba presuntiva
b) Prueba confirmativa

Tabla 10. Recuento de organismos coliformes (OC) y de organismos coliformes
fecales (OCF)

O.C. en placa	260 UFC/ g muestra
O.C. (N M P)	1.59 NMP/ g muestra
Ei jkman	1.38 NMP/ g muestra
O.C.F. (N M P)	1.44 NMP/g muestra
Mackenzie	

Según la Norma Oficial Mexicana-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, los moluscos bivalvos como las patas de mula no debe contener en análisis de coliformes totales más de 150 000 UFC/g y 10 NMP/g en punto de venta, por lo que, de acuerdo a los análisis realizados de cultivo en placa, coliformes por NMP y coliformes fecales por NMP, se indica un bajo índice de contaminación, siendo así un producto apto para consumo humano.

CONCLUSIONES

Según la Norma Oficial Mexicana-093-SSA1-1994 y los resultados obtenidos del análisis microbiológico, las muestras de pata de mula, se encuentran dentro del límite permisible de la norma correspondiente.

Se recomienda conservar viva la muestra o las patas de mula para consumo en refrigeración de 2 a 5°C, envueltas en un trapo húmedo, y por un máximo de dos días. Además también es recomendable que el consumidor, deje a las patas de mula bajo el chorro de la llave algunos segundos para quitar el excedente de lodo y tierra que por naturaleza se encuentran contenido en su concha, esto con el fin de minimizar la contaminación causada de manera natural por la suciedad de este molusco. De la misma manera, se recomienda evitar el consumo excesivo de este alimento, y en dado de caso de ser consumido con frecuencia, optar por el mejor intermediario de donde éste provenga, el cual acate las prácticas correctas de higiene, almacenaje y refrigeración necesarias para incrementar la inocuidad de dicho alimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B. y Velázquez, O. 2009. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.



Castro, M.C.M. 2013. Coliformes Totales. Escuela Superior Politecnica del Litoral.
Instituto de Ciencias Matemáticas. Ecuador.

Doyle, P.M., Beuchat, R.L. y Montville, T.J. 2001. Microbiología de los alimentos.
Fundamentos y fronteras. 1ra. Edición. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
69 11.

NOM-112-SSA1-1994. Alimentos. Cuenta de Organismos Coliformes Fecales.
Foods. Fecals Coliform Organisms Count. Normas Mexicanas. Dirección
General de Normas.

Ramos, O.L.M., Vidal, L.A., Vilardy, S.Q. y Saavedra-Díaz, L. 2011. Análisis De La
Contaminación Microbiológica (Coliformes Totales Y Fecales) en la Bahía de
Santa Marta, Caribe Colombiano. Instituto de Investigaciones Tropicales,
Universidad del Magdalena, Santa Marta, Colombia. Lina María Ramos
Ortega, Villa del Mar, Manzana K Casa 1; Santa Marta,
gfitoplancton@unimagdalena.edu.co



PRÁCTICA No. 5

RECuento DE ORGANISMOS ENTEROCOCOS

OBJETIVOS

1. Realizar la técnica para el recuento de organismos enterococos a partir de los alimentos.
2. Conocer las características generales de este grupo microbiano.
3. Describir los fundamentos y la composición de los medios utilizados para el recuento y caracterización de este grupo.
4. Conocer el significado sanitario de la presencia de este grupo microbiano en agua y alimentos.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.

- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Enterococcus son bacterias Gram positivas que habitan en el interior del tracto gastrointestinal de una variedad de organismos, incluyendo al hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva.¹ Han sido identificados como patógenos oportunistas para los humanos, pudiendo causar diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterocócicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central (aunque son raras), intra abdominal y pélvica (Porte *et al.*, 2007).

En los últimos años el género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia al nivel internacional por su elevada incidencia en las enfermedades nosocomiales y por la adquisición de resistencia a muchos antimicrobianos. De igual manera, son considerados indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues debido a su amplia distribución, pueden encontrarse en estos productos y sobrevivir a los procesos de tratamiento a que son sometidos, por su elevada resistencia a condiciones adversas. Igualmente, se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de contaminación fecal de las aguas, y se consideran como el indicador más eficiente para evaluar la calidad del agua de mar para uso recreativo (Sánchez y Tapia, 2006).

El Sistema Nacional de Vigilancia de las Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos (NNIS) ha considerado al género *Enterococcus* como la tercera causa más frecuente de infecciones nosocomiales, siendo estas bacterias las responsables de más del 10 % de todas las infecciones adquiridas en los hospitales de acuerdo con Acosta (2005). Pueden adaptarse a vivir en los ambientes más hostiles, incluso en presencia de niveles letales de sales biliares y detergentes, tales como el dodecil sulfato de sodio. Esta habilidad de *Enterococcus* para adaptarse y persistir en presencia de detergentes podría permitirles sobrevivir regímenes de limpieza inadecuados, contribuyendo a su persistencia en los hospitales. Numerosos estudios epidemiológicos han mostrado que estos microorganismos pueden transmitirse de una persona a otra en el hospital por instrumentos clínicos o a través de las manos de los trabajadores de la salud (Sánchez y Tapia, 2006).

La reciente alerta sobre *Enterococcus* no solo se debe a su incremento en las infecciones nosocomiales, sino también por su resistencia a penicilinas y

cefalosporinas de varias generaciones y a la adquisición de altos niveles de resistencia a los aminoglucósidos, especialmente a la vancomicina, el antibiótico que ha sido usado para tratar las infecciones causadas por los cocos Gram positivos según Quiñones (2008). Las características intrínsecas de *Enterococcus* también les confieren un nivel inusual de tolerancia a varias clases de antibióticos. Por ejemplo, la resistencia de *Enterococcus* a los aminoglucósidos es el resultado de su habilidad para bloquear el sitio de unión de la droga a la pared celular. Como consecuencia, los aminoglucósidos son solo efectivos contra *Enterococcus* cuando se usan en combinación con antibióticos activos frente a la pared celular (Hancock y Gilmore, 2008).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.3 Contaminación de los alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.



Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

5 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
15 cajas Petri
10 Tubos de ensaye de 16 x 150
5 Pipetas de 1mL
5 Pipetas de 5 mL
5 Pipetas de 10 mL
1 Balanza analítica
1 Incubadora

REACTIVOS

Muestra determinada previamente
Solución reguladora de fosfato como diluyente
Agar KF estreptocócico
Agar BHI.
Tinción Gram
Catalasa
Agar bilis/esculina.
NaCl al 6.5%



METODOLOGÍA

Según NOM-210-SSA1-2014, Productos y Servicios. Determinación de Microorganismos Patógenos.

1. Pesar 10 g de la muestra y agregarlo a 90 mL de solución diluyente en un frasco con tapón de rosca.
2. Agitar vigorosamente durante 1 minuto.
3. Hacer diluciones decimales hasta 10^{-3} .
4. Inocular 1 mL de cada dilución en una caja de Petri.
5. Vaciar 15-20 mL de medio KF estreptocócico fundido y enfriado a 45°C adicionar 1 mL de TTC al 1% por cada 100 mL de medio.
6. Homogeneizar, dejar solidificar e incubar las placas de 48 ± 3 h a 35 ± 2 °C.
7. Contar las colonias que presentan coloración rosa intenso a rojo.
8. Escoger 5-10 colonias características y transferir a BHI e incubar a 35 ± 2 °C de 18-24 horas.
9. Realizar Pruebas Confirmativas.
 1. Preparar frotis para Gram
 2. Prueba de Catalasa
 3. Crecimiento en agar bilis/esculina 35 ± 2 °C/ 24 ± 2 horas observando color negro en el pico del agar.
 4. Crecimiento en NaCl 6.5% (BHI) 35 ± 2 °C/ 72 ± 3 horas.
 5. Crecimiento en BHI a 45 °C/ 24 ± 2 horas.

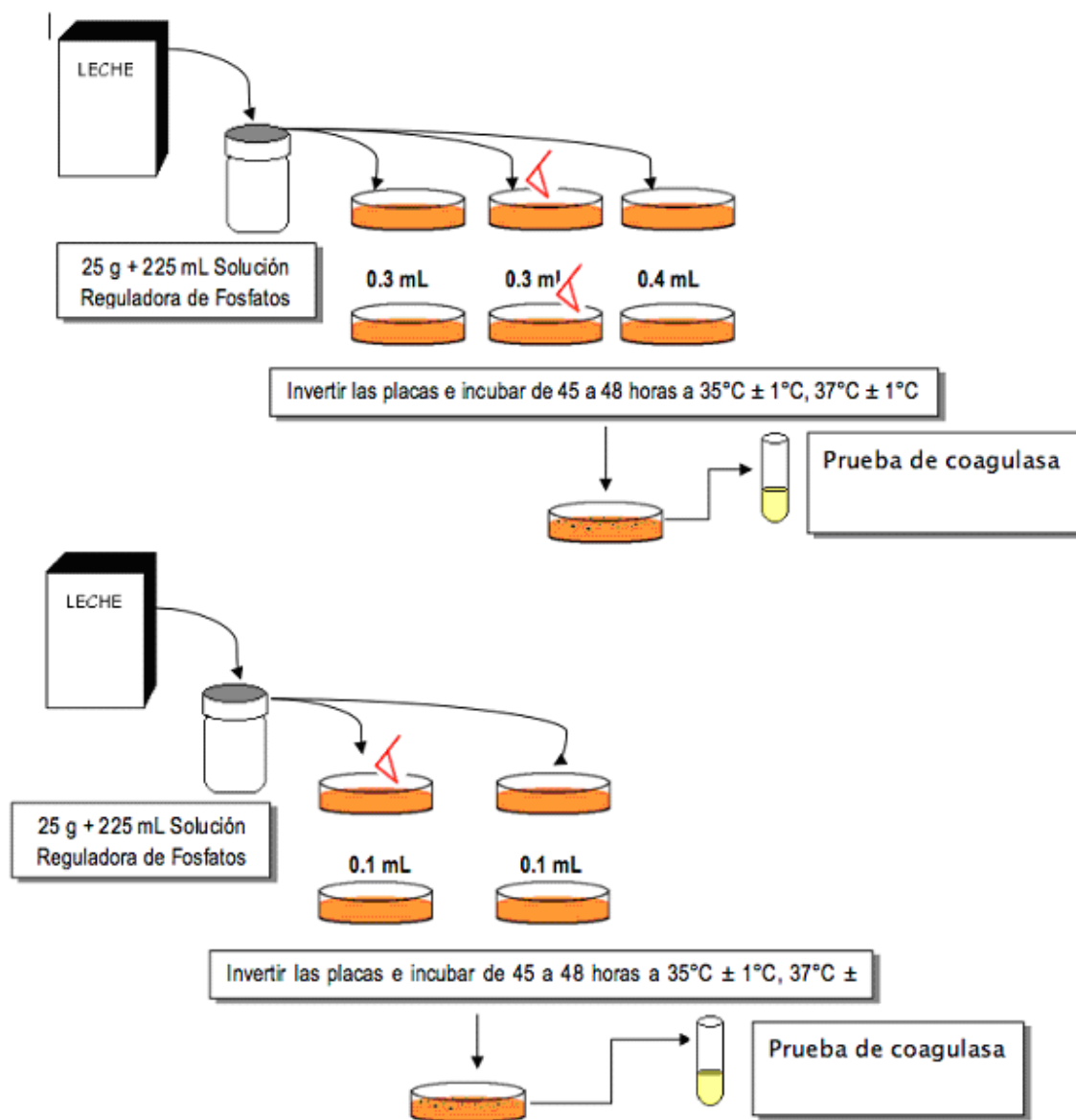


Figura 42. Diagrama de flujo para el recuento de Enterococos (NOM-210-SSA1-2014).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de ostión, comprados en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista. Los resultados indican que la muestra analizada no es apta para consumo humano según la NOM-210-SSA1-2014. En la Tabla 11 se aprecian los resultados generales arrojados por los análisis en las muestras de ostión.

Tabla 11. Resultados Enterococos

Coll/g	260 UFC/g
Morfología	Bacilos
Microscopio	Gram positivas
Catalasa	Negativa
Crecimiento en:	
Agar Bilis Esculina	Positivo
B H I 6.5% NaCl	Positivo
B H I 45°C	Positivo



Figura 43.
Homogenización
de la muestra.



Figura 44. Sembrado en
placa.

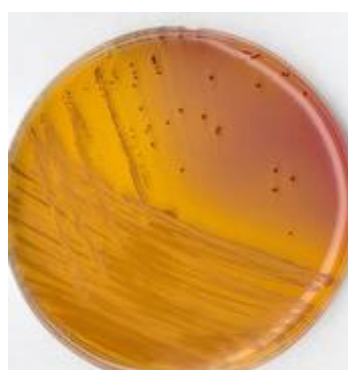


Figura 45. Agar KF
estreptocócico



Figura 46. Agar BHI

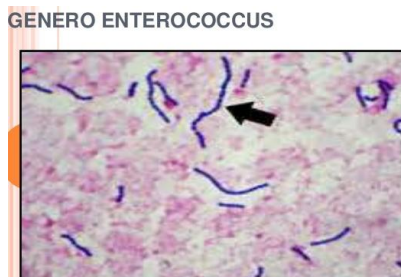


Figura 47. Examen microscópico



Figura 48. Agar bilis esculina

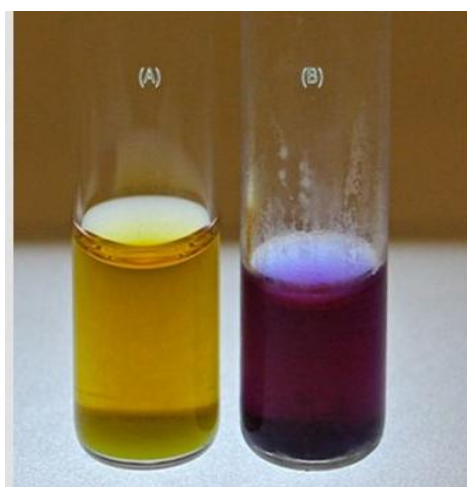


Figura 49. Crecimiento en NaCl.



Figura 50. Crecimiento en BHI.

De acuerdo a las figuras 45 y 46, se presentó desarrollo colonial en el agar KF estreptocócico y agar BHI, la figura 47 muestra el examen microscópico realizado a la muestra mediante frotis con tinción Gram. Al sembrar en agar bilis esculina (Figura 48) hubo desarrollo bacteriano y se aprecia de color negro intenso en las cajas petri. Finalmente en las pruebas con los tubos hubo crecimiento en NaCl y BHI. Lo anterior demuestra la presencia de *Enterococcus faecalis* en las muestras de ostión.

CONCLUSIONES

En los últimos años el género *Enterococcus* ha cobrado una gran importancia al nivel internacional por su elevada incidencia en las enfermedades nosocomiales y por la adquisición de resistencia a muchos antimicrobianos. De igual manera, son considerados indicadores de la inocuidad de los alimentos, pues debido a su amplia distribución, pueden encontrarse en estos productos y sobrevivir a los procesos de tratamiento a que son sometidos, por su elevada resistencia a condiciones adversas (son capaces de crecer en condiciones extremas como en NaCl al 6.5%, pH 9.6 y en un amplio intervalo de temperaturas que va desde 10 a 45°C. Además pueden crecer en presencia de sales biliares al 40% y en detergentes. Igualmente, se encuentran dentro del grupo de microorganismos indicadores de contaminación fecal de las aguas, y se consideran como el indicador más eficiente para evaluar la calidad del agua de mar para uso recreativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta Gnass, S. 2005. *Enterococcus*. Buenos aires: Grupo Asesor Control de Infecciones y Epidemiología. P. 1-15. Disponible en:

<http://www.codeinep.com.ar/control/Enterococcus.pdf>

Hancock, L.E. y Gilmore, M.S. 2008. Pathogenicity of Enterococci. Department of Microbiology and Immunology. Oklahoma: University of Oklahoma Health Sciences Center. P. 8-251.

Porte, L., Hervé, B., Prat, S. y Chanqueo, L. 2007. *Enterococcus* sp. Parte I. Rev Chil Infect; 24(3):231.

C. Corsario I No. 203, Colonia Urías, C.P. 82070; Mazatlán, Sinaloa.
Tels. (669)983-84-00, 990-02-09, 991-10-61,
e-mail: dirección@itmazatlan.edu.mx
www.itmazatlan.edu.mx



Quiñones Pérez, D., Marrero, D., Falero, B., Tamargo, I., Llop, A. y Kobayashi, N. 2008. Susceptibilidad antimicrobiana y factores de virulencia en especies de *Enterococcus* causantes de infecciones pediátricas en Cuba. Rev Cubana Med Trop 60(2). Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602008000200004&lng=es

Sánchez, A.D. y Tapia, R.R. 2006. Reporte del primer caso de infección por *Enterococcus faecalis* resistente a Vancomicina en un servicio de medicina interna. Clínica y Ciencia; 3(2):11-4.



PRÁCTICA No. 6

RECuento DE *BACILLUS CEREUS* EN ALIMENTOS MARINOS

OBJETIVOS

1. Conocer los métodos para la cuantificación de *B. cereus* a partir de alimentos.
2. Conocer el fundamento de los medios de cultivo utilizados para el recuento de *B. cereus*.
3. Conocer la morfología colonial características de *B. cereus* en los medios de cultivo utilizados.
4. Conocer el fundamento de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de *B. cereus*.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.

- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y aislamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Bacillus cereus es un bacilo Gram positivo formador de esporas, es móvil, aerobio, pero es capaz de crecer anaeróbicamente en medios complejos. La temperatura mínima de crecimiento es de 10 a 20°C, la óptima de 30 a 35°C y la máxima es de 35 a 45°C. Crece en un intervalo de pH de 4.9 a 9.3 y en una actividad acuosa (a_w) mínima de 0.95 (Agata *et al.*, 2005).

Este organismo está ampliamente distribuido en la naturaleza, se encuentra en el suelo y en el polvo, se ha aislado de frutas, verduras, erales, harinas, almidones, productos para pastelería, sopas, especias, leche ruda, pasteurizada y en polvo,

remas y budines, papas, salsas, entre otros. En la primera mitad del siglo diferentes informes en la literatura europea, mencionan a bacilos formadores de esporas en enfermedades transmitidas por alimentos, sin embargo a partir de 1950 ha existido un incremento en el número de informes, en los cuales se establece a *B. cereus* como responsables de enfermedades transmitidas por alimentos. En Europa es uno de los principales microorganismos causantes de gastroenteritis, en Estados Unidos se han reportado pocos brotes y en nuestro país se carece de datos en cuanto a la frecuencia con que aisla de los alimentos, así como de si ha causado o no brotes (Wijnand *et al.*, 2006).

Se atribuyen a *B.cereus* diferentes padecimientos en el hombre (conjuntivitis, iridociclitis purulenta, panoftalmia hemorragia, bronconeumonía, infecciones urinarias, heridas ulceradas, septicemias, meningitis, endocarditis y osteomielitis) los cuales se presentan de acuerdo a las condiciones de salud del huésped, pero el de mayor importancia es la gastroenteritis y en los animales la más común es la mastitis bovina. La gastroenteritis se manifiesta por un cuadro emético se presenta de 1-5 hrs. después de ingerir el alimento y se caracteriza por un ataque agudo de náuseas y vómito, dolor abdominal, diarrea ocasionalmente y no hay fiebre. El cuadro tipo diarreico se presenta después de 6-12 hrs. de la ingestión del alimento y se caracteriza por la presencia de dolor abdominal, diarrea profusa acuosa, tenemos retal, náuseas moderadas, con rara sensación de vómito, la fiebre no es común, teniendo una duración de 12 a 18 hrs (Beattie y Williams, 2009).

De acuerdo con Hansen y Hendriksen (2011), Las esporas de *B. cereus* sobreviven al procedimiento de cocción de los alimentos y sus células vegetativas pueden desarrollar rápidamente. Se ha visto que se requiere un número elevado de microorganismos viables para causar la enfermedad (de 10^6 a 10^9) lo cual se

favorece en sitios donde se preparan alimentos en grandes cantidades (como guarderías, restaurantes, hospitales, centros de trabajo etc.) y se cocinan en recipientes muy grandes que dificultan la refrigeración, además de calentarse y recalentarse inadecuadamente. Cuando se encuentra presente el microorganismo en los alimentos y este se encuentra en condiciones óptimas para su desarrollo en 10 hrs. puede llegar a alcanzar el número adecuado para causar la enfermedad. Las metodologías utilizadas para el recuento de este microorganismo aprovechan las siguientes características:

- 1) *B. cereus* produce en los medios de cultivo con yema de huevo una enzima (lecitinasa) que proporciona turbidez alrededor de la colonia, a esta enzima se le ha llamado factor yema de huevo
- 2) Este microorganismo es resistente a la polimixina B.

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.4 Alteración de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los



resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

3 cajas Petri

5 Pipetas de 5 o 10 mL

1 Varillas de vidrio de 3.5 mm de D. y 20 cm de largo, dobladas en ángulo recto

1 Espátula

1 Balanza analítica

1 Incubadora

1 Asa bacteriológica

3 Portaobjetos

3 Cubreobjetos

1 Microscopio

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Agar KG o MYP





Tinción gram
Caldo nitrato
ácido sulfanílico
alfa naftilamina

METODOLOGÍA

Basada en *International Standard Organization ISO 7932: 2006*

1. Pesar 10 g de la muestra y colocarlos en un frasco con 90mL de solución diluyente y homogeneizar.
2. Preparar las diluciones decimales hasta la dilución 10^{-5} en tubos con 9 mL de solución diluyente.
3. Inocular 0.1 mL de cada dilución sobre la superficie de las placas del medio KG o MYP (una placa por dilución), y extender con varilla de vidrio.
4. Incubar a 30 – 32°C durante 24 horas.
5. Seleccionar para el recuento las placas que contengan un número de colonias que permiten observar con claridad los halos turbios característicos de este microorganismo.
6. Contar las colonias típicas de *B. cereus* las cuales son redondas, planas, secas, translucidas, cremosas, rodeadas por un halo denso de precipitación sobre el fondo rojo violeta del medio.
7. Confirmar la presencia de este microorganismo de la siguiente manera:
 - a) Transferir de 5 a 10 colonias sospechosas, de la placa seleccionada (que contenga alrededor de 100 colonias), cada a un tubo de gelosa nutritiva inclinado e incubar a 30 – 32°C/ 24 horas.
 - b) Preparar un frotis y teñirlo por la técnica de Gram, observar la pureza del cultivo.



- c) Preparar una suspensión del microorganismo en solución salina y observar al microorganismo para determinar su movilidad (del 50% al 90% de las cepas son móviles).
- d) Si el cultivo esta puro y es móvil continuar con el estudio.
- e) Inocular tubos de fermentación con caldo salicina y Voges-Proskauer.
- f) Incubar a 30-32°C durante 24 h, excepto el último agar (48 horas).
- g) Comparar los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas con los señalados en el cuadro correspondiente (*B. cereus*).
- h) La prueba de reducción de nitratos a nitritos se lleva a cabo adicionando al caldo nitrato 0.5 mL de ácido sulfanilico y 0.5 mL de alfa naftilamina, se agita y se observa la presencia de una coloración rosa o roja (prueba positiva).
- i) Para la prueba de hidrólisis del almidón se cubre la placa con solución de lugol y después de 30 a 60 segundos se conserva la formación de halos incoloros alrededor de las colonias amilolitias (prueba positiva).

A partir del porcentaje de colonias confirmadas de *B. cereus* calcular el número de microorganismo por gramo de muestra. No olvidar que el volumen de dilución inoculado en las placas es de 0.1 mL.

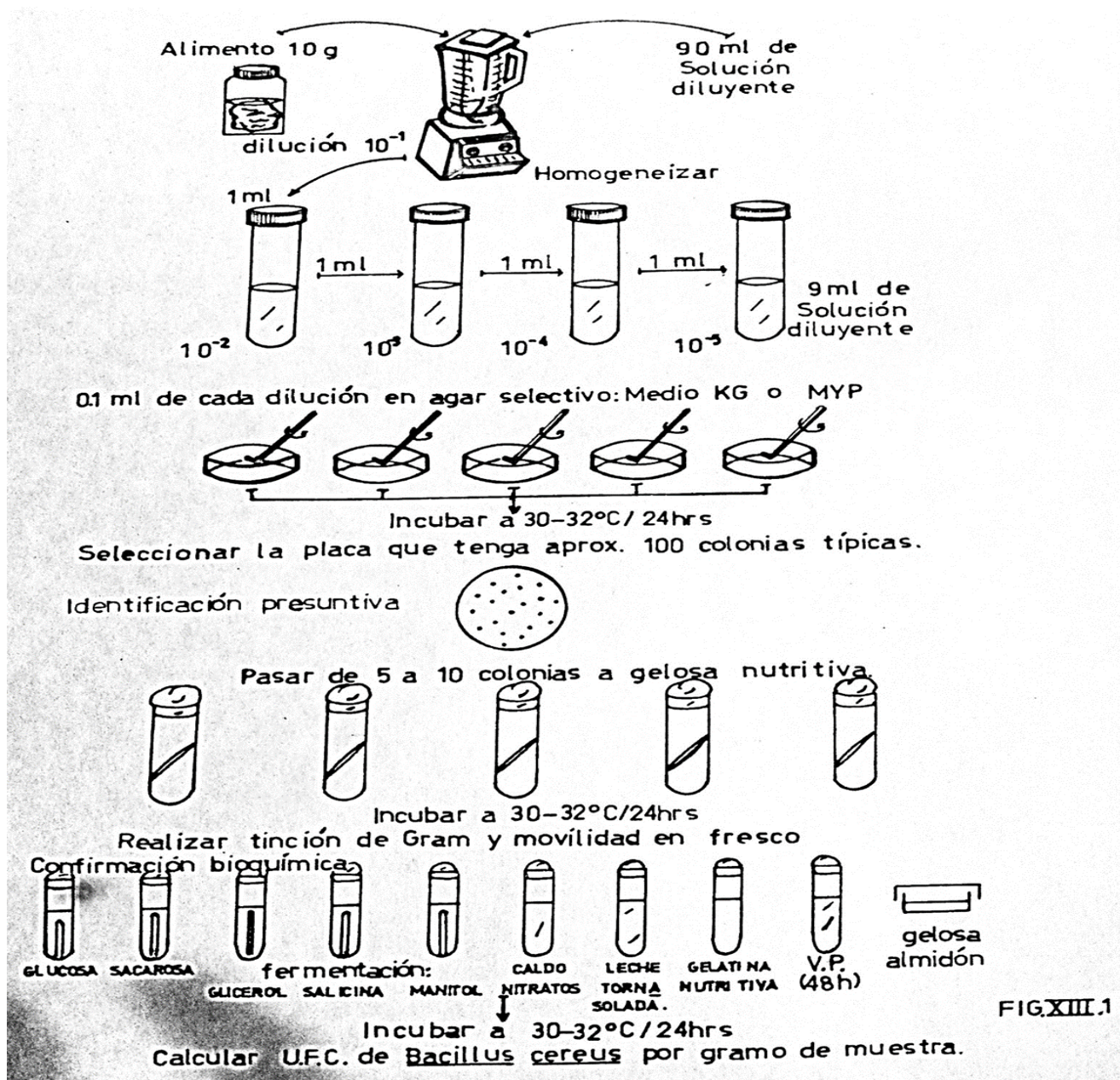


Figura 51. Recuento de *Bacillus cereus* a partir de alimentos (ISO 7932: 2006)

➤ **Técnica de aislamiento de *Bacillus cereus* de Glenn-Antillon-García**

1. Pesar 50 g de la muestra en forma aséptica y depositarlos de dentro de un matraz con 450 mL de agua peptonada al 0.1% estéril y homogeneizar.
2. A partir de la dilución original (1:10) realizar diluciones decimales hasta la dilución 10^{-9} en tubos con mL de caldo soya tripticasa.
3. Incubar los tubos 24 horas a 30-32°C.
4. Tomar 0.1 mL de aquellos que muestren turbiedad y esparcirlos con asa por estría cruzada sobre placas de agar KG y/o MYP.
5. Incubar las placas 24 horas a 30-32°C. Seleccionar las colonias típicas de *Bacillus cereus*, las cuales son redondas, planas secas, translúcidas, cremosas, de bordes irregulares, rodeadas por un halo denso de precipitación sobre el fondo rosa o rojo violeta del medio.
6. Confirmar la presencia de este microorganismo de la siguiente manera.
 - a) Transferir 3 colonias sospechosas, cada una a un tubo de gelosa nutritiva inclinado, e incubar a 30-32°C por 24 hrs.
 - b) Preparar un frotis y teñirlo por Gram, observar la pureza del cultivo.
 - c) Preparar una suspensión del microorganismo para determinar su movilidad (del 50-90% de las cepas son móviles).
 - d) Si el cultivo está puro continuar con el estudio
 - e) Inocular tubos de fermentación con caldo salicina y caldo manitol, y tubos con caldo nitrato, leche tornasolada, gelatina nutritiva, gelosa almidón y caldo Voges-Proskauer.

El número de *Bacillus cereus* por gramo se determina tomando el recíproco de la dilución más alta en la que se confirma su presencia



SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de moluscos bivalvos (patas de mula), las cuales fueron compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Las muestras analizadas no fueron aptas para consumo humano (tabla 12). Las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación.



Figura 53. Muestra de moluscos



Figura 54. Diluciones de la muestra



Figura 55. Desarrollo colonial agar MYP.

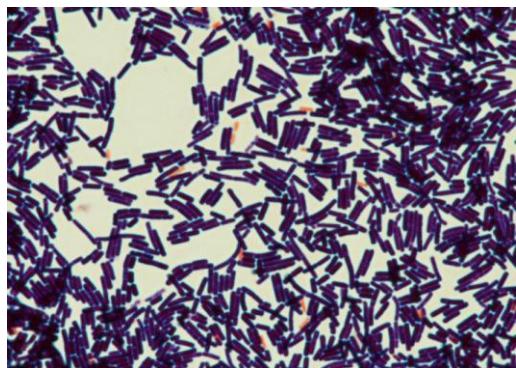


Figura 56. Tinción gram *B.cereus*



Figura 57. Voges-Proskauer

Prueba positiva: Rojo sin Zinc, Amarillo con Zinc
Prueba negativa: Amarillo sin Zinc, Rojo con Zinc

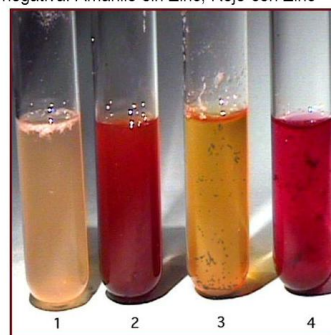


Figura 58. Reducción de nitratos a nitritos.

Tabla 12. Recuento de *Bacillus cereus*

Muestra	Diluciones					Colonias Presuntivas	Colonias Confirmadas	Total de coll/g
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵			
Ejemplo								
Orégano	2	0	0	0	0	2	1	100
Problema:								
Moluscos								
Bivalvos	2	0	1	0	0			
Patas de mula						3	2	200

En la Tabla 12 se puede apreciar que se determinaron 300 UFC/ g de muestra, de acuerdo con la NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, los moluscos bivalvos como las patas de mula no debe contener *Bacillus cereus*, debido al gran riesgo que representa para la salud del consumidor, por lo que de acuerdo al análisis, se indica alto índice de contaminación y por lo tanto el producto no es apto para consumo humano.

CONCLUSIONES

Usualmente los alimentos se contaminan con *B. cereus* debido a contaminación cruzada, ya que este microorganismo se encuentra principalmente libre en el ambiente, produce endosporas que sobreviven a la pasteurización y son resistentes a varios desinfectantes. Causa dos tipos de intoxicaciones, según la toxina involucrada: síndrome emético y síndrome diarreico. Según la cepa, producen una u otra toxina, pero hay algunas que tienen la capacidad de sintetizar las dos. El tipo de enfermedad predominante varía por regiones



geográficas según la distribución de las cepas de *Bacillus cereus* y la dieta típica de cada zona. Ambas intoxicaciones gastrointestinales tienen corto período de incubación (menos de 12 horas), son sintomáticas (principalmente diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómito) y son autolimitadas, se resuelven en 12 a 24 horas sin necesidad de tratamiento con antimicrobianos. En la mayoría de los casos para el tratamiento alcanza con la hidratación adecuada del paciente durante el proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agata N, Ohta M, Mori M, Isobe M. 2005. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiol Lett.* 129:17-20.

Beattie SH, Williams AG. 2009. Detection of toxigenic strains of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. with an improved cytotoxicity assay. *Lett App Microbiol.* 28:221-5.

Hansen BM, Hendriksen NB. 2011. Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *App Environ Microbiol.* 67(1):185-9.

Wijnands LM, Dufrenne JB, van Leusden FM. 2006. The pathogenic mechanism of the diarrheal syndrome caused by *Bacillus cereus*. Available from: <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/250912001.pdf>



PRÁCTICA No. 7

AISLAMIENTO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN ALIMENTOS MARINOS

OBJETIVOS

1. Identificar y aislar colonias de *Vibrio parahaemolyticus* en alimentos marinos.
2. Conocer los métodos para la identificación de *V. parahaemolyticus* a partir de alimentos.
3. Conocer el fundamento de los medios de cultivo utilizados para el recuento de *V. parahaemolyticus*.
4. Conocer la morfología colonial características de *V. parahaemolyticus* en los medios de cultivo utilizados.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.

- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, halofílico, cuyo reservorio son las aguas con alta concentración de sal. Es responsable de brotes de gastroenteritis aguda por ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos. Ocasionalmente se ha descrito asociado a infección de heridas y sepsis. El riesgo de infecciones sistémicas graves y muerte por esta bacteria es mayor en edades extremas, pacientes inmunocomprometidos y con patología de base (FDA, 2012).

Vibrio parahaemolyticus es un patógeno humano que está ampliamente distribuido en los ambientes marinos. Este organismo se aísla con frecuencia de una variedad de productos del mar crudos, particularmente mariscos. El consumo de mariscos crudos o poco cocidos contaminados con *V. parahaemolyticus* puede conducir al desarrollo de una gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, dolor de cabeza, vómitos, náuseas y calambres abdominales. También se ha aislado a partir de infección de heridas y septicemias. Pero en Chile, hasta el momento, no se han reportado infecciones extraintestinales. La mayoría de los casos no son fatales. Esta bacteria es reconocida como la principal causa de gastroenteritis humana asociada con el consumo de mariscos en los Estados Unidos y un importante patógeno transmitido por los mariscos en todo el mundo. Chile enfrentó su primer brote en 1997-1998. Posteriormente han seguido habiendo brotes y casos. Todos asociados al consumo de mariscos (Lozano *et al.*, 2003).

El género *Vibrio*, perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, cuenta con 48 especies, de las cuales, al menos 12 son reconocidas como patógenos humanos (Heitmann *et al.*, 2005). De éstos, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son los vibriones patogénicos más importantes, tanto en términos de la capacidad causante de enfermedad como en la magnitud de la carga global de morbilidad de acuerdo con Balakrish y Hormazábal (2005). El *V. parahaemolyticus* es un bacilo gramnegativo, levemente curvo, aerobio facultativo, halofílico, oxidasa positiva, fermentador de glucosa, pero no de sacarosa, y ureasa variable. Requiere de medios selectivos para su desarrollo, con una concentración de NaCl de 1% (Heitmann *et al.*, 2005). Según ESR (2011) el género *Vibrio* presenta las siguientes características:

- ✓ **Temperatura:** El óptimo de crecimiento es a los 37°C, con un rango que abarca entre los 5 y 43°C. Cuando el patógeno se encuentra en condiciones de temperaturas óptimas, el crecimiento es muy rápido.

Sobrevive a la congelación, aunque el número se reduce 10-100 veces. El organismo muere a temperaturas de 0-5°C (bajo su temperatura mínima). Por otra parte, cocinar a una temperatura interna de 65°C inactiva efectivamente a este organismo.

- ✓ **pH:** El óptimo para el crecimiento es un pH entre 7,8 y 8,6, con un rango entre 4,8 y 11. El pH mínimo para crecimiento disminuye a medida que la temperatura de incubación aumenta hacia el óptimo. El crecimiento se inhibe en presencia de ácido acético al 0,1% (pH 5,1). El tiempo térmico D, este aumenta a medida que el pH aumenta de 5,0 a 8,0.
- ✓ **Oxígeno:** Puede crecer en presencia o ausencia de oxígeno, pero crece óptimamente bajo condiciones aeróbicas.
- ✓ **Actividad de agua:** Es muy sensible al secado. El agua dulce inactiva al organismo.
- ✓ **Conservantes:** Es altamente sensible a 50 ppm de hidroxianisol butilado. Se inhibe con 0,1% de ácido sórbico.
- ✓ **Desinfectantes:** Tiempos D de 15 segundos cuando se expone a 13 ppm de cloro o yodoformo.

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.4 Alteración de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías

convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

6 cajas Petri

10 Pipetas de 5 o 10 mL

1 Espátula

1 Balanza analítica

1 Incubadora

1 Asa bacteriológica

1 Autoclave

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Solución salina al 0.85%

Antisuero polivalente para *v. parahaemolyticus* 01

Desoxicolato de sodio.

Agar sangre

METODOLOGÍA

Según NOM-031-SSA1-1993, Bienes y Servicios. Productos de la pesca. Moluscos bivalvos frescos-refrigerados y congelados. Especificaciones sanitarias.

➤ **Prueba de aglutinamiento con antisuero para *Vibrio parahaemolyticus***

1. En un portaobjetos limpio desengrasado colocar con una pipeta de 10 microlitros 1 gota de solución salina al 0.85%.
2. Del crecimiento en base de agar sangre (BAB) de la cepa a confirmar, tomar una asada y hacer una suspensión homogénea en la solución salina.
3. Depositar con una pipeta de 10 microlitros 1 gota de antisuero polivalente para *V. parahaemolyticus* 01.
4. Mezclar ambas gotas con un aplicador y observar si hay aglutinación macroscópica.
5. Se considera *V. parahaemolyticus* 01 si la aglutinación es positiva.
6. Se considera *V. parahaemolyticus* no 01 si la aglutinación es negativa.

➤ **Prueba del collar (String test)**

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado colocar 1 gota de desoxicolato de sodio al 0.5%.
2. Tomar una asada del crecimiento en base de agar sangre (prueba de oxidasa positiva) y re suspender en la gota de desoxicolato de sodio.
3. Levantar el asa de la suspensión (± 2 cm) y observar si se presenta la formación de un cordón continuo o en forma de collar.
4. **Formación del collar positivo:** Genero *vibrio* y algunas cepas *Aeromonas*.

Formación del collar negativo: Otras bacterias.

Tabla 13. Diferenciación bioquímica entre *V. parahaemolyticus* y otras bacterias.

Prueba	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Enterobacterias</i>
Oxidasa	+	+	+	-
D- glucosa-ácido	+	+	+	+
D-glucosa-gas	-	+	-	D
Lactosa-ácido	-	D	D	D
Lisina- descarboxilasa	+	+	+	D
Arginina dihidrolasa	-	+	+	D
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	D
Movilidad (36°C)	+	+	+	D
Indol	+	+	+	D
Urea	-	-	-	D
Citrato de Simmons	+	D	-	D
Malonato	-	-	-	D
+: Positivo; d: diferentes reacciones; -: negativo.				

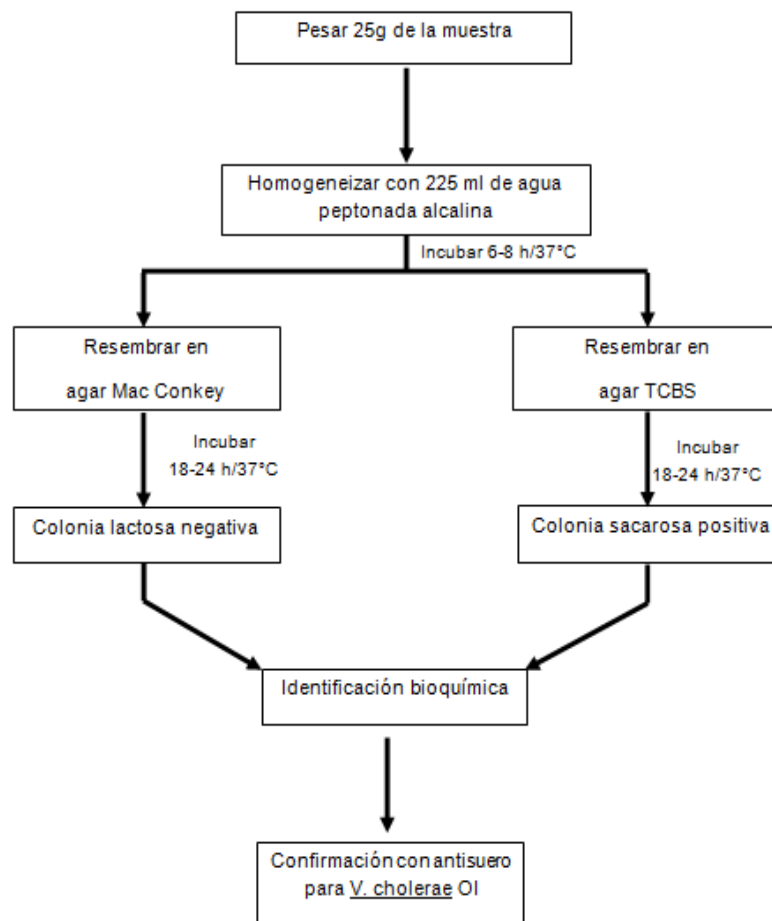


Figura 59. Diagrama de flujo para determinación de *Vibrio parahaemolyticus* (NOM-031-SSA1-1993).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la

inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental.

- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*), las cuales fueron compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista.



Figura 60. Muestra de camarón



Figura 61. Dilución de la muestra de camarón



Figura 62. Desarrollo colonial agar sangre



Figura 63. String test

El análisis de las muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*) arrojaron como resultado aglutinación negativa y formación del collar positiva, lo que indica la presencia del genero *Vibrio*. La muestra analizada no es apta par a consumo humano según NOM-031-SSA1-1993.

CONCLUSIONES

Se estima que se requiere la ingestión de 2×10^5 - 3×10^7 células para causar enfermedad en adultos sanos, pero puede ser menor en presencia de antiácidos o alimentos *V. parahaemolyticus* es una bacteria de la familia *Vibrionaceae*, a la

cual también pertenecen *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus*, especies más frecuentes causantes de infección intestinal a través del consumo de alimentos. Se encuentra principalmente en ambientes marinos, por lo que los alimentos que provienen de esta hábitat son considerados los principales vehículos de transmisión del agente etiológico al ser humano, provocando cuadros de gastroenteritis e inclusive septicemia. En un principio, esta bacteria se consideró limitada a Japón, en donde persiste como un riesgo a la salud; sin embargo se ha reportado como fuente de infecciones a lo largo de las costas de todo el mundo cuando la temperatura se eleva sobre los 20°C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balakrish, G.N. y Hormazábal, O. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic.

Retrieved from:

https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid...10182005000200002

ESR. 2001. Microbial Pathogen Data Sheets: *Vibrio parahaemolyticus*. Retrieved from:

http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/Vibrio_Parahaemolyticus-Science_Research.htm

FDA. 2012. Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, 2nd ed, US Food and Drug Administration, Silver Spring. P. 17–20. From:

<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm2006773.html>



Heitmann, G.; Jofré, M.; Hormázabal, O.; Carlos, J.; Olea, N.; Vallebuona, S. y Valdés, H. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. Revista chilena de infectología 22(2): 131-140.

Lozano-León, A.; Torres, J.; Osorio, C. R. y Martínez-Urtaza, J. 2003. Identification of tdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. FEMS microbiology letters 226(2): 281-284.



PRÁCTICA No. 8

IDENTIFICACIÓN DE *VIBRIO CHOLERAE* EN ALIMENTOS MARINOS

OBJETIVOS

1. Identificar y aislar colonias de *V. cholerae* en alimentos marinos.
2. Conocer los métodos para la identificación de *V. cholerae* a partir de alimentos.
3. Conocer el fundamento de los medios de cultivo utilizados para el recuento de *V. cholerae*.
4. Conocer la morfología colonial características de *V. cholerae* en los medios de cultivo utilizados.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.

- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), pueden ser de tipo infeccioso y de origen químico, como las intoxicaciones. La incidencia de estas enfermedades constituye uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo contemporáneo y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria (Kaysner y De Paola, 2008).

Entre los alimentos involucrados en ETA's que están contaminados por *V. cholerae* resaltan los moluscos bivalvos así como los crustáceos y los pescados



frescos refrigerados y congelados. Estos productos pueden generar enfermedades a los consumidores debido a que desde su origen están sometidos a contaminación microbiológica y química entre otras, aunado a la forma de consumo que en muchos casos es cruda. El fin principal de la Norma Oficial Mexicana que regula estos productos desde el punto de vista sanitario es el de proteger la salud del consumidor (OMS, 2011).

El cólera es una enfermedad relacionada con el abastecimiento de aguas con poca higiene, o bien de los alimentos provenientes de aguas contaminadas con materia fecal y que se consumen crudos. También puede aparecer *V. cholerae* O1 en moluscos bivalvos, crustáceos o pescados que se obtienen de aguas no contaminadas en donde el microorganismo forma parte de la microbiota autóctona. La enfermedad del cólera fue descrita por primera ocasión por Pacini en 1854. Esta se presenta por la ingesta de la bacteria viable, la cual se establece en el intestino delgado y libera una toxina termolábil. La producción de esta toxina provoca diarrea acuosa causando los síntomas característicos del cólera. Los síntomas del cólera asiático pueden ir desde una diarrea acuosa ligera, hasta una diarrea severa con aspecto de “agua de arroz” (OPS, 2005).

El establecimiento de la enfermedad por lo general es repentino, con periodos de incubación que varían entre las 6 h. y los 5 días. Esta enfermedad generalmente es autolimitante. Las personas con cólera requieren de hidratación intravenosa u oral con soluciones que contengan cloruro de sodio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio y glucosa, ya que la muerte sobreviene debido a la deshidratación y pérdida de electrolitos esenciales. Mediante estudios en personas voluntarias saludables, se ha demostrado que la dosis infectiva necesaria para provocar la enfermedad es aproximadamente de un millón de organismos, y se ha concluido que una vez adquirido el cólera la administración de tetraciclina así como de



antiácidos, mejora rápidamente el curso de la enfermedad. El género *Vibrio* incluye a los bacilos rectos o curvos Gram-negativos, oxidasa positivos (excepto las especies *metschnikovii* y *gazogenes*), anaerobios o anaerobios facultativos (Ministerio de salud de la nación, 2011).

Muchas especies de *Vibrio* spp. son patógenas para humanos y están implicadas en toxiinfecciones transmitidas por alimentos. La mayoría de los microorganismos que pertenecen a este género no crecen en medios sin cloruro de sodio a excepción de *V. cholerae* y *V. mimicus*, por lo tanto, debido a esta característica no es considerado un vibrio halófilico, aunque requieran trazas del ión sodio para su crecimiento. Las especies de *Vibrio cholerae* comprenden varios grupos antigénicos somáticos incluyendo el grupo O1, el cual se asocia con los biotipos clásico y El Tor. A su vez, este grupo O1 puede tener varios serotipos incluyendo Inaba, Ogawa e Hikojima. Las especies de *V. cholerae* no-O1 (referidos en la literatura como vibrios no aglutinables o NAG), se encuentran en aguas estuarinas y pueden causar enfermedad gastrointestinal, aunque típicamente es menos severa que la causada por el *V. cholerae* O1 (SINAVE, 2007).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

1.4 Alteración de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos



alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

6 cajas Petri

10 Pipetas de 5 o 10 mL

1 Espátula

1 Balanza analítica

1 Incubadora

1 Asa bacteriológica

1 Autoclave

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Solucion salina al 0.85%

Antisuero polivalente para v. cholerae 01



Desoxicolato de sodio.

Agar sangre

METODOLOGÍA

Según NOM-016-SSA2-2012, Para la vigilancia, prevención, control, manejo y tratamiento del cólera.

➤ **Prueba de aglutinamiento con antisuero para *Vibrio cholerae***

1. En un portaobjetos limpio desengrasado colocar con una pipeta de 10 microlitros 1 gota de solución salina al 0.85%.
2. Del crecimiento en base de agar sangre (BAB) de la cepa a confirmar, tomar una asada y hacer una suspensión homogénea en la solución salina.
3. Depositar con una pipeta de 10 microlitros 1 gota de antisuero polivalente para *V. cholerae* 01.
4. Mezclar ambas gotas con un aplicador y observar si hay aglutinación macroscópica.
5. Se considera *V. cholerae* 01 si la aglutinación es positiva.
6. Se considera *V. cholerae* no 01 si la aglutinación es negativa.

Prueba del collar (*String test*)

1. En un portaobjetos limpio y desengrasado colocar 1 gota de desoxicolato de sodio al 0.5%.
2. Tomar una asada del crecimiento en base de agar sangre (prueba de oxidasa positiva) y re suspender en la gota de desoxicolato de sodio.
3. Levantar el asa de la suspensión (± 2 cm) y observar si se presenta la formación de un cordón continuo o en forma de collar.
4. **Formación del collar positivo:** Genero *vibrio* y algunas cepas Aeromonas.

Formación del collar negativo: Otras bacterias.

Tabla 14. Diferenciación bioquímica entre *V. cholerae* y otras bacterias.

Prueba	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	<i>Enterobacterias</i>
Oxidasa	+	+	+	-
D- glucosa- ácido	+	+	+	+
D-glucosa-gas	-	+	-	D
Lactosa-ácido	-	d	D	D
Lisina- descarboxilasa	+	+	+	D
Arginina dihidrolasa	-	+	+	D
Ornitina descarboxilasa	+	-	+	D
Movilidad (36°C)	+	+	+	D
Indol	+	+	+	D
Urea	-	-	-	D
Citrato de simmons	+	d	-	D
Malonato	-	-	-	D
+: Positivo; d: diferentes reacciones; -: negativo.				

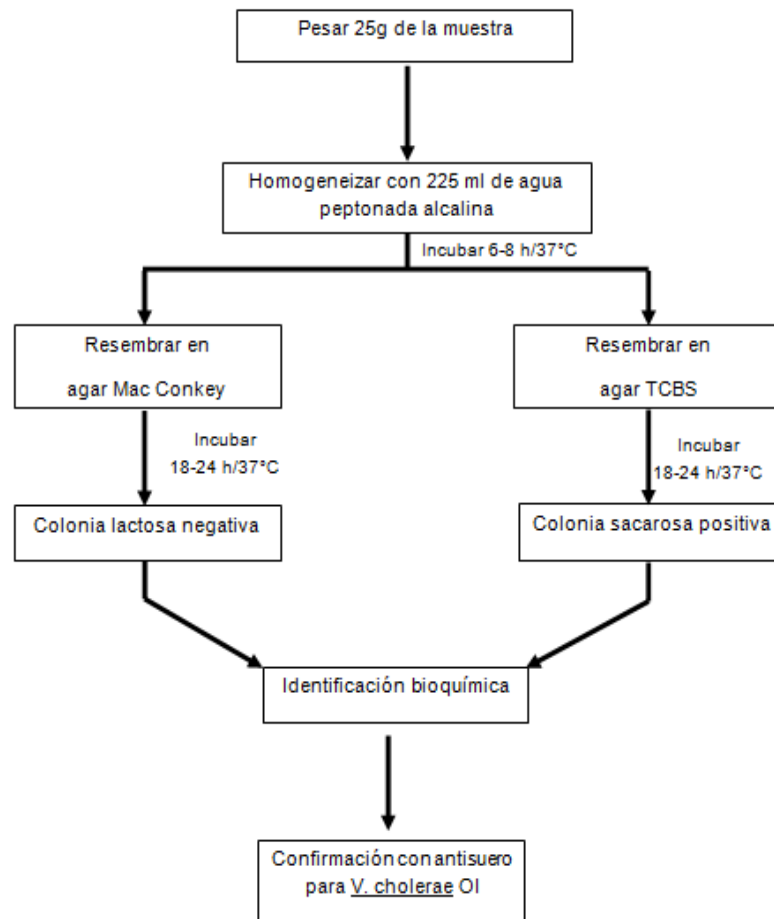


Figura 64. Diagrama de flujo *Vibrio cholerae* (NOM-016-SSA2-2012).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).

- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*), compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista. El análisis de las muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*) arrojó como resultado aglutinación negativa y formación del collar positiva, lo que indica la presencia del genero *Vibrio*

cholerae, se considera por lo tanto un producto de mala calidad, no apto para consumo humano según la NOM-016-SSA2-2012.

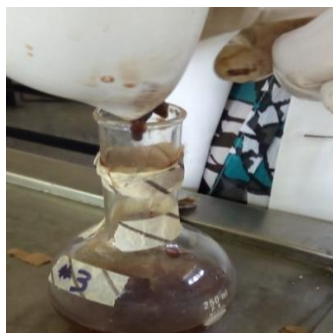


Figura 65. Preparación muestra de camarón



Figura 66. Diluciones de la muestra de camarón



Figura 67. Desarrollo colonial agar sangre *V. cholerae*.

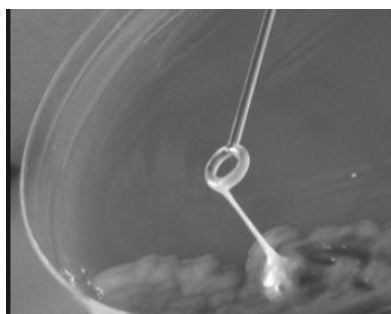


Figura 68. Prueba del collar

CONCLUSIONES

V. cholerae puede sobrevivir en ambientes acuáticos por períodos de meses a años, asociado al zooplacton y otros organismos acuáticos y en condiciones de stress puede asumir un “estado durmiente” donde la bacteria se presenta en una forma viable pero no cultivable por las técnicas tradicionales. Dicho estado le permite a *V. cholerae* sobrevivir bajo condiciones ambientales no óptimas para el crecimiento y la multiplicación celular. Se recomienda lavar



minuciosamente las frutas y verduras, principalmente las que se consumen crudas, no consumir alimentos preparados en la calle o de dudosa procedencia, lavar muy cuidadosamente todos los vegetales y frutas que se consuman crudos, dejar en remojo de 10 a 15 minutos y luego enjuagar bien. Usar agua corriente o de red o agua clorada (con el agregado de dos gotas de lavandina concentrada por cada litro de agua.) Evitar consumir pescados crudos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Kaysner C.A., & De Paola A. Jr. 2008. Vibrio. In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. P. 405-420.

Ministerio de Salud de la Nación. 2011. Plan de Abordaje Integral de la Enfermedad Diarreica Aguda y Plan de Contingencia de Cólera. Guía para el equipo de salud. Disponible:

http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/epidemiologia/GUIASMED_Abordaje%20Colera_inter.pdf

Organización Mundial de la Salud. 2011. Grupo Especial Mundial de lucha contra el cólera. Brotes de cólera: Evaluación de respuesta a los brotes y mejora de la preparación. Disponible:

http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_CDS_CPE_ZFK_2004.4_spa.pdf





Organización Panamericana de la Salud. 2005. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Disponible:
<http://www.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2g.html>

SINAVE. 2007. Manual de normas y procedimientos de Vigilancia y Control de Enfermedades de Notificación Obligatoria -Revisión nacional. Disponible:
<http://www.msal.gov.ar/htm/site/pdf/manual-normas-obligatorias.pdf>



PRÁCTICA No. 9

RECuento DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS

OBJETIVOS

1. Realizar la técnica para el recuento de *S. aureus* a partir de alimentos.
2. Conocer la composición y el fundamento de los medios utilizados en la práctica
3. Describir las ventajas y desventajas de las pruebas (termonucleasa y coagulasa) utilizadas para la identificación del microorganismo así como su relación con la capacidad de producción de enterotoxinas.
4. Determinar el riesgo potencial de los alimentos analizados en relación a su contenido de *S. aureus*.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.

- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y aislamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.
- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Los patógenos microbianos en alimentos, han sido confirmados como la causa principal de las enfermedades transmitidas por estos productos en Latinoamérica y El Caribe, destacando entre estas, las infecciones por *Salmonella* y las intoxicaciones por cepas enterotoxinógenas de *Staphylococcus aureus*. Entre 1993 y el año 2000, en esta región de la América ocurrieron 191 brotes por intoxicación estafilocócica con 6 433 afectados y 2 muertes. De estos brotes, 48 correspondieron a Venezuela, de los cuales, en 40 el queso fue el alimento involucrado, afectando a un gran número de personas (INPPAZ-OPS/OMS, 2007).

Se afirma que un número importante de cepas de *S. aureus* producen alguna de las siete enterotoxinas más conocidas, predominando en la mayoría de los brotes las enterotoxinas A y D, probablemente por formarse en los alimentos bajo condiciones de pH, aw, y Eh, más amplia que las otras. Los síntomas característicos de la intoxicación estafilocócica son náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea; se desarrollan entre 1 y 6 horas después de haber consumido el alimento, conteniendo enterotoxinas. Pueden ocurrir otras manifestaciones, como dolor de cabeza y disnea, pero con menor frecuencia, generalmente los síntomas no persisten más allá de las 24 horas; en casos severos puede haber deshidratación, originando descompensación electrolítica; las muertes son raras y puede ocurrir en ancianos, niños o personas débiles por alguna enfermedad (Bergdoll, 2010).

El *S. aureus*, es considerado omnipresente, encontrándose en las mucosas y piel de la mayoría de los animales de sangre caliente, en el humano el principal reservorio es la cavidad nasal, de donde pasan a la piel y lesiones de ésta, localizándose principalmente en los brazos, las manos y la cara; también se puede encontrar en la garganta y en el tracto intestinal, pasando de estas localizaciones al aire, polvo, ropa, utensilios y equipos, llegando a contaminar los alimentos (Jay, 2004). Se estima que un alimento es de riesgo en la intoxicación alimentaria por *S. aureus*, cuando se confirma la presencia de alguna de sus enterotoxinas o tiene una carga del microorganismo igual o superior a 10⁵ UFC/g. Generalmente, la determinación cuantitativa de *S. aureus* en alimentos se realiza con la finalidad de establecer su potencialidad para originar intoxicación alimentaria y demostrar contaminación post proceso (Lacette y Tatini, 2002).



CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

2.1 Bacterias importantes en los alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

1 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

5 cajas Petri

7 Tubos de ensaye de 16 x 150

10 Pipetas de 5 o 10 mL





5 Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro y 20 cm de largo, dobladas en ángulo recto

1 Espátula

1 Balanza analítica

1 Incubadora

1 Asa bacteriológica

3 Portaobjetos

3 Cubreobjetos

1 Microscopio

1 Autoclave

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Caldo infusión cerebro corazón

Agar baird parker

Agar azul de toluidina -DNA

Tinción gram

Plasma de conejo

METODOLOGÍA

Según NOM-115-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

1. Realizar diluciones decimales hasta 10^{-3}
2. Utilizando diferentes pipetas de 1mL para cada dilución, depositar 0.1 mL de las diluciones, sobre la superficie de placas de agar Baird Parker.
3. Distribuir el inóculo sobre la superficie del agar con varillas de vidrio estériles dobladas en ángulo recto, utilizando una para cada dilución.



4. Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.
5. Invertir las placas e incubar se 24 a 48 horas a $35 \pm 2^\circ \text{C}$.
6. Después de 24 horas seleccionar las placas de – 20 a 200 colonias aisladas, contar y marcar todas aquellas que aparezcan negras y brillantes con o sin ligero borde blanco y rodeado por Zona clara en el fondo del medio opaco.
7. Incubar las placas 24 horas más e incluir en el cómputo las colonias nuevas que reúnan las características ya señaladas.
8. Seleccionar la caja que contenga entre 50-150 colonias típicas y sembrar el número de colonias, de acuerdo al cuadro siguiente, cada una en dos tubos con caldo infusión cerebro corazón (uno para la prueba de coagulasa y el otro para la de termonucleasa), e incubarlos a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 18-24 horas (Figura 69).
9. A las cepas seleccionadas realizar un frotis, teñirlo con la técnica de Gram y practicar las pruebas de termonucleasa y coagulasa.
- 10. Prueba de coagulasa:**
 - a) Agregar a 0.2 mL del cultivo anterior, 0.2 mL de plasma de conejo diluido v/v con solución estéril de cloruro de sodio 0.15 molar.
 - b) Incubar en baño de agua a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ y observar la formación del coagulo en intervalos de 1 hora hasta cumplir 6 horas. Si no hay formación de este observar a las 24 horas y considerar la prueba positiva si hay formación de coagulo firme.
- 11. Prueba de la termonucleasa:** A la otra serie de tubos sembradas en caldo infusión cerebro corazón practicar la prueba de la termonucleasa.
 - a) En un portaobjetos con 3-4 mL de agar azul de toluidina-DNA, se efectúan orificios de 2 mm de diámetro.

- b) Calentar en baño de agua a ebullición 10 minutos el cultivo de *Staphylococcus aureus* seleccionado.
- c) Colocar una gota de cada cultivo en cada uno de los pozos e incluir a 37° C en cámara húmeda durante 4 horas. Se da como positiva la prueba con la presencia de un halo color rosa alrededor de los orificios que indican hidrólisis del DNA. Si la prueba es negativa. Dejar incubando hasta las horas.
- d) Computar el contenido de microorganismos en el producto tomando en cuenta el número de colonias, la disolución seleccionada para el recuento, y el volumen inoculado: Por ejemplo: si la disolución seleccionada para el cómputo final es 10^{-3} y se contaron 144 colonias, probar 7. Si de ellas 5 resultan positivas a la prueba de coagulasa y/o termonucleasa el cálculo final será:

7 colonias..... 5 positivas
144 colonias..... x

x = 103 colonias positivas (en la disolución 10^{-3} de placa inoculada con 0.1 mL). Responder la cifra a 2 dígitos significativos.

103..... 100

Como 0.1 mL de la disolución 10^{-3} corresponde a 1 mL de la disolución 10^{-4} . Multiplicar el número de colonias por la inversa de esta disolución.

$$100 \times \frac{1}{10^{-4}} = 100 \times 10^{-4} = 1,000,000 \text{ UFC/g o mL.}$$

- 12.** Cuenta de *Staphylococcus aureus*: si tanto la prueba de coagulasa como de termonucleasa son negativas para todas las colonias probadas informar: Cuenta de *Staphylococcus aureus*: Menos de 100 UFC/g o mL (tabla 14).

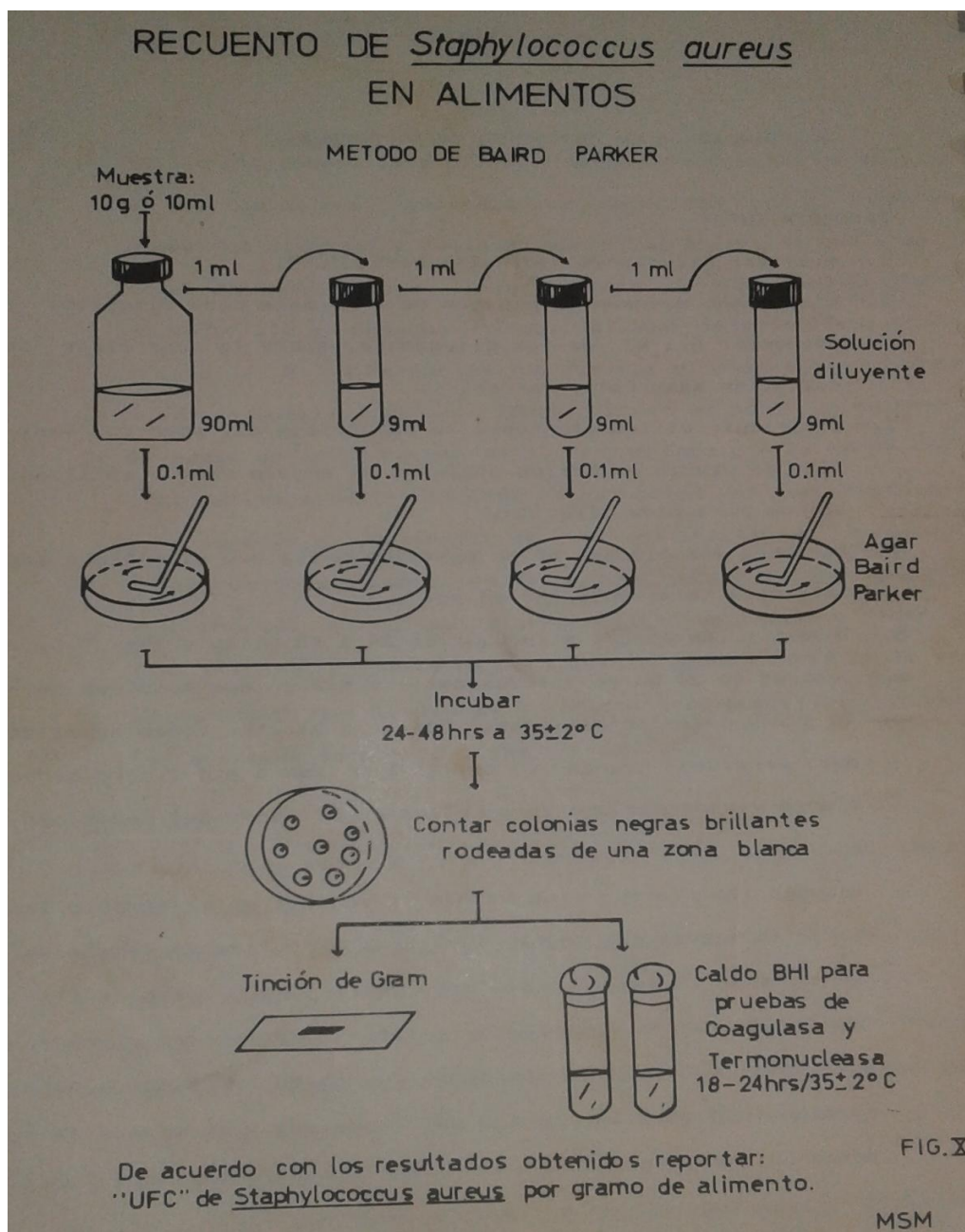


Figura 69. Recuento de *S. aureus* en alimentos (NOM-115-SSA1-1994).

Tabla 15. Colonias sospechosas de *S. aureus*

No. de colonias sospechosas en placa	Colonias por probar
Menos de 50	3
51-100	5
101-150	7

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).

- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*), compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista. En la tabla 16 se muestran los resultados de la prueba de Coagulasa y Termonucleasa de las colonias desarrolladas de *S. aureus*.



Figura 70. Muestra de camarón blanco en SRFT.



Figura 71. Siembra de muestra de camarón.



Figura 72. Desarrollo colonial en Agar Baird Parker.

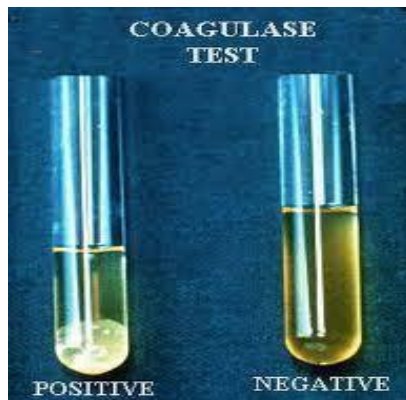


Figura 73. Prueba coagulasa

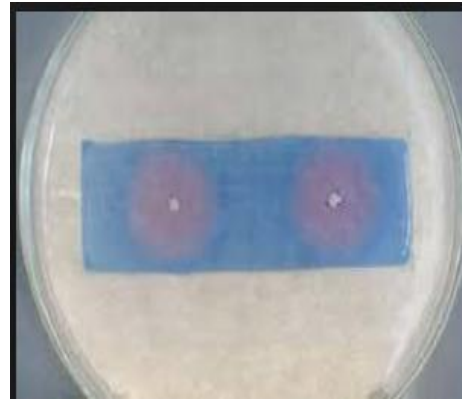


Figura 74. Prueba termonucleasa positiva.

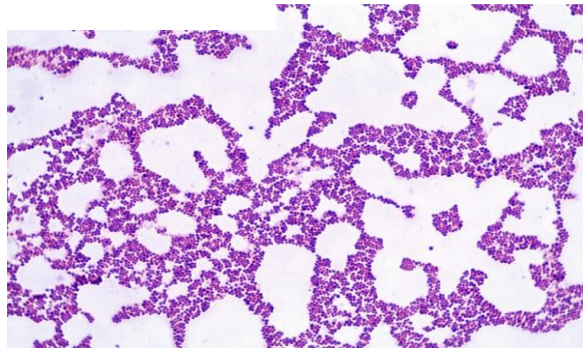


Figura 75. Tinción gram cocos en forma de racimo de uvas Gram (+)

Tabla 16. Prueba de Coagulasa y Termonucleasa para colonias de *S. aureus*.

No. Colonias	Coagulasa	Termonucleasa
1	Positivo	Positivo
2	Positivo	Positivo
3	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo
6	Positivo	Positivo
7	Positivo	Positivo

Cálculos

7 colonias..... 4 positivas

73 colonias..... X

x = 42 colonias positivas (en la disolución 10^{-3} de placa inoculada con 0.1 mL).

Responder la cifra a 2 dígitos significativos.

42..... 40

Como 0.1 mL de la disolución 10^{-3} corresponde a 1 mL de la disolución 10^{-4} .

Multiplicar el número de colonias por la inversa de esta disolución.

$40 \times 1 / 10^{-4} = 100 \times 10^{-4} = \mathbf{400,000 \text{ UFC/g de muestra}}$

CONCLUSIONES

El desarrollo de esta práctica comprobó que la termonucleasa se puede detectar en alimentos que contengan concentraciones de microorganismos en el orden de 10^6 UFC/g. Cuando no es posible utilizar métodos serológicos que resultan más costosos para la detección de las enterotoxinas, se puede aplicar esta prueba indirecta que sugiere la multiplicación invasiva de *S. aureus*.

Este método es útil para la emisión de un diagnóstico rápido; es un método sencillo, económico y de escasa manipulación. Al comparar los resultados con los requisitos microbiológicos exigidos para este tipo de producto, se concluye que manifiesta una gran deficiencia higiénica y representa un peligro latente como vehículo de intoxicación estafilocócica para el consumidor, a la par de otros riesgos relacionados con enfermedades originadas por agentes entéricos



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bergdoll, M.S. 2010. *Staphylococcal* Food Poisoning. En: Cliver, D.O. Foodborne Diseases. Academic Press.USA. P. 85-106

Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis–Organización Panamericana de la Salud (INPPAZ-OPS/OMS). 2007. Vigilancia de las ETAs en Latinoamérica y el Caribe.

Jay,J.M. 2004. Microbiología Moderna de Alimentos. Ed. Acribia. España. P537.

Lacette, G.A. and Tatini S.R. 2002. *Staphylococcus aureus*. En: Vanderzant, C. D.F. Splittstoesser. American Public Health Association. USA. P. 533



PRÁCTICA No. 10

RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS

OBJETIVOS

1. Realizar la técnica para el recuento de hongos filamentosos y levaduras en alimentos.
2. Conocer el fundamento y composición de los medios de cultivo utilizados para el recuento de estos microorganismos.
3. Conocer el significado sanitario de un número elevado en alimentos.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ Competencias sistémicas

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Los hongos y las levaduras se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, pueden encontrarse como flora normal de un alimento, o como contaminantes en equipos mal sanitizados. Ciertas especies de hongos y levaduras son útiles en la elaboración de algunos alimentos, sin embargo también pueden ser causantes de la descomposición de otros alimentos. Debido a su crecimiento lento y a su baja competitividad, los hongos y levaduras se manifiestan en los alimentos donde el crecimiento bacteriano es menos favorable. Estas condiciones pueden ser bajos niveles de pH, baja humedad, alto contenido en sales o carbohidratos, baja temperatura de almacenamiento, la presencia de antibióticos, o la exposición del alimento a la irradiación. Por lo tanto pueden ser un problema potencial en alimentos lácteos fermentados, frutas, bebidas de frutas, especias, oleaginosas, granos, cereales y sus derivados y alimentos de humedad intermedia como las mermeladas, cajetas, especias, etc. (Pierson y Smoot, 2001).



La contaminación fúngica de un alimento tiene mucha importancia, no tan sólo por su acción deteriorante, que pudre y malogra materias primas y productos manufacturados, sino también por la capacidad de algunos hongos para sintetizar gran variedad de micotoxinas, para provocar infecciones y, incluso, para provocar reacciones alérgicas en personas hipersensibles a los antígenos fúngicos. Por estos motivos, para conocer la calidad microbiológica de un producto, es pertinente realizar un recuento de hongos y levaduras. En general, los hongos son microorganismos eucariotas¹ pluricelulares filamentosos, no presentan pigmentos fotosintéticos y son quimioheterótrofos aerobios estrictos. A diferencia de las plantas, presentan un bajo grado de diferenciación en los tejidos (Frazier y Westhoff, 2004).

Los recuentos pueden referirse a fragmentos del micelio de hongos que han desarrollado en el alimento, o a las colonias sobre placas de un medio apropiado. El primer caso puede usarse para conocer la calidad de la materia prima utilizada en la fabricación de un producto, habitualmente, de naturaleza vegetal; la presencia de sustancias inhibitorias e incluso la falta de viabilidad del hongo, carecen de importancia. En cambio cuando se desea conocer el número de microorganismos presentes es indispensable una cuenta viable para estimar el nivel de contaminación como indicador de prácticas higiénicas deficientes. Para este último fin se sigue una técnica muy similar a la descrita para el recuento de colonias por vaciado en placa (Hocking, 2011).

En general, simultáneamente con el recuento de hongos puede realizarse el de las levaduras, ya que el medio de cultivo les proporciona también buenas condiciones para su multiplicación. Sin embargo, cuando se presenta un desarrollo excesivo de hongos, difícilmente puede efectuarse el recuento de las colonias de levaduras. Si tal es el caso y existe la necesidad de practicar su



recuento, lo recomendable es preparar doble serie de diluciones e incubar una a 35°C durante 48 horas, lo que permite desarrollar a las levaduras cuando los hongos aun no cubren las placas (NOM-111-SSA1-1994).

Las colonias de levaduras pueden aparecer sobre la superficie o en el seno de la gelosa. En el primer caso son circulares y de diámetro mayor; en el seno del medio suelen aparecer estrelladas y algo más pequeñas. Los alimentos en los que suele utilizarse el recuento de hongos para conocer acerca de sus antecedentes sanitarios son las salsas, harinas, especias, mantequilla, margarina, leche y huevo en polvo. Las levaduras tienen interés en las bebidas no alcohólicas embotelladas, melazas y mieles, salsas y ocasionalmente en algunos lácteos (Beuchat y Cousin, 2001).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

2.2 Hongos importantes en los alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

3 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

18 cajas Petri

9 Tubos de ensayo de 16 x 150

10 Pipetas de 5 o 10 mL

1 Balanza analítica

1 Incubadora

1 Autoclave

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Agar papa dextrosa

Acido tartarico

METODOLOGÍA

NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en Alimentos

1. Realizar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-3} .
2. Colocar por duplicado, 1 mL de cada dilución en cajas de Petri estériles.

3. Agregar de 12 a 15 mL de agar papa dextrosa acidificado con ácido tartárico al 10% hasta pH 3 (aproximadamente 1.5 mL por 100 mL de medio), fundido y mantenido entre 45°C y 48°C en baño de agua. Ya acidificado el medio no debe reutilizarse.
4. Homogeneizar y dejar solidificar.
5. Incubar una serie de placas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días y la otra serie a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas.
6. Revisar las placas a las 48 y 72 horas y hacer los recuentos correspondientes. En caso de que no haya crecimiento de hongos continuar la incubación hasta los 5 días.
Contar las colonias de levaduras en la serie incubada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y en la incubaba a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.
7. Multiplicar por la inversa de la dilución e informar:
Unidades formadoras de colonias de hongos (UFC/g o mL) en placas de agar papa dextrosa acidificada, incubadas a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 5 días.
Unidades formadoras de colonias de levaduras (UFC/g o mL) en placas de agar papa dextrosa acidificado, incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 48 horas.

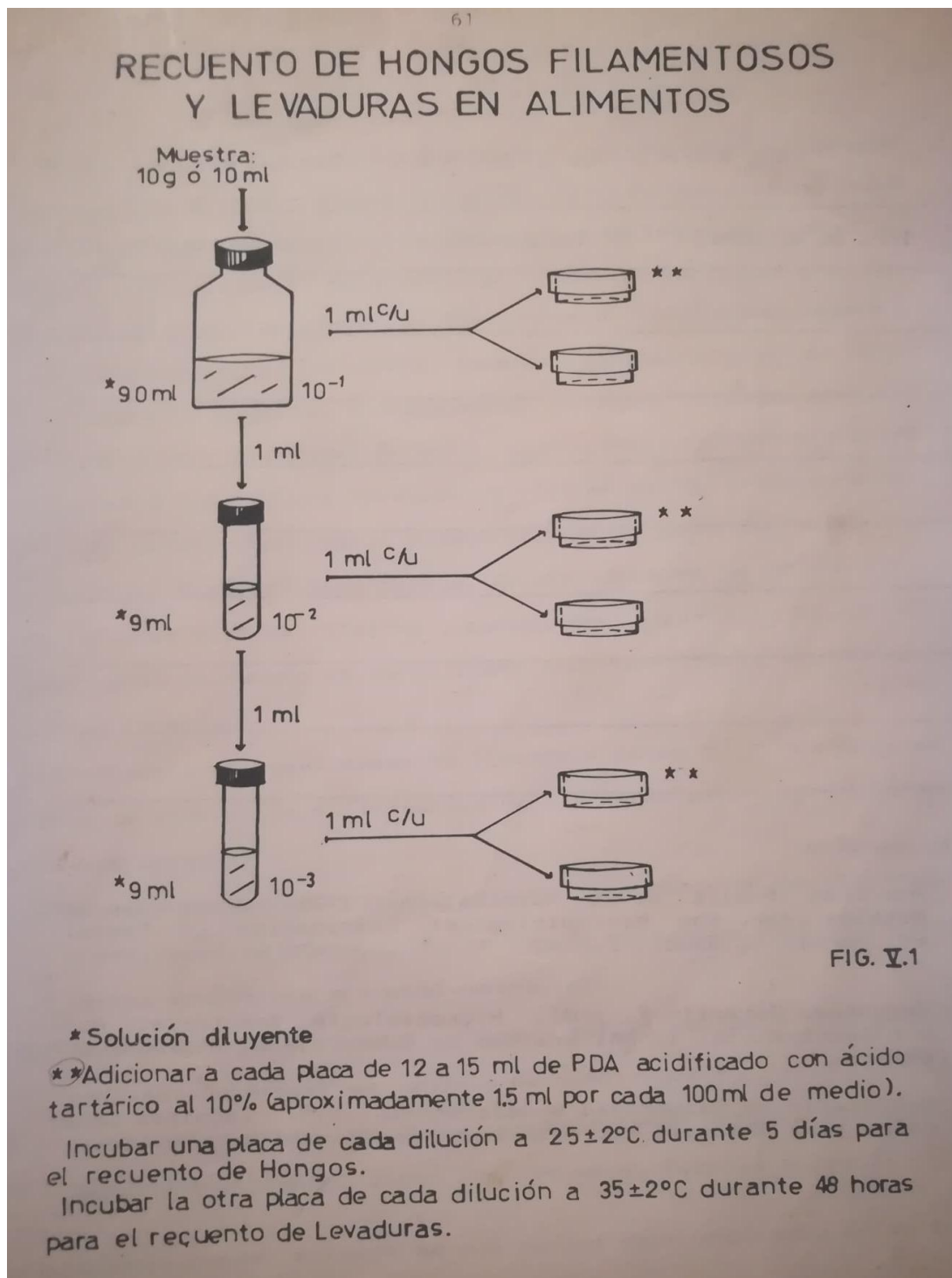


Figura 76. Diagrama de flujo hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de camarón blanco (*Penaeus vanamei*), Pez cochito (*Balistes polylepis*) y Moluscos bivalvos (Patas de mula) las cuales se compraron en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista.



Figura 77. Estructuración de la muestra.



Figura 78. Preparación de agar papa dextrosa.



Figura 79. Vaciado de agar papa dextrosa.

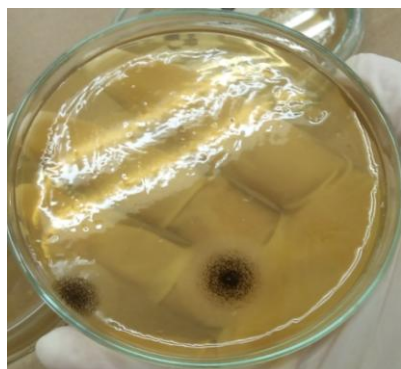


Figura 80. Desarrollo de hongos en camarón blanco.

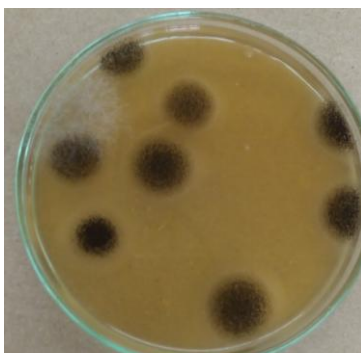


Figura 81. Desarrollo de hongos en pez cochito.

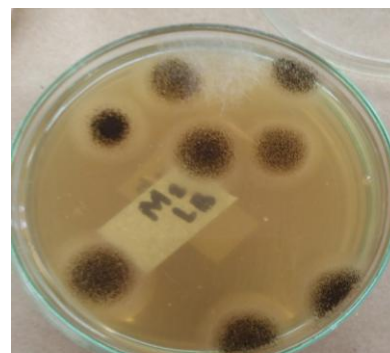


Figura 82. Desarrollo de hongos en pata de mula.

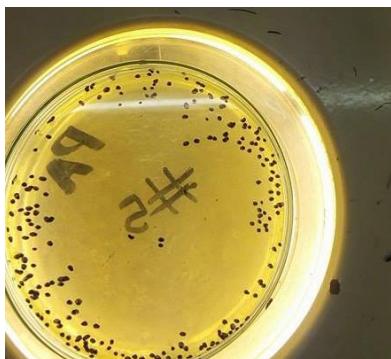


Figura 83. Desarrollo de levaduras en camarón blanco.



Figura 84. Desarrollo de levaduras en pez cochito.



Figura 85. Desarrollo de levaduras en patatas de mula.

En la tabla 17 se muestran la cantidad de hongos y levaduras (UFC/g) presentes en cada una de las muestras analizadas.

Tabla 17. Cuantificación de hongos y levaduras en las muestras.

TIPO DE ALIMENTO	HONGOS UFC/g	LEVADURAS UFC/g
Camarón blanco (<i>Penaus Vanamei</i>)	72	65
Pez Cochito (<i>Balistes polylepis</i>)	203	59
Patatas de mula (<i>Anadara tuberculosa</i>)	247	83

De acuerdo con la “**NMX-F-522-2002-SE**. Productos de la Pesca. Camarón Seco-Salado. Especificaciones. Fish Products. Salted Dried Shrimp. Specificactions. Esta Norma Sustituye a la Nmx-F-522-1993-Scfi. Normas Mexicanas. Dirección General de Normas”, los productos de la pesca como el camarón blanco y el pez

cochito deben estar exentos de microorganismos, toxinas o sustancias producidas por microorganismos en concentraciones que puedan representar un riesgo para la salud humana, por lo tanto se indica un alto índice de contaminación, considerándose así productos de mala calidad y no aptos para consumo humano.

Según la Norma Oficial Mexicana “**NOM-093-SSA1-1994**, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos”, los moluscos bivalvos como las patas de mula no debe contener en análisis de hongos y levaduras más de 10 UFC/g en punto de venta, por lo que, de acuerdo al análisis de cultivo por vaciado en placa con agar papa dextrosa, se indica un alto índice de contaminación, por lo tanto se considera como producto de mala calidad y no apto para consumo humano según la NOM-111-SSA1-1994.

CONCLUSIONES

Las enfermedades diarreicas, son transmitidas principalmente por alimentos, siendo en su mayoría de tipo infeccioso, aunque también las hay de origen químico como las intoxicaciones. La incidencia de estas enfermedades, sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo contemporáneo y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, que ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria

El control sanitario en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, es el conjunto de acciones de orientación, educación, muestreo y verificación que deben efectuarse con el fin de contribuir a la protección de la salud del consumidor, mediante el establecimiento de las disposiciones sanitarias que se deben cumplir tanto en la preparación de alimentos, como en el personal y los establecimientos, en los puntos críticos



presentes durante su proceso; que permitan reducir aquellos factores que influyen durante su preparación en la transmisión de enfermedades por alimentos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Beuchat L.R. & Cousin M.A. 2001. "Yeasts and Molds". In: Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Downs F.P. & Ito K. (Eds.) APHA. Washington. 209-215.

Frazier W. & Westhoff D. 2004. Microbiología de los Alimentos. 4ª. ed. Acribia, España. 23-50.

Hocking A. 2011 Toxigenic Aspergillus Species. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 451-465.

Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Pierson M. & Smoot L. 2001. Indicator Microorganisms and Microbiological Criteria. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Doyle M. Beuchat L. & Montville T. (Eds.) ASM Press. USA. 71-87.



PRÁCTICA No. 11

IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* EN ALIMENTOS MARINOS

OBJETIVOS

1. Conocer el fundamento de los medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos.
2. Identificar las colonias de *Salmonella* en los distintos medios selectivos empleados
3. Aplicar la metodología para el aislamiento de *Salmonella* a partir de alimentos.
4. Interpretar la presencia de *Salmonella* en alimentos.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar

herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario

✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad

✓ Habilidades interpersonales

❖ **Competencias sistémicas**

✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica

✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos

✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos

✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)

✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma

✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

La salmonelosis constituye un problema de salud, no solo en México sino en todos los países del mundo. En nuestro país las enteritis y otras enfermedades diarreicas ocupan el segundo lugar en causas de mortalidad, siendo un grupo más afectado el comprendido entre los cero y cuatro años de edad. Se requiere que la vigencia y el control epidemiológico de estas enfermedades transmisibles sea muy eficaz, lo cual demande un conocimiento exacto de la naturaleza del agente causal (RENALOA, 2011) En el caso especial de la salmonelosis el problema adquiere una complejidad especial debido a que algunos de sus serovares son específicos para un huésped, en tanto que otros pueden infectar lo mismo a animales que al hombre. Los alimentos más frecuentemente involucrados son: productos cárnicos, lácteos, pescados y verduras (ICMSF, 2008).



Las técnicas para el aislamiento de *Salmonella* a partir de los alimentos constituyen un ejemplo muy ilustrativo de la flexibilidad fisiológica de las bacterias, de la influencia que sobre esta tiene los diferentes tratamientos con los que la industria procesa los alimentos y la variedad de diseños que el microbiólogo puede llevar a efecto en las técnicas de laboratorio para poner de manifiesto contaminaciones aun mínimas por microorganismos (a veces una bacteria en 500 g de producto) y que con frecuencia sean visto seriamente lesionados en su viabilidad (Caffer y Terragno, 2009).

En general las técnicas son laboriosas, costosas y se requiere de tiempo y personal bien adiestrado. Pero la importancia que para la salud pública constituyen estos microorganismos da lugar a que se continúen ensayando nuevas técnicas con el objetivo de hacerlas más sensibles, específicas, económicas y rápidas. Por ejemplo: la técnica de anticuerpos fluorescentes directa (IFD) reúne estos requisitos para su aplicación no solo en el diagnóstico de *Salmonella* sino de otros géneros importantes en los alimentos. La técnica de anticuerpos fluorescentes directa tiene un 95 a 98% de confiabilidad comparada con la de cultivo, presenta 0% de falsos negativos y con un costo bajo por muestra en un tiempo aproximado de 56 horas para emitir el resultado. Aunque para aplicar esta técnica al principio se requiere de una inversión elevada, sobre todo en la adquisición del microscopio de fluorescencia, también se requiere de un analista especializado y de la confirmación de los positivos por la técnica de cultivo (González y Cecchini, 2014).





CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

3.2 Métodos recomendados para el análisis microbiológico de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos básicos de estructura, reactividad y síntesis de la química de hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos y aplicarlos para diseñar, seleccionar, adaptar, operar, controlar, simular, optimizar y escalar equipos y procesos en los que se aprovechen de manera sustentable los recursos bióticos, así como identificar y aplicar tecnologías emergentes relacionadas con el campo de acción del Ingeniero Bioquímico y realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la Ingeniería Bioquímica y difundir sus resultados.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Química, identificando los fundamentos básicos de Química del carbono además de las propiedades y síntesis de hidrocarburos saturados, insaturados y compuestos aromáticos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

Para la comprensión de los contenidos de la asignatura es necesario tener fundamentos de Química y Matemáticas, pues estas presentan las bases de este curso. El contenido de esta asignatura permite una mejor interpretación de los contenidos de las asignaturas posteriores en áreas de Química, Microbiología, Bioquímica, Ciencias de los Alimentos, Ambientales y Biotecnología, siendo ésta medular en la retícula de Ingeniería Bioquímica en la aplicación de recursos y procesos bióticos

MATERIAL

2 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

4 Pipetas de 5 o 10 mL





6 Cajas petri

1 Asa

2 Vasos de precipitados 100 mL

1 Espátula.

1 Piseta

1 Vidrio de reloj

1 Balanza

1 Incubadora

REACTIVOS

Caldo selenito cistina

Caldo tetratiónato iodo-ioduro

Agar TSI

Agar LIA

Solución salina estéril

Pruebas bioquímicas (SIM, caldo urea, agar citrato de Simmons, caldo manitol, caldo RM, caldo VP y caldo malonato).

METODOLOGÍA

NOM-114-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimento

1. Pre-enriquecimiento: Transferir asépticamente 25 g del alimento a un frasco conteniendo 235 mL del medio de pre-enriquecimiento según el alimento correspondiente. Licuar si fuera necesario durante un minuto. Dejar reposar 1 minuto y ajustar el pH a 6.9.
2. Incubar de 18 a 24 horas a 35 +2 °C.
3. Enriquecimiento: Transferir 1 mL del cultivo anterior a un tubo que contenga 10 mL de caldo selenito cistina y 1 mL a otro que contenga 10 mL de caldo tetratiónato con 0.2 mL de iodo-ioduro y homogeneizar.



4. Incubar a 43 C de 18 a 24 horas.
5. Si el alimento no requiere pre-enriquecimiento colocar 15 g en 125 mL de caldo tetracionato con 2 mL de iodo-ioduro y 15 g en 125 mL de caldo selenito cistina, licuar si fuera necesario. Incubar a 43°C de 18 a 24 horas.
6. Aislamiento: Inocular a partir de cada uno de los medios de enriquecimiento 3 placas de medios sólidos disponibles de manera que puedan obtenerse colonias bien aisladas para su identificación.
7. incubar a 35°C + o – 2°C durante 24 horas.
8. observar los medios sólidos para identificar colonias sospechosas de salmonella de acuerdo a sus características en cada uno de ellos.
9. identificación bioquímica. Seleccionar de 1-2 colonias características por placa.
10. Con el asa en punta tomar cuidadosamente colonias que se sospecha son de salmonella (para evitar contaminantes) e inocular un tubo de agar TSI y otro de agar LIA por picadura y estría.
11. incubar a 35°C + o – 2°C durante 24 horas.
12. identificación serológica: Colocar 2 gotas de solución salina estéril en un portaobjetos. Suponer una porción del cultivo desarrollado en TSI. Agregar una gota del antisuero polivalente somático “0” y mezclar. Agitar inclinando la lámina hacia atrás y hacia adelante aproximadamente un minuto. Observar bajo la luz de una lámpara sobre fondo oscuro.
13. Prueba positiva: presencia de aglutinación franca en el portaobjetos. Si la aglutinación es positiva el suero polivalente aglutinar empleando antisueros para los grupos A, B, D, y E incluyendo al Vi los cuales suelen ser los más frecuentes. En caso de dudas se hacen pruebas bioquímicas confirmatorias: SIM, caldo urea, agar citrato de Simmons, caldo manitol, caldo RM, caldo VP y caldo malonato.

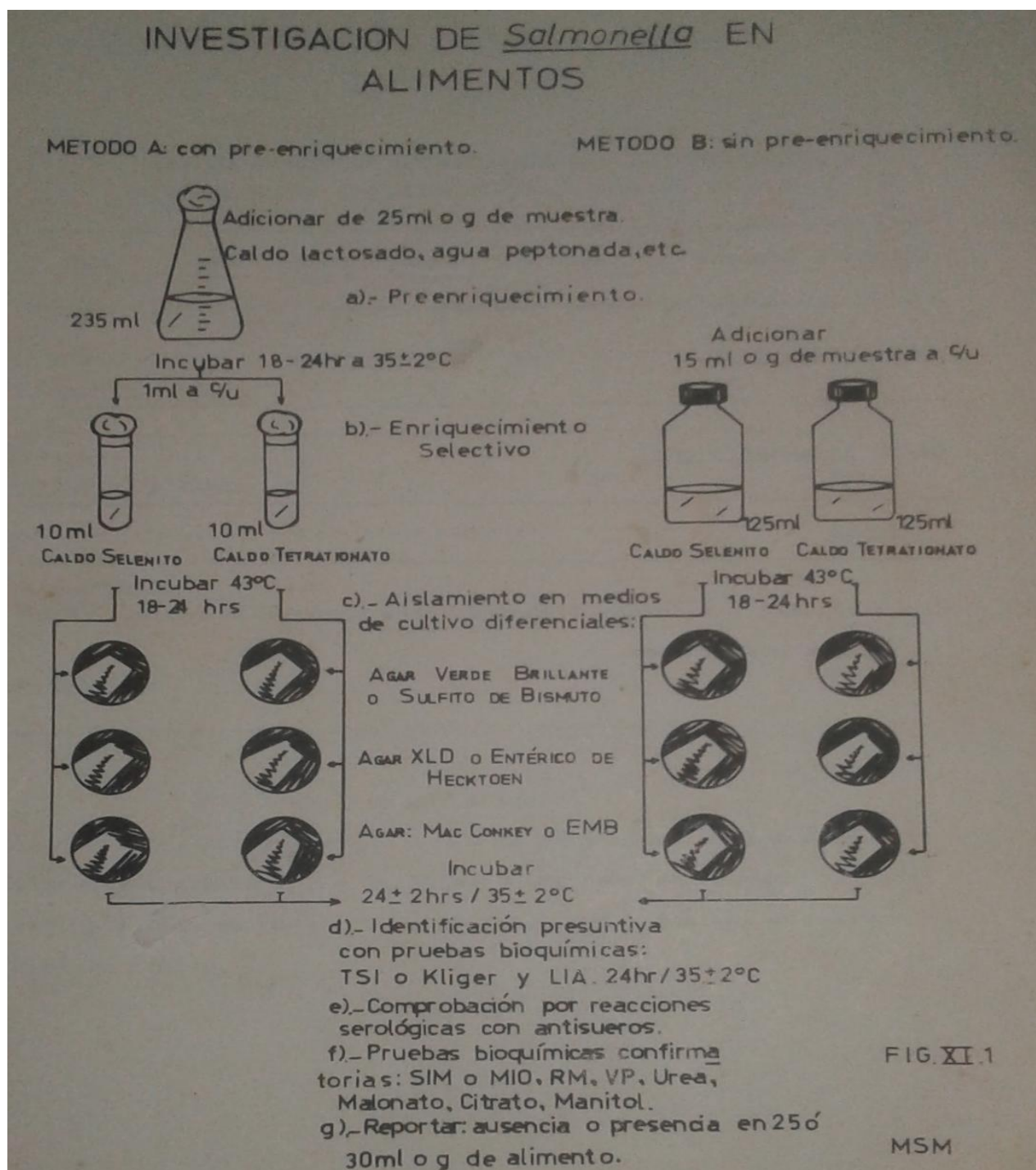


Figura 86. Investigación de *Salmonella* en alimentos (NOM-114-SSA1-1994).

REACCIONES DE ENTEROBACTERIAS PATOGENAS EN TSI

Genero y especie	Agar inclinado	Fondo	Gas	H ₂ S
<i>Salmonella thypi</i>	K	A	-	+ (-)
Otras <i>Salmonella</i> spp	K	A	+	+++ (-)
<i>Salmonella arizona</i>	K (A)	A	+	+++

K=Alcalina; A= ácida; Símbolos entre paréntesis indican reacciones ocasionales.

REACCIONES DE ENTEROBACTERIAS PATOGENAS EN LIA

Género y especie	Agar inclinado	Fondo	Gas	H ₂ S
<i>Salmonella sp.</i>	K	K	-	+ (-)
<i>Salmonella thypi</i>	K	K b	-	+ (-)
Bioserotipo	K	A	+ (-)	- (+)
<i>Salmonella arizona</i>	K	K	-	+ (-)

K=Alcalina; A= acida; una reacción alcalina en el fondo de este medio indica descarboxilación; símbolos entre paréntesis indican reacciones ocasionales; b=algunos cultivos raros de *S. Thypi* pueden no descarboxilar la lisina.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.

- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de moluscos bivalvos (Patatas de mula), compradas en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas.



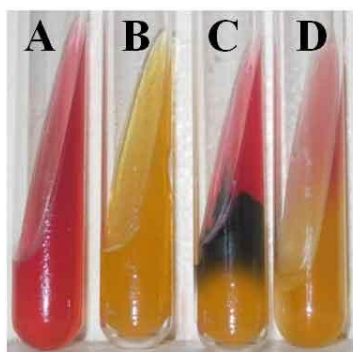
Figura 87. Muestra para Salmonella.



Figura 88. Caldo selenito cistina



Figura 89. Caldo tetrionato



A) *Pseudomonas aeruginosa*: Gluc (-), Lac/Suc (-), H₂S (-)
B) *Escherichia coli*: Gluc (+), Lac/Suc (+), H₂S (-)
C) *Salmonella typhimurium*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H₂S (+)
D) *Shigella boydii*: Gluc (+), Lac/Suc (-), H₂S (-)

Figura 90. Agar TSI

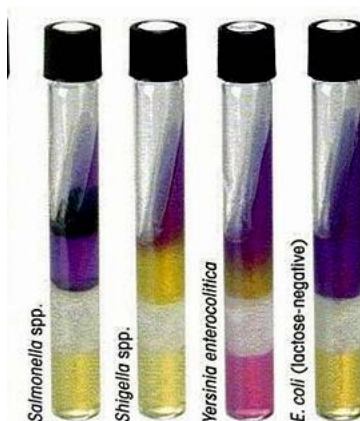


Figura 91. Agar LIA

En la tabla 18 se observan los resultados del análisis de pruebas bioquímicas realizados a las muestras de patas de mula.

Tabla 18. Resultados pruebas bioquímicas

Pruebas bioquímicas				
	SIM	Citrato de Simmons	H ₂ S	Ureasa
1	+	+	+	-
2	+	-	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-

Según la NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos, los moluscos bivalvos como las patas de mula deben contener ausencia en 25 g de *Salmonella* en punto de venta, por lo que, de acuerdo al análisis de cultivo, se indica un alto índice de contaminación, ya que de acuerdo a las pruebas bioquímicas se estimo que 3 muestras presentaron *Salmonella typhi*, por lo tanto se considera un producto de baja calidad y no apto para consumo humano según la NOM-114-SSA1-1994.

CONCLUSIONES

Las principales causas de infección son los alimentos crudos o que hayan sufrido cocción insuficiente, además de la contaminación cruzada que ocurre cuando los productos cocidos entran en contacto con alimentos crudos o con superficies o materiales contaminados (como las tablas para cortar). Por lo tanto, la cocción adecuada y la higiene durante la manipulación de los alimentos pueden prevenir en gran medida las infecciones causadas por *Salmonella*.



No olvidar estos consejos a la hora de manipular alimentos: Limpiar: Lávese las manos y lave las superficies frecuentemente, Separar: No propague la contaminación, Cocinar: Cocine hasta una temperatura adecuada y Enfriar: Refrigere prontamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Caffer, M.I. y Terragno, R. 2009. Manual de Procedimientos para la Caracterización de *Salmonella*.

González, A.S. y Cecchini, D. 2014. Diagnóstico e Investigación Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Módulo 2. Organización Panamericana de la Salud. Disponible en: <http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2p.html>.

ICMSF. 2008. Técnicas de análisis microbiológico. Segunda edición.

Renaloea. 2011. Manual Análisis Microbiológico de los Alimentos. Metodología analítica oficial, Patógenos, Volumen 1. Diciembre 2011. Administración Nacional de Medicamentos Alimentos y Tecnología Médica. Disponible en: (http://www.anmat.gov.ar/renaloea/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf).



PRÁCTICA No. 12

IDENTIFICACIÓN DE *SHIGELLA* EN ALIMENTOS MARINOS

OBJETIVOS

1. Conocer el fundamento de los medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento de *Shigella* a partir de alimentos.
2. Identificar las colonias de *Shigella* en los distintos medios selectivos utilizados.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y aislamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ Competencias sistémicas

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Al igual que la *Salmonella* el género *Shigella* se ve involucrado en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), la enfermedad producida por *Shigella* es llamada shigelosis y es de tipo infeccioso. Esta bacteria afecta principalmente a los niños, sobre todo a aquellos que viven en condiciones higiénicas reprobables, que generalmente pertenecen a estratos socioeconómicos muy bajos por lo que no cuentan con las condiciones o facilidades para llevar a cabo las medidas de higiene personal más elementales. El género *Shigella* está formado por bacterias Gram negativas aerobias no esporuladas, no móviles y está constituido por cuatro especies que son: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* y *S. sonnei* (OPS, 2013).

Se ha descrito que el género *Shigella* es inhibidor fuertemente por la presencia de otros microorganismos (principalmente los microorganismos coliformes) que pudieran encontrarse en los alimentos en número elevado. El microorganismo es muy sensible a pH ácido, sensible a la presencia de conservadores (benzoato de sodio), así como a la congelación; por lo que es recomendable que los alimentos sospechosos (ensaladas de frutas y verduras, puré de papa y productos crudos) de la presencia de *Shigella* se analicen lo más rápidamente posible (Barrantes y Achí, 2009).



Los métodos utilizados para el aislamiento de *Shigella* en los alimentos no son tan sensibles para el diagnóstico como en el caso de *Salmonella*, lo que constituye un verdadero reto para los microbiólogos encargados del control de calidad de los productos alimentarios. Sin embargo, también se han estado probando técnicas nuevas para el diagnóstico de *Shigella*, siendo la de inmunofluorescencia directa una de ellas (FDA, 2011).

Para el diagnóstico de *Shigella* por la técnica de cultivo a partir de los alimentos, se recomienda sembrar el alimento en un caldo de enriquecimiento como el caldo GN (caldo Gram negativo), y una siembra directa en medios de aislamiento de agar selectivo. Tres tipos de agar selectivos se han recomendado para el aislamiento de *Shigella*: uno de baja selectividad como el agar MAC Conkey, uno de mediana selectividad como el agar entérico de Hecktoen o agar XLD y otro de alta selectividad como el SS. El hallazgo de *Shigella* indica una contaminación fecal reciente, probablemente proveniente de las manos de los manipuladores de alimentos, calificándose, el alimento, como inadecuado para el consumo humano (ICMSF, 2006).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

3.2 Métodos recomendados para el análisis microbiológico de alimentos marinos. Aplicación en el contexto.

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos básicos de estructura, reactividad y síntesis de la química de hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos y aplicarlos para diseñar, seleccionar, adaptar, operar, controlar, simular, optimizar y escalar equipos y procesos en los que se aprovechen de manera sustentable los recursos





bióticos, así como identificar y aplicar tecnologías emergentes relacionadas con el campo de acción del Ingeniero Bioquímico y realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la Ingeniería Bioquímica y difundir sus resultados.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Química, identificando los fundamentos básicos de Química del carbono además de las propiedades y síntesis de hidrocarburos saturados, insaturados y compuestos aromáticos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

Para la comprensión de los contenidos de la asignatura es necesario tener fundamentos de Química y Matemáticas, pues estas presentan las bases de este curso. El contenido de esta asignatura permite una mejor interpretación de los contenidos de las asignaturas posteriores en áreas de Química, Microbiología, Bioquímica, Ciencias de los Alimentos, Ambientales y Biotecnología, siendo ésta medular en la retícula de Ingeniería Bioquímica en la aplicación de recursos y procesos bióticos

MATERIAL

- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- 5 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 15 cajas petri
- 10 Tubos de ensaye de 16 x 150
- 5 Pipetas de 5 o 10 mL
- 1 Asa
- 1 Espátula.
- 1 Piseta
- 1 Incubadora
- 1 Autoclave





REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato

Caldo GN

Agar Mac Conkey

Agar entérico de Hecktoen

Agar XLD

Agar TSI

Agar LIA

Pruebas bioquímicas (VP, RM, manitol, glucosa, sorbitol, lactosa y SIM).

METODOLOGÍA

NOM-210-SSA1-1994, Productos y Servicios. Determinación de Microorganismos Patógenos

1. Colocar 25 g o 25 mL del alimento en un matraz de 500 mL, el cual contenga 225 mL de caldo GN, agitar vigorosamente.
2. Sembrar directamente del alimento, en caso de ser líquido, o cuando sea solido del matraz de caldo GN en placas de agar Mac Conkey, entérico de Hecktoen y XLD, por estría cruzada para obtener colonias aisladas características de *Shigella* y seguir el procedimiento de 5 a 11.
3. Incubar el matraz con caldo GN a $35^{\pm} 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
4. Inocular por estría cruzada una asada del caldo de enriquecimiento en agar Mac Conkey, agar XLD y agar entérico de Hecktoen.
5. Incubar las placas a $35^{\pm} 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas.
6. Seleccionar dos colonias sospechosas de pertenecer al género *Shigella* e inocular cada colonia en agar TSI y agar LIA.
7. Incubar TSI y LIA a $35^{\pm} 2^{\circ}\text{C}$ de 18 a 24 horas.





8. Descartar los cultivos que no den las reacciones típicas de *Shigella* en agar TSI y en agar LIA.
9. Realizar las pruebas bioquímicas confirmatorias: VP, RM, manitol, glucosa, sorbitol, lactosa y SIM.
10. Someter a pruebas serológicas las colonias con comportamiento bioquímico típico de *Shigella*.
11. Reportar la presencia o ausencia de *Shigella* en 25 g de la muestra de alimento.

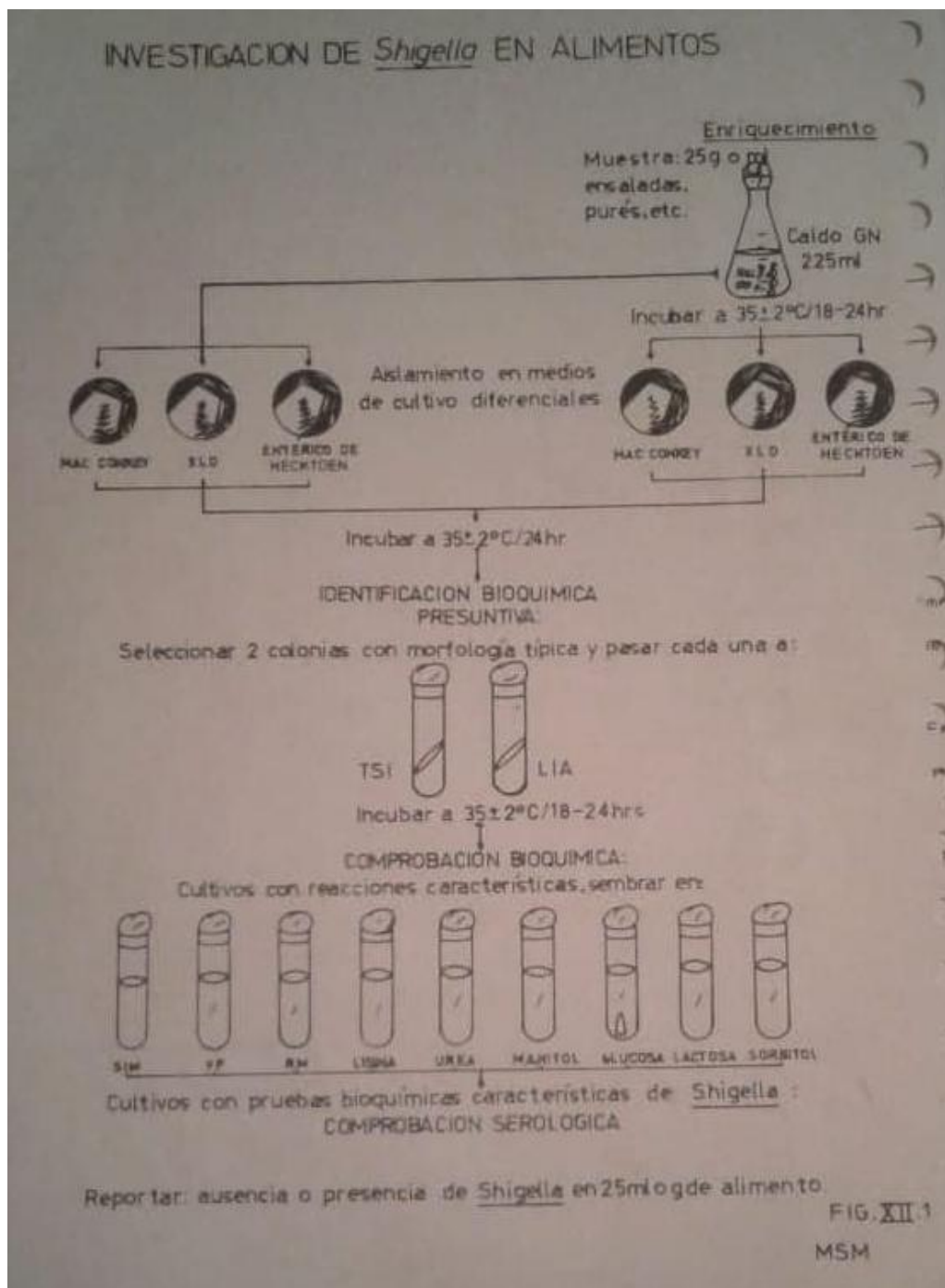


Figura 92. Investigación de *Shigella* en alimentos (NOM-210-SSA1-1994).

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se analizaron muestras de camarón blanco (*Pennaeus vanamei*) las cuales se compraron en el embarcadero de la Isla de la Piedra. Se observó que las personas encargadas de la venta de estos productos no utilizan indumentaria adecuada para la manipulación de los mismos, como guantes, cofia o cubrebocas. El área donde se exhibían las muestras si estaba limpia a la vista.



Figura 93.
Preparación muestra
de camarón blanco.



Figura 94. Sembrado
muestra de camarón.



Figura 95. Desarrollo
colonial agar Mac Conkey

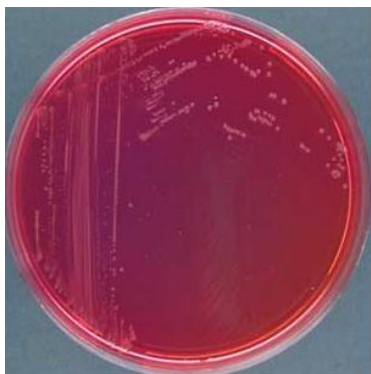


Figura 96. Desarrollo
colonial agar XLD



Figura 97. Desarrollo colonial
agar entérico de Hecktoen



Figura 98. a) *Shigella* en
TSI, b) *Shigella* en LIA.

En la Tabla 19 se aprecian las características morfológicas de las colonias desarrolladas en los distintos medios selectivos para el crecimiento de *Shigella*. En el medio Mac Conkey las colonias que se presentaron fueron redondeadas y de un color rosa claro, en agar hektoen fueron rosa pálido curvadas y en XLD azul claro redondas bien definidas. Las pruebas en TSI y LIA resultaron positivas.

Tabla 19. Características de colonias en muestras de camarón blanco.

Colonia	Medio de cultivo	Morfología colonial			TSI	LIA
1	Agar Mac Conkey	Colonias rosadas.	redondeadas		+	+
2	Agar entérico de Hecktoen	Colonias curvadas.	rosa pálido,		+	+
3	Agar XLD	Colonias redondas azul claro.			+	+

CONCLUSIONES

La contaminación de los alimentos con *Shigella* puede provenir del contacto directo o indirecto con materia fecal de personas infectadas, a través de aguas contaminadas, plagas (moscas), o por falta de higiene y buenas prácticas del manipulador durante su preparación. *Shigella* crece en alimentos con bajo pH como frutas y verduras. Sobrevive durante mucho tiempo en alimentos de pH neutro, a temperaturas de heladera, en alimentos cerrados al vacío o bajo atmósferas modificadas, y en el agua. Es sensible a las temperaturas de cocción de los alimentos, pero bajo ciertas condiciones puede sobrevivir en los alimentos por largos períodos si la temperatura se mantiene en 25°C.



Puede sobrevivir por ejemplo en la harina y leche pasteurizada hasta 170 días, en los huevos las almejas y los camarones por 150 días, en las ostras por 30 días, y en la clara de huevo por 20 días. Sin embargo, en la práctica muy raramente se puede aislar de los alimentos procesados, dado el tiempo transcurrido entre la recolección y el procesamiento de la muestra.

El aislamiento de *Shigella* de alimentos sigue siendo un desafío. La dificultad está relacionada con su labilidad y la competencia con las otras bacterias presentes en el alimento, habitualmente en mucho mayor número, es por esto que se recurre a técnicas selectivas para su desarrollo y aislamiento. La muestra analizada no es apta para consumo humano según la NOM-210-SSA1-2014.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barrantes, J.K., Achí, A.H.R. 2009. Interacciones celulares en el proceso de invasión de *Shigellas*; Rev.PanamInfectol 11(2):56-61.

Food and Drug Administration (FDA). 2011. Bad Bug Book. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook. Second Edition. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/UCM297627.pdf>

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2006. Microorganismos de los alimentos.

Organización Panamericana de la Salud. 2013. Diagnóstico e investigación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos. Disponible en:
<http://publicaciones.ops.org.ar/publicaciones/publicaciones%20virtuales/libroETAs/modulo2/modulo2z2.html> –



PRÁCTICA No. 13

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE ALIMENTOS MARINOS ENVASADOS

OBJETIVOS

1. Conocer los conceptos básicos necesarios de los alimentos envasados.
2. Desarrollar las técnicas microbiológicas para el análisis de los alimentos envasados, de acuerdo a su pH o acidez.
3. Interpretar la presencia de los microorganismos que causan la alteración del alimento envasado.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

❖ Competencias sistémicas

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

Se debe entender como alimento envasado, aquél que se encuentre contenido en recipiente de vidrio o cualquier otro material con cerraduras herméticas y sometidas a tratamientos especiales que aseguren su calidad sanitaria por un tiempo más o menos largo según el proceso y tipo de producto. Las causas de alteración en los alimentos envasados pueden ser asépticas o sépticas. En el primer grupo la alteración puede ser química, por la liberación de hidrógeno, o debida a acusas físicas. Habitualmente la formación de hidrogeno dentro de una lata se acompaña de corrosión interna, se libera a partir de los ácidos que componen el alimento por reacción con el metal del envase, cuando no existe una protección adecuada que impida esa interacción. La alteración se presenta en alimentos ácidos, como fruta y jitomates en distintas formas de preparación, los cuales contiene una diversidad de ácidos orgánicos (Rees y Bettison, 2011).

En los productos llamados de chilería, el vinagre incorporado fácilmente reacciona con el metal de la lata cuando el barnizado interior es defectuoso. Por otra parte, las altas temperaturas de almacenamiento y la insuficiente expulsión del aire de la lata, previo al sellado, favorecen también la liberación de hidrogeno. El proceso de

liberación del hidrogeno es paulatino, pero progresivo, de manera que pueden encontrarse grados variables de abombamiento de la lata. Las causas físicas incluyen: una pobre expulsión del aire en la lata, un sobrellenado, el traslado de estas a sitios elevados sobre el nivel del mar o a la combinación de estos factores (Marra y Romano, 2003).

La lata puede aparecer oxidada o deformada por causas mecánicas como golpes o presión. En todos estos casos el alimento contenido no necesariamente es peligroso, pero en principio tales envases no deben ofrecerse al público; existe el riesgo de que cualquier deformación de la lata se acompañe de minúsculas aperturas a lo largo de las líneas de unión en el envase que constituyan vías de entrada de microorganismos (Alvarado *et al.*, 2008).

Según Choi y Okos (2006) las causas sépticas de alteraciones de los alimentos envasados, son con mucho, las más importantes tanto desde un punto de vista económico, como sanitario. Estas alteraciones se presentan a consecuencia de:

- a) Un tratamiento térmico insuficiente.(subprocesado)
- b) Una contaminación a través de pequeños orificios en el envase, generalmente por defecto en el engargolado, lo que suele llamarse contaminación post-esterilización.
- c) Un enfriamiento inadecuado.
- d) El empleo del producto ya alterado previo el envasado.

Un alimento enlatado puede aparecer alterado, aún estéril al cultivo y sin deformación del envase. Dos hechos conducen a esta situación: el haber utilizado un producto en descomposición para prepararlo, o bien la actividad de una bacteria (generalmente termófila) seguida de autólisis; este último fenómeno se presenta después de varias semanas de almacenamiento del alimento a temperatura ambiente.



CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

3.2 Métodos recomendados para el análisis microbiológico de alimentos marinos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos básicos de estructura, reactividad y síntesis de la química de hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos y aplicarlos para diseñar, seleccionar, adaptar, operar, controlar, simular, optimizar y escalar equipos y procesos en los que se aprovechen de manera sustentable los recursos bióticos, así como identificar y aplicar tecnologías emergentes relacionadas con el campo de acción del Ingeniero Bioquímico y realizar investigación científica y tecnológica en el campo de la Ingeniería Bioquímica y difundir sus resultados.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Química, identificando los fundamentos básicos de Química del carbono además de las propiedades y síntesis de hidrocarburos saturados, insaturados y compuestos aromáticos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

Para la comprensión de los contenidos de la asignatura es necesario tener fundamentos de Química y Matemáticas, pues estas presentan las bases de este curso. El contenido de esta asignatura permite una mejor interpretación de los contenidos de las asignaturas posteriores en áreas de Química, Microbiología, Bioquímica, Ciencias de los Alimentos, Ambientales y Biotecnología, siendo ésta medular en la retícula de Ingeniería Bioquímica en la aplicación de recursos y procesos bióticos

MATERIAL

- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 mL
- 3 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 6 Cajas petri
- 4 Tubos de ensaye





- 1 abrelatas
- 1 Mechero
- 1 Autoclave

REACTIVOS

Alimento enlatado determinado previamente
Cloro
Sales cuaternarias de amonio
Bióxido de cloro a una concentración de 100 ppm
Yodo al 2% o alcohol al 70%
Tinción gram
Azul de metileno
Caldo hígado
Caldo purpura de bromocresol
Agar purpura de bromocresol dextrosa
Agar anaeróbico de brewer

METODOLOGÍA

NOM-130-SSA1-1995. Bienes y Servicio. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico.

I. Preparación de la muestra

1. Anotar la información más amplia disponible sobre el producto que se va examinar en relación con:
 - a) Tipo de alimento.
 - b) Planta productora
 - c) Marca registrada
 - d) La fecha de fabricación
 - e) Las condiciones de almacenamiento
 - f) El sitio en donde se adquirieron o muestrearon las latas alteradas.
 - g) El número de latas fabricadas.
 - h) El lote de fabricación



- i) Las condiciones del procesado
 - j) El método de enfriamiento
 - k) La proporción de latas afectadas
 - l) El tiempo transcurrido desde la fabricación hasta el desarrollo de la alteración.
2. Examinar el o los envases cuidadosamente y clasificarlos según su apariencia externa de acuerdo al grado de abombamiento tabla 19.
 3. Anotar la presencia de: perforaciones, golpes, herrumbre, derrames.
 4. Retirar la etiqueta, nuevamente examinar a lo largo de las líneas de unión, de preferencia con lupa para descubrir si hay perforaciones.

II. Apertura de lata.

1. Lavar de preferencia con cepillo usando agua caliente y jabón, enjuagar y dejar secar (si la lata está muy inflada guardarla en el refrigerador antes de abrirla).
2. Sumergir un extremo de la lata (contrario a donde esta gradado el lote) en desinfectante de cloro, sales cuaternarias de amonio, bióxido de cloro a una concentración de 100 ppm, yodo al 2% o en alcohol al 70% durante 10 a 15 min.
3. En el caso de los frascos de vidrio lavar la tapa en las condiciones ya descritas y sumergir la lata por 15 minutos en cualquiera de los desinfectantes mencionados.
4. Utilizar un abrelatas o cualquier otro dispositivo (cortador circular por ejemplo), estéril al autoclave o flameado al mechero si la lata no está abombada. En las latas de cierre o de anillo abre fácil hacerlo por la cara opuesta.
5. Si la lata presenta abombamiento, colocarla en una charola, en posición vertical, y sobre ella algodón estéril en un embudo invertido sin tallo. Perforar con un clavo o picahielos introducido en el tallo del embudo

sujetando a este con firmeza. Dejar escapar todo el gas, que escapará arrastrando parte del contenido.

Tabla 20. Clasificación de los grados de abombamiento

Grado	Apariencia	Características	Esquema
0	Planas o normales	Los extremos se encuentran planos o ligeramente cóncavos.	
I	Abombamiento o ligero	Hay ligera conexión en uno de los extremos que cede a la presión dando una apariencia normal, suele escucharse un chasquido.	
II	Abombamiento o elástico en un extremo	Un extremo se presenta abombado y al presionarlo cede, provocando abombamiento en el extremo opuesto.	
III	Abombamiento o elástico en ambos extremos	Los dos extremos se presentan abombados; pueden sin embargo, ceder a la presión de los dedos (la que al suspender regresan a la posición de abombamiento).	
IV	Abombamiento o que no cede a la presión	Ambos extremos se encuentran abombados y no pueden comprimirse: la lata puede reventar; escurrimiento del contenido.	

➤ Procedimiento para la preparación de la muestra de productos enlatados



Figura 99. Examinar la lata e identificarla

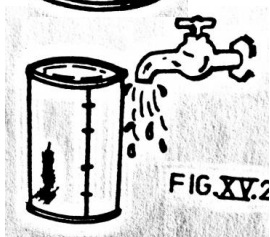


Figura 100. Lavar con agua y detergente

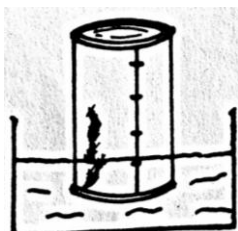


Figura 101. Expulsión de gas

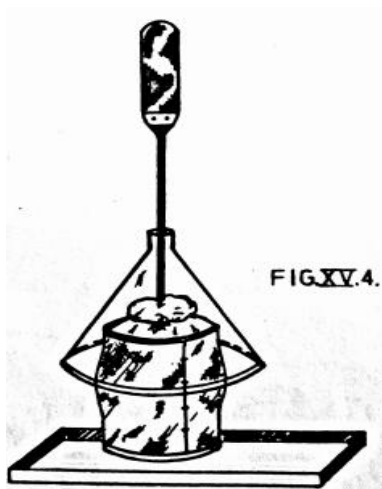


Figura 102. Desinfectar de 10-15 minutos

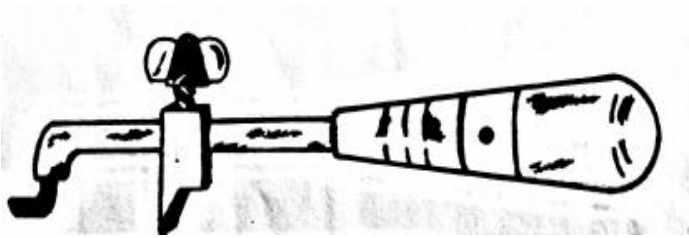


Figura 103. Abrelatas sanitario

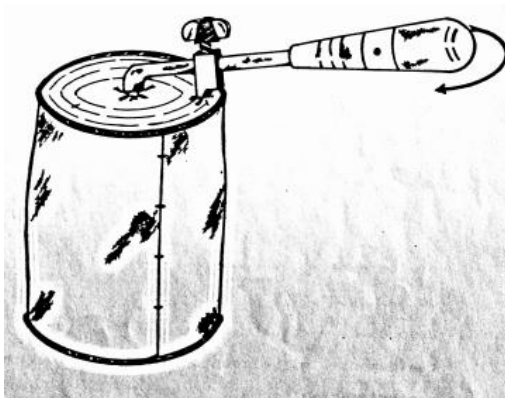


Figura 104. Abrir la lata

III. Análisis de la muestra

1. Trabajar dentro de la zona estéril del mechero, retirar aproximadamente de 2 a 4 g o mL de la muestra, utilizar para ello el dispositivo que mejor permita la maniobra hasta la introducción de la alícuota al interior de los tubos de cultivo que correspondan.
2. Utilizar los medios de cultivo de acuerdo al pH en los cuales podrán desarrollar la gran mayoría de los microorganismos involucrados en la descomposición de los alimentos enlatados. Algunos casos particulares deben resolverse recurriendo a medios especiales como lo indica el manual de la secretaria de salud.
3. Después de efectuar la siembra correspondiente examinar detenidamente el alimento en relación con las siguientes características:
 - a) Olor (pútrido, butírico, ácido, rancio, etc.)

- b) Localización e intensidad de la alteración
 - c) Coloraciones anormales
 - d) Consistencia
 - e) Gasificación
 - f) Licuación o disolución del producto
 - g) Eventualmente, turbiedad, sedimento o película etc. Precaución **no probar el alimento.**
4. Determinar pH con potenciómetro o en su defecto con papel indicador.
 5. Preparar 2 frotis del alimento. Teñir uno con la técnica de Gram y otro con coloración simple de azul de metileno. Observar cuidadosamente el microscopio y dibujar el detalle los microorganismos presentes.
La morfología de las bacterias en el producto alterado suele ser muy diferente a la que presentan en los medios de cultivo, aun así la lectura del frotis de información preliminar valiosa, sobre todo en el caso de microorganismos esporulados.
 6. Después de la incubación de los tubos inoculados en las condiciones señaladas, anotar el tipo de desarrollo observado, turbiedad, gasificación, coloraciones, digestión del medio.
 7. Inocular de cada tubo una placa de agar.
 8. Después del tiempo de incubación realizar tinción de Gram a las colonias desarrolladas.

En condiciones normales de análisis para control se llega hasta este punto y para determinaciones específicas se debe consultar el manual de la secretaria de salud.

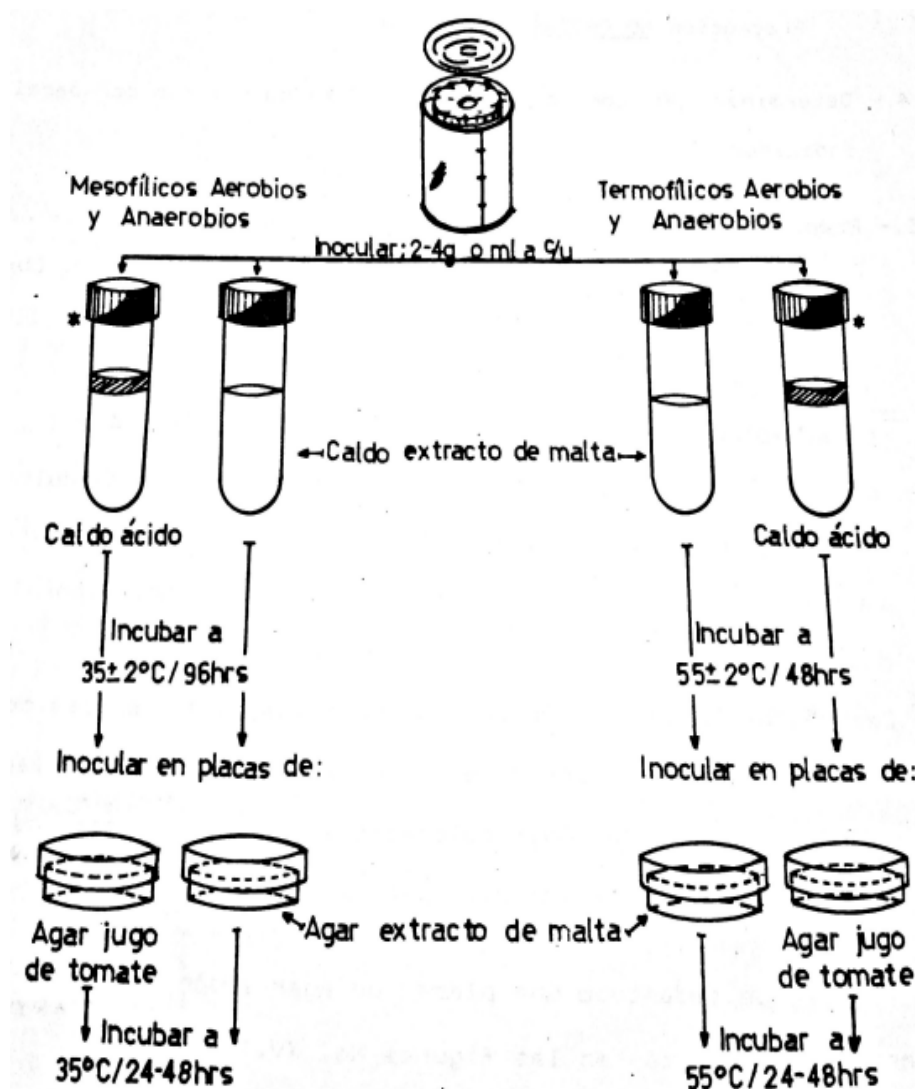


Figura 105. Análisis de alimentos enlatados con PH 4.5 o mayor.

*Calentar a ebullición durante 20 minutos antes de utilizarlos, enfriarlos, después inocularlos y sellarlos con vasa (vaselina y parafina al 50%) o gar al 2%

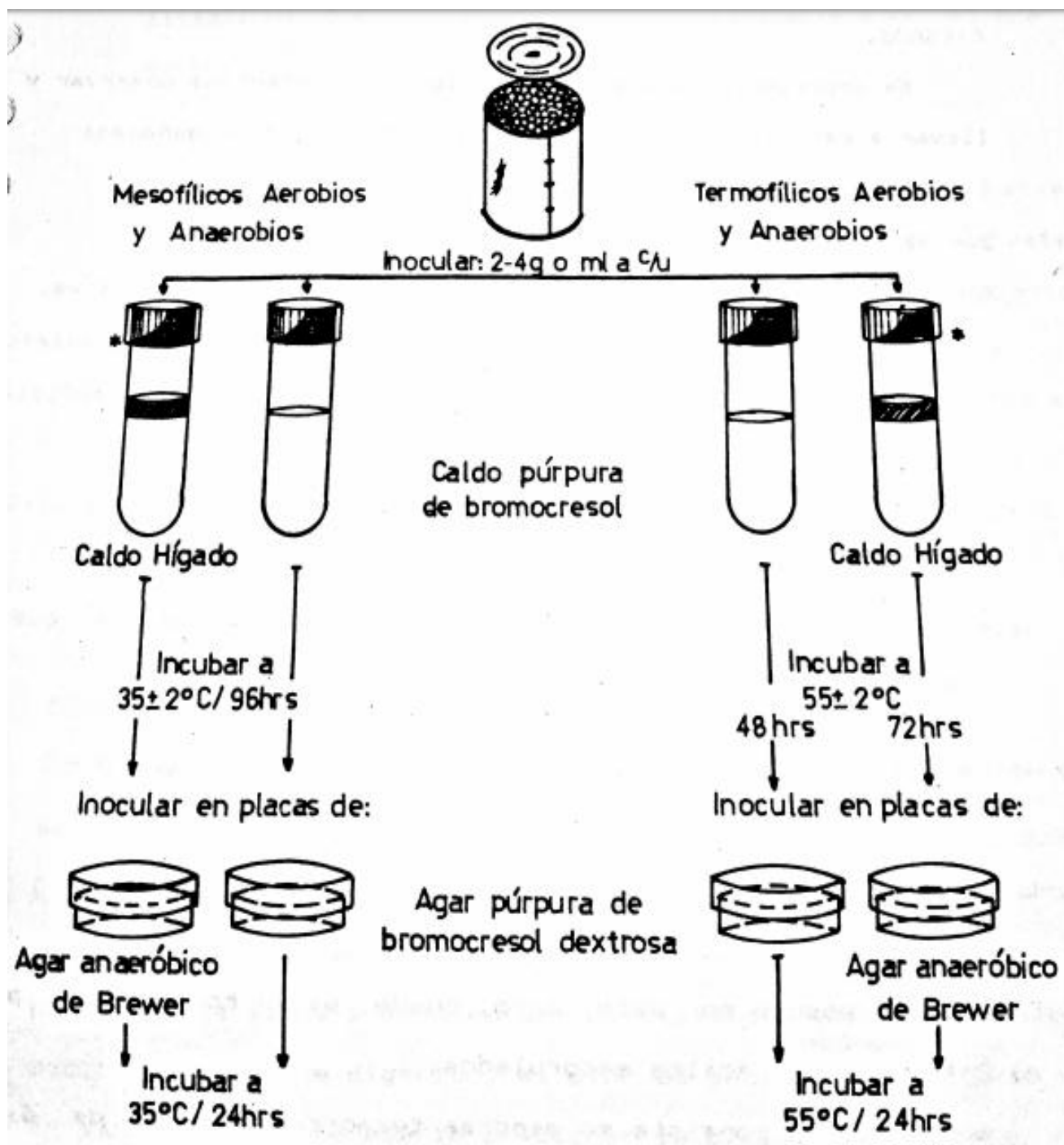


Figura 106. Análisis de alimentos enlatados con PH menor a 4.5

*sellarlos con vaspar (vaselina y parafina al 50%) o agar al 2%

➤ RIESGOS

Es importante para el desarrollo de la práctica observar y llevar a cabo las condiciones que a continuación se señalan:

1. No ingerir la muestra.
2. Usar cubrebocas de preferencia.
3. Si se tienen heridas o rasguños en las manos usar guantes.
4. Si el alimento analizado debe colocarse en un recipiente que le será proporcionado por el profesor.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).

- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

➤ Interpretación de resultados.

I. Latas alteradas, con PH de 4.5 o mayor.

- **Mesofílicos aerobios.** La flora presente en este caso, puede estar constituida por:

a) **Presencia de bacilos esporulados.**

Generalmente consiste en esporas termorresistente de diferentes especies de bacilos. Regularmente el alimento no presenta alteraciones, ya que las esporas no pueden desarrollar en condiciones de anaerobiosis, sin embargo, se han encontrado alteraciones producidas por bacilos con esporas resistentes (*Bacillus mesentericus* y *Bacillus subtilis*), en alimentos de acidez media, con tratamiento térmico adecuado, pero vacío térmico incompleto. También se ha encontrado *Bacillus nigrificans*, en conservas de betabeles con ennegrecimiento del producto.

b) Presencia de flora mixta.

La presencia de flora mixta se debe generalmente a la penetración de microorganismos, con posterioridad al proceso de esterilización, actuando como vehículo el agua de enfriamiento. La flora que se observa puede ser muy variada. La penetración de los microorganismos se debe a defectos en las cerraduras, que permiten el paso de estos. Las latas generalmente se encuentran infladas y pueden mostrar defectos o derrames. El pH y el aspecto del producto varían.

➤ **Mesofilicos anaerobios.**

Consiste de anaerobios del género *Clostridium*, entre los que se encuentran *C.sporogenes*, *C.putrificans*, *C.histolyticum*, *C.bifermentans*, *C.perfringens* y *C.botulinum*; este último es el de mayor importancia sanitaria, por producir una toxina muy potente. Las latas pueden estar parcialmente digeridas, el olor es pútrido y el pH aumenta. En este caso, es necesario practicar la prueba en animales, tanto del producto como del filtrado del cultivo, para investigar la presencia de la toxina.

➤ **Termofilicos aerobios.**

Consta de bacilos termofílicos estrictos o facultativos que poseen esporas muy resistentes al calor (especie tipo *B.stearothermophilus*, causante de la descomposición ácida. Las latas son planas, sin alteración y con un marcado aumento de la acidez del producto; puede haber anormal o enturbiamiento del líquido.

➤ **Termofilicos anaerobios.**

Pertenecen también al género *Clostridium*, con esporas muy resistentes al calor.

La espera tipo, *C. thomosaccharolyticum*, es un anaerobio estricto no productor de ácido sulfhídrico; las latas se encuentran infladas. Otro tipo de descomposición poco común, puede ser causada por *C. nifrificans*, que produce ácido sulfhídrico con ennegrecimiento del producto.

II. Latas alteradas, con pH menor de 4.5.

➤ Mesofilicos aerobios.

- a) Presencia de *Lactobacillus*. La descomposición por bacterias acidúricas no formadoras de esporas, puede deberse a varias especies del género *lactobacillus*. Se han aislado *L.lycoperci*, *L.pentoaceticus*, *L.menitopolum* y *L.pleofructi*.
- b) Presencia de levadura. El hallazgo de levaduras indica un proceso inadecuado. Las latas contaminadas generalmente se presentan muy hinchadas y el olor del producto es característico de levadura (olor ácido). Entre las levaduras se ha aislado el género *Torula*.
- c) Presencia de hongos. Otro tipo de descomposición puede ser causada por hongos como *Byssochlamys fulva*, que forma esporas muy resistentes al calor. Se han encontrado también algunas cepas de *Penicillium*; en estos casos generalmente las latas se encuentran planas, sin alteración y el hongo crece en la superficie del producto.

➤ Mesofilicos anaerobios.

Clostridium pasterianum causa una descomposición poco frecuente en donde las latas se encuentran infladas y con olor butírico. Si se sospecha este tipo de contaminación, sembrar un tubo con caldo ácido en anaerobiosis a 35°C.

➤ **Termofílicos aerobios**

La descomposición por termofílicos aerobios produce el tipo flat-sour, o sea la descomposición ácida. Las latas se encuentran planas y se observan cambios en el vacío; entre los microorganismos causantes está *B.coagulans*, que es el responsable de la descomposición de productos derivados del jitomate, y de la producción de grumos en leche evaporada.

➤ **Termofílicos anaerobios.**

La descomposición por termofílicos anaerobios es poco frecuente en productos ácidos, la producen anaerobios butíricos. En producto de acidez muy alta, con pH a 3.7, como col agria, encurtidos, etc.; la descomposición puede deberse a las bacterias ya señaladas, pero generalmente la acidez inhibe el desarrollo de microorganismos. En muchos casos, la hinchazón de la lata se debe a causa químicas, por formación de hidrogeno. Algunas veces se pueden encontrar cultivos negativos, proceden de latas anormales, o de latas normales con productos descompuestos. Esto puede deberse a que la alteración ocurrió antes del procesamiento térmico del enlatado y han muerto los microorganismos que lo originaron, o bien a que en un producto contaminado, los microorganismos murieron del producto puede ayudar al diagnóstico.



Figura 107. Lata de atún Tuny.

Se muestrearon 2 latas de atún de la marca Tuny en dos distintas presentaciones (en aceite y ensalada). Las latas presentaban abollamiento, el cual pudo presentarse desde su transporte hasta el momento de ser presentado en punto de venta. En la Tabla 21 se muestran las especificaciones y características de la lata de atún.

Tabla 21. Especificaciones y características de lata de atún.

Especificación	Características
Tipo de alimento	Lata de atún Tuny
Planta productora	Grupo Marítimo Industrial S.A. de C.V.
Marca registrada	✓
Fecha de Fabricación	16-Agosto-2018
Condiciones de almacenamiento	Refrigeración una vez abierta la lata
Sitio donde se adquirieron o muestrearon las latas alteradas	Supermercado
Número de latas fabricadas	3000
Lote de fabricación	CB3 16081821
Condiciones del procesado	Condiciones adecuadas
Método de enfriamiento	Al vacío
Proporción de latas afectadas	4% en zona de muestreo
Tiempo transcurrido desde la fabricación hasta el desarrollo de la alteración	3 meses



Figura 108. Lavado de latas

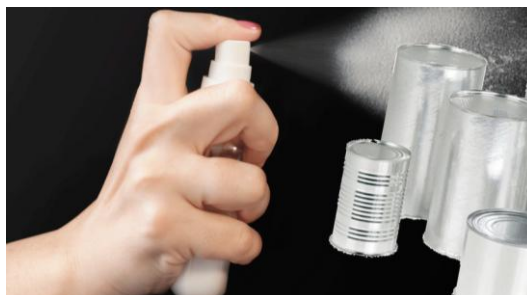


Figura 109. Desinfección de latas



Figura 110. Apertura de
latas



Figura 111. Análisis de las muestras

Las latas alteradas contaban con PH mayor a 4.5, lo que indica la presencia de Mesofílicos aerobios, de flora mixta, lo cual pudo deberse al sellado ineficiente de las latas, quedando con espacios por los cuales los microorganismos pudieran adentrarse. También presentaban Mesofilicos anaerobios del genero *Clostridium*. La Tabla 22 muestra los resultados del análisis microbiológico de las latas de atún, así como las observaciones generales realizadas de las mismas.

Tabla 22. Análisis microbiológico de alimentos envasados

TIPO DE ALIMENTO	TIPO DE MICROORGANISMO ENCONTRADO	OBSERVACIONES GENERALES
	FROTE CULTIVO	
Lata Atún Tuny en aceite	Mesófilos aerobios, Presencia bacteriana mixta	Ambas latas presentaban abollamiento, el cual pudo producirse durante el traslado o al momento de ofrecerse en punto de venta, este abollamiento propicio un mayor desarrollo colonial de microorganismos.
Lata Ensalada de Atún Tuny	Mesófilos aerobios Mesófilos anaerobios Presencia bacteriana mixta	

CONCLUSIONES

La inocuidad de los alimentos ha pasado a ser una cuestión de alta prioridad para muchos gobiernos. La amplia divulgación de algunos casos ha hecho evidente que el brote de una enfermedad significativa transmitida por alimentos puede tener consecuencias sanitarias, políticas y económicas.

Hoy día, existe una conciencia cada vez mayor del riesgo de contraer enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos de origen animal, frutas y vegetales frescos --enteros o cortados previamente, así como alimentos que han recibido un tratamiento mínimo. Por consiguiente, se espera un incremento de la demanda de tecnologías destinadas a proteger la calidad y aumentar la inocuidad de nuestros suministros de alimentos. Se debe tener un cuidado además en transmitir a los consumidores la importancia de no adquirir latas abolladas o con sellos rotos, a fin de evitar infecciones o intoxicaciones.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarado, O.J.M., Navarrete, B.J.L., Botello, A.J., Martínez, E.G.M., Jiménez, I.H. 2008. Efecto de la viscosidad sobre la convección natural 2-D en cavidades cilíndricas, durante la esterilización de alimentos líquidos. Memorias del XXIX Encuentro Nacional de la AMIDIQ. Puerto Vallarta. Jalisco. Vol 4. P. 162-172.
- Choi, Y. y Okos, M. 2006. Effects of temperature and composition on thermal properties of foods. Food engineering and process applications. Vol. 1. Maguer, P. Jelens (Eds). Transport Phenomenon. L. Elsevier. New York. P. 93-101.
- Marra, F. y Romano, V. 2003. "A mathematical model to study the influence of wireless temperature sensor during assessment of canned food sterilization". Journal of Food Engineering. Vol. 59. P. 245-252.
- Rees, J.A.G. y Bettison, J. 2011. "Procesado Térmico y Envasado de los Alimentos". Ed. Acribia. Zaragoza. España. P. 1-304.



PRÁCTICA No. 14
ANÁLISIS BACTERIOLOGICO DEL EQUIPO PARA CONTROLAR LA
EFICIENCIA DEL SANEAMIENTO

OBJETIVOS

1. Conocer la importancia del saneamiento del equipo, utensilios superficies y manipuladores, para prevenir la contaminación de los alimentos.
2. Conocer la importancia de los desinfectantes utilizados en la industria de los alimentos.
3. Evaluar los procedimientos de saneamiento del equipo, utensilios, superficies y manipuladores utilizando tres grupos indicadores.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ **Competencias específicas**

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar

herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales

C. Corsario I No. 203, Colonia Urías, C.P. 82070; Mazatlán, Sinaloa.

Tels. (669)983-84-00, 990-02-09, 991-10-61,

e-mail: dirección@itmazatlan.edu.mx

www.itmazatlan.edu.mx

❖ Competencias sistémicas

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

La higiene de los alimentos implica una variedad de acciones, entre las cuales, el evitar la contaminación ocupa lugar relevante. Cada fuente de contaminación que puede actuar sobre los alimentos presenta sus propias peculiaridades y por ello requiere de métodos especiales para lograr su control. Así ocurre con el agua, la tierra, la fauna, los manipuladores o el equipo y envases que finalmente habrán de contenerlos. En el caso del equipo este puede ser un vehículo pasivo de microorganismos, o puede constituirse en la base material sobre la cual, con un aseo deficiente, entren en actividad y lleguen a introducirse por millares en el alimento (Bueno *et al.*, 2006).

Mucho dinero y esfuerzo invertidos en una planta para seleccionar materias primas e instalar equipo costoso puede perderse si la limpieza y desinfección en general, o específicamente en los puntos críticos, no se realiza y evalúa su eficacia correctamente. Existen procesos de lavado y desinfección, que utilizan sustancias y condiciones de tratamiento propio para cada necesidad en las



distintas ramas de la industria de alimentos. Cuando las normas o recomendaciones para su aplicación se siguen con acierto, los resultados son claramente satisfactorios. El establecimiento de sistemas de higienización (aseo y desinfección) adecuados del equipo, debidamente programados y en manos de personal responsable y adiestrado debiera ser una exigencia motivo de supervisión especial dentro de cada industria y por parte de la autoridad sanitaria competente. El laboratorio proporciona un valioso recurso que permite evaluar satisfactoriamente la eficacia de estos procesos (DGEPI, 2008).

Existen números métodos para tal efecto, el recuento de microorganismos viables en el equipo tratado es sencillo y confiable, aunque necesariamente requiere de tiempo para disponer de los resultados. El recuento puede practicarse por tres técnicas: la impronta sobre la superficie, el uso de hisopo y la del muestreo con una esponja de poliuretano. La impronta se efectúa sobre un bloque de gelosa nutritiva estéril que se aplica sobre la superficie en estudio sin extenderlo; los microorganismos presentes se adhieren al bloque que posteriormente se incuba. La cuenta de colonias desarrolladas se relaciona con el área de gelosa aplicada para referirla a una unidad de superficie. La técnica del hisopo consiste en extender sobre una superficie determinada (generalmente 25 cm²) un hisopo humedecido que recoge la flora microbiana y suspenderla en un diluyente a partir del cual se efectúan los recuentos (Flores, 2002).

En la técnica de la esponja, se utilizan esponjas estériles de espuma de poliuretano de 13 cm x 7.5 cm x 4 cm, (o de dimensiones aproximadamente similares) y bolsas nuevas de plástico transparente (50u de espesor) de 30 cm x 40 cm (o de dimensiones similares). Consiste en pasar la esponja sobre toda la superficie del equipo o utensilio que se va a muestrear pudiendo estimar de esta



manera el contenido microbiano de toda la superficie y no únicamente dimensiones limitadas como sucede en las dos técnicas anteriores. Se ha comprobado experimentalmente que las esponjas usadas no tienen sustancias antimicrobianas y que las bolsas de plástico pueden ser consideradas no contaminadas para los fines perseguidos (Lima y Mazari, 2005). De acuerdo con Haro *et al.*, (2009), las superficies y utensilios a muestrear pueden ser diversas como:

- a) **Mesas, tablas de picar** etc.: se tomará la muestra con la esponja en la superficie total tratando de llegar a las hendiduras y esquinas que pudiera presentar esta superficie.
- b) **Cucharas, cuchillos, tenedores** etc.: se tomara la muestra en toda la superficie de los utensilios exceptuando el mango, prestando atención a las partes internas, como es el caso de los tenedores entre diente y diente.
- c) **Vasos, platos** etc.: tomar la muestra frotando con la esponja toda la superficie del utensilio que está expuesta a los alimentos incluyendo el borde que como en el caso del vaso estaría en contacto con los labios del usuario.
- d) **Manos**: debe tomarse frotando con la esponja toda la palma de la mano, incluyendo la parte interna y externa de cada uno de los dedos, teniendo cuidado de hacerlo también en los bordes de las uñas.



CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

4.2 Métodos físicos para el control del crecimiento microbiano. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.

MATERIAL

- 2 Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- 15 cajas Petri
- 20 Tubos de ensaye de 16 x 150
- 10 Pipetas de 5 o 10 mL
- 1 Balanza analítica





1 Incubadora

1 Autoclave

1 Asa

Hisopos

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Agar para método estándar

Agar estreptocócico KF

Agar de bilis y rojo violeta

agar cuenta estándar

METODOLOGÍA

Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-244-SSA1-2016, Para evaluar la eficiencia en reducción bacteriana en equipos y superficies. Requisitos sanitarios.

En la práctica se realizarán 3 estudios que comprenden las superficies o utensilios en las siguientes condiciones:

1. **Sucios:** se consideran estos después de haber sido utilizadas en la preparación o consumo de alimentos y en el caso de las mesas, puertas, etc., en las condiciones en que se encuentren.
2. **Lavado:** llevar a cabo este, con agua y jabón o detergente, enjuagar con agua y secar con paño limpio. Realizar la operación sin poner especial interés en un tratamiento exagerado o defectuoso.



3. **Desinfectado:** para este propósito, se utilizarán desinfectantes comerciales en la concentración y el tiempo indicado por el fabricante secando con un paño limpio.

4. Las **diluciones** que se utilizaran en la práctica son las señaladas a continuación:

5. Sucio:

Mesofílicos aerobios 10^{-1} ; 10^{-3} ; 10^{-5}

Organismos coliformes 10^{-1} ; 10^{-3} ; 10^{-5}

Organismos enterococos 10^{-1} ; 10^{-3}

6. Lavado:

Mesofílicos aerobios Directa; 10^{-1} ; 10^{-3}

Organismos coliformes Directa; 10^{-1} ; 10^{-3}

Organismos enterococos Directa; 10^{-1}

7. Desinfectado:

Mesofílicos aerobios Directa; 10^{-1}

Organismos coliformes Directa; 10^{-1}

Organismos enterococos Directa; 10^{-1}

8. Llenar cuadro de resultados y discutir.

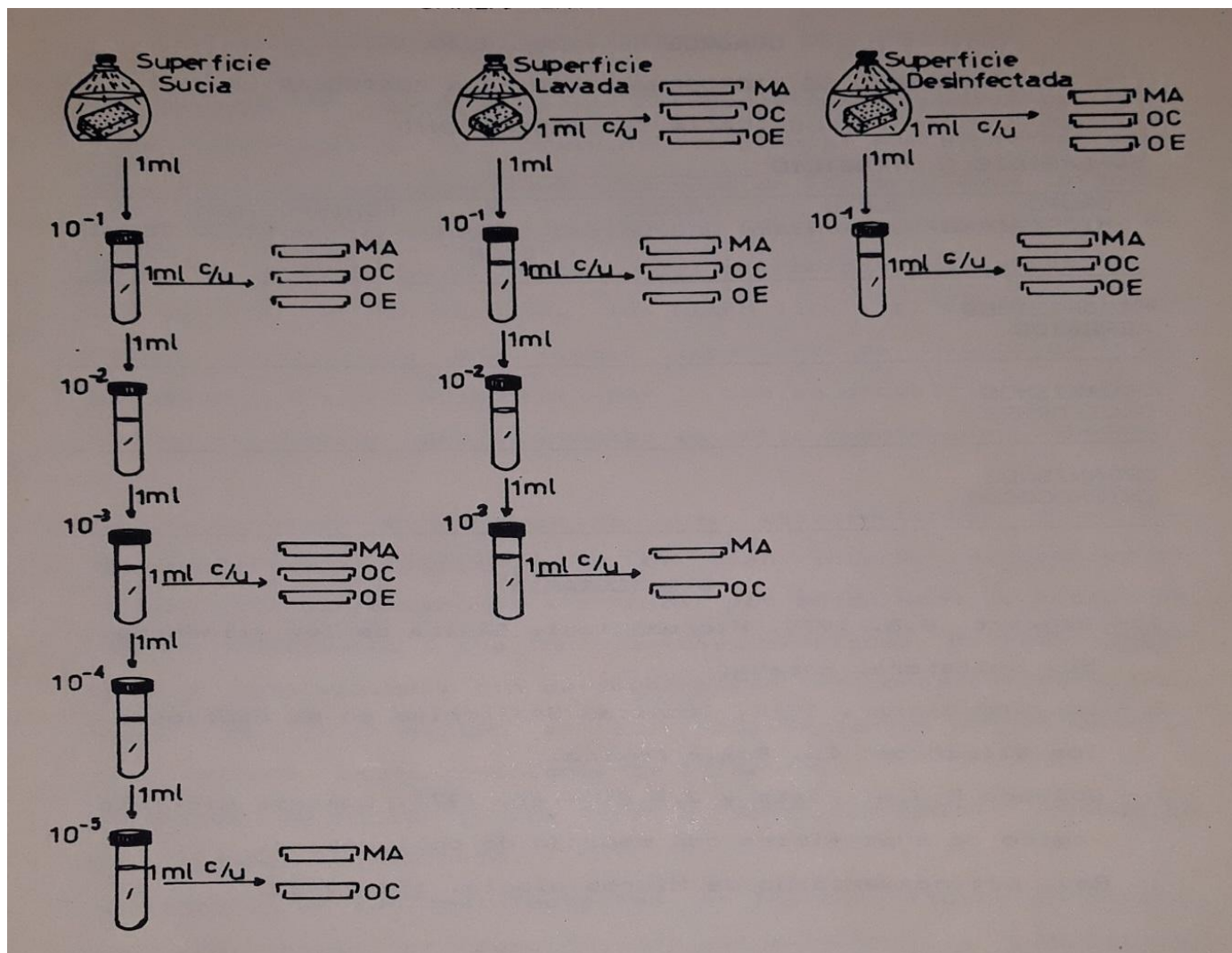


Figura 112. Recuento de microorganismos para controlar la eficacia del saneamiento (NOM-244-SSA1-2016).

Significado de la figura: Tubos de dilución con 9 mL de solución diluyente. MA = Mesófilos aerobios – agar cuenta estándar. – $35 \pm 2^\circ\text{C}$ / $48 \pm 2\text{hrs}$, OC = Organismos coliformes- Agar de Bilis y Rojo Violeta, incubar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ / $24 \pm 2\text{hrs}$ y OE = Organismos enterococos-Agar estreptocócico KF, incubar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ / $48 \pm 2\text{hrs}$

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se tomaron las muestras en las superficies sucias mediante el método del hisopo y se procedió a realizar los análisis microbiológicos.



Figura 113. Toma de muestra de superficie sucia mediante método del hisopo.



Figura 114. Desarrollo colonial mesófilos (superficie sucia).



Figura 115. Desarrollo colonial coliformes (superficie sucia).



Figura 116. Desarrollo colonial enterococos (superficie sucia).

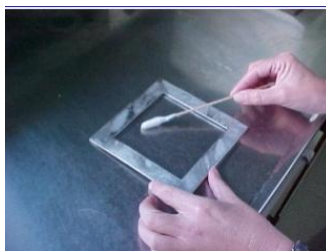


Figura 117. Toma de muestra de superficie limpia.



Figura 118. Desarrollo colonial mesófilos (superficie limpia).



Figura 119. Desarrollo colonial coliformes (superficie limpia).

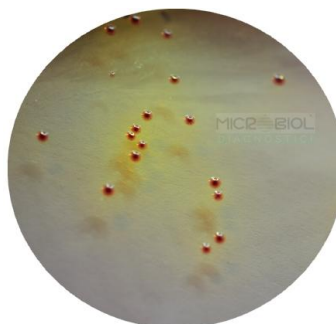


Figura 120. Desarrollo colonial enterococos (superficie limpia).

La Tabla 23 muestra los resultados obtenidos en los diversos análisis realizados a la mesa de trabajo en las distintas condiciones (Sucio, lavado y desinfectado).

Tabla 23. Recuento de microorganismos para controlar la eficacia del saneamiento.

Grupo microbiano	Sucio UFC/unidad	Lavado UFC/unidad	% Reducción	Desinfectada UFC/unidad	% Reducción
Mesófilos aerobios	230	120	48	26	89
Organismos coliformes	153	88	42	13	92
Organismos enterococos	165	96	42	21	81

De acuerdo al método del hisopo el límite permitido para mesófilos aerobios es menos de 400 UFC/unidad y para coliformes es menos de 200 UFC/unidad, por lo que no se supero el límite permisible en ningún análisis según la NOM-22-SSA1-2016. La mayor frecuencia de desarrollo bacteriano en mesas y microscopios se atribuye al uso frecuente de estas por parte de los alumnos y a la ausencia de



protocolos de limpieza y desinfección, factores determinantes para evitar la contaminación bacteriana. El desarrollo de mesófilos aerobios en la totalidad de las muestras puede relacionarse con las condiciones ambientales de la ciudad.

CONCLUSIONES

Si bien las superficies inertes tienen un riesgo mínimo de transmitir directamente una infección, estas contribuyen de manera importante en la contaminación cruzada secundaria al entrar en contacto con superficies vivas como piel, boca, nariz o garganta o con otras superficies inertes. Así pues, la contaminación bacteriana y micológica de mesas y microscopios constituye un riesgo para la salud de los alumnos que realizan prácticas escolares en los laboratorios de enseñanza. Por lo tanto se recomienda elaborar, implementar y monitorear un protocolo de limpieza y desinfección de superficies, material y equipo de los laboratorios de enseñanza para garantizar a los usuarios su permanencia en un ambiente limpio con la menor carga de contaminación donde se minimicen los riesgos de transmisión de enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bueno, J., Alexander, H. Mazari, M. y Piñero, D. 2006. Los residuos peligrosos y su impacto en los ecosistemas. En los residuos peligrosos en México, editado por Rivero, O. Ponciano, G. y González, S. P.43-54. México: Programa Universitario de Medio Ambiente, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).





DGEPI. 2008. Boletín epidemiológico 2007 y
2008. http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html

Flores, L.J.L. 2002. Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos. Ginebra: Food and Agricultural Organization. Corporate Document Repository.

Haro, J.A., Bolaños, A., Covarrubias, A., Nubes, G., Cabrera, A., Calderón, R., Grijalva, M.I., Hersch, P. Mada, J.G., Minjárez, L.B, Moreno, J.L., Noriega, L., Ramos, J.E. y Santillana, F. 2009. La prevención de daños evitables a la salud en México: una evaluación de la gestión del desempeño de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), tomo I. Informe final de investigación. Hermosillo: El Colegio de Sonora. <http://www.slideshare.net/JESUSARMANDO HARO/informe-2009evaluacion-cofepris>

Lima, A.J. y Mazari, M. 2005. *Evaluación bacteriológica de la calidad del agua en el río Lerma*. México: Instituto de Ecología (INE)-UNAM. http://www.ine.gob.mx/descargas/cuencas/cong_nal_06/tema_05/03_alberto_lima.pdf



PRACTICA 15.

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE UN DESINFECTANTE

OBJETIVOS

- 1.- Conocer la acción de los agentes destinados para la limpieza y desinfección del equipo y utensilios en una planta procesadora de alimentos.
- 2.- Conocer una técnica utilizada para evaluar la eficacia de los desinfectantes.
- 3.- Aplicar un método para evaluar la acción de un desinfectante.

COMPETENCIAS A DESARROLLAR

➤ Competencias específicas

- ✓ Integrar el conocimiento de los fundamentos básicos de los alimentos y microorganismos con los alimentos como sustrato, con microorganismos importantes en microbiología de alimentos y con contaminación y alteración de los alimentos.
- ✓ Desarrollar los temas sobre microorganismos en la producción de alimentos marinos.
- ✓ Realizar de manera práctica la siembra en medios de cultivo de una muestra de alimento marino para desarrollar la carga microbiana presente.
- ✓ Identificar las técnicas microbiológicas en alimentos y los métodos para evaluar la calidad higiénica en alimentos marinos.
- ✓ Integrar los conceptos de microorganismos en el diseño de métodos microbiológicos en la industria alimentaria, proporcionar herramientas sobre la identificación y asilamiento de hongos y levaduras en alimentos, evaluar la calidad de diferentes alimentos.

- ✓ Determinar la presencia o ausencia de microalgas tóxicas en alimentos marinos mediante técnicas microbiológicas según la normatividad.
- ✓ Evaluar el crecimiento y control de los microorganismos mediante métodos físicos y químicos.
- ✓ Integrar el conocimiento de los desinfectantes, antisépticos así como de su actividad antimicrobiana y la prevención de patógenos a diferentes niveles.

➤ **Competencias genéricas.**

❖ **Competencias instrumentales**

- ✓ Capacidad de análisis y síntesis
- ✓ Capacidad de organizar y planificar
- ✓ Conocimientos básicos de alimentos
- ✓ Comunicación oral y escrita sobre temas de ciencia de los alimentos
- ✓ Habilidades básicas de manejo de la computadora
- ✓ Habilidad para buscar y analizar información proveniente de fuentes diversas sobre los alimentos y sus nutrientes.
- ✓ Solución de problemas
- ✓ Toma de decisiones

❖ **Competencias interpersonales**

- ✓ Capacidad crítica y autocrítica
- ✓ Trabajo en equipo
- ✓ Capacidad de trabajar en equipo interdisciplinario
- ✓ Apreciación de la diversidad y multiculturalidad
- ✓ Habilidades interpersonales



❖ **Competencias sistémicas**

- ✓ Capacidad de aplicar los conocimientos en la práctica
- ✓ Habilidades de investigación sobre temas de la ciencia de los alimentos
- ✓ Capacidad de aprender temas sobre los alimentos
- ✓ Capacidad de generar nuevas ideas (creatividad)
- ✓ Habilidad para trabajar en forma autónoma
- ✓ Búsqueda del logro de los objetivos planteados en la materia de ciencia de los alimentos.

INTRODUCCIÓN

La eliminación adecuada de los microorganismos constituye una fase importante en la higiene de las plantas que elaboran alimentos, esto se puede considerar como uno de los problemas principales en la presencia de enfermedad para los consumidores, en donde el alimento es el vehículo del microorganismo patógeno. Las superficies contaminadas, los utensilios y el equipo mal saneado, constituyen una fuente importante de microorganismos patógenos para los alimentos, por lo que es necesario la utilización de algunos desinfectantes en esta fuente de contaminación. La utilización de sustancias como desinfectantes sobre los microorganismos patógenos es de gran interés, el conocer el metabolismo microbiano para entender los mecanismos de acción de los desinfectantes y sus implicaciones prácticas, ha dado lugar a mucha información a fin de desarrollar un concepto más claro, sobre todo, de la acción de los desinfectantes más comúnmente utilizados en la microbiología de alimentos (López, 2007).

La reacción de los desinfectantes con los constituyentes celulares puede involucrar reacciones de oxidación-reducción, hidrólisis, formación de sales,





transposición con algunos grupos como los de las proteínas, adsorción en la interfase, etc., lo anterior puede suceder en partes fundamentales del microorganismo: lesión a la membrana celular, lesión al núcleo, a los genes y en consecuencia inhibición de enzimas (Sánchez, 2009).

Algunos desinfectantes, como compuestos nitrogenados, fosforados, y los detergentes rompen la barrera osmótica permitiendo la salida de los componentes celulares metabólicamente activos, destruyendo con esto a los microorganismos. Otros desinfectantes como el peróxido de hidrogeno o los compuestos halogenados ejercen su acción antimicrobiana al reaccionar con los compuestos de la membrana citoplasmática (Flores, 2002).

Algunos agentes tienen afinidad particular por los núcleos o genes de las células microbianas. Por ejemplo, se tiene a los colorantes básicos, como el cristal violeta, los cuales reaccionan con los ácidos nucleicos de las nucleoproteínas quizás para la formación de sales. Los desinfectantes que presentan metales pesados reaccionan con los grupos sulfhidrilo (-SH) de las nucleoproteínas inhibiendo la acción enzimática, interrumpiendo con esto el crecimiento microbiano. Los compuestos como desinfectantes que inhiben a las enzimas se encuentran en el ácido nitroso el cual desamina a ciertas bases de DNA, como a la adenina a la que convierte en hipoxantina, la citosina en uracilo y la guanina en xantina (Haro *et al.*, 2009).

En este grupo están algunos agentes alquilantes como el óxido de etileno, etilenmetasulfónico y las mostazas nitrogenadas, los cuales actúan por la alquilación de uno o más de los átomos de nitrógeno de las bases del ácido desoxirribonucleico (DNA), causando anomalías en el apareamiento de las bases en la hélice del DNA y también la pérdida posiblemente de unas de las bases. Los desinfectantes de cloro, yodo y las sales cuaternarias de amonio son los más





comúnmente utilizados en la industria de alimentos, presentando ventajas y desventajas sobre su utilización (DGEPI, 2008).

CORRELACIÓN CON EL TEMA Y SUBTEMA DEL PROGRAMA DE ESTUDIO VIGENTE

4.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes y antisépticos. Aplicación en el contexto

Esta asignatura aporta al perfil del Ingeniero Bioquímico la capacidad para comprender y explicar los conceptos de flora microbiana natural de los alimentos marinos, microorganismos en la producción de alimentos marinos, métodos de aislamiento y conservación de microorganismos, control de los microorganismos en alimentos marinos y aplicarlos para identificar, interpretar, operar y optimizar equipos y procesos que utilicen alimentos y productos alimenticios para su transformación y/o conservación, aplicando las tecnologías convencionales y las emergentes. Realizar investigación que contribuya al desarrollo tecnológico alimentario de la región y/o del país, difundiendo los resultados generados y el impacto en beneficio del sector involucrado, región y/o país.

Para integrarla se ha hecho un análisis del campo de la Ciencia, identificando los fundamentos básicos del aprovechamiento de los recursos marinos, además de los alimentos como sustrato de los microorganismos, microorganismos importantes en microbiología de los alimentos marinos, contaminación de los alimentos marinos y alteración de los alimentos marinos que tienen una mayor aplicación en el quehacer profesional del Ingeniero Bioquímico.





MATERIAL

9 Matraz Erlenmeyer de 250 mL

27 cajas Petri

20 Pipetas de 5 o 10 mL

1 Balanza analítica

1 Incubadora

REACTIVOS

Muestra determinada previamente

Solución reguladora de fosfato como diluyente

Microdyn

Agar para método estándar

Agar de bilis y rojo violeta

Agar KF Estreptocócico

METODOLOGÍA

PROYECT NOM-244-SSA1-2016. Para evaluar la eficiencia de un desinfectante en equipos y utensilios. Requisitos Sanitarios.

1. Se cortara una lechuga sin lavar y se pesaran 10 g en un frasco de dilución diluyente (dilución 10^{-1}) practicando diluciones hasta 10^{-5} en tubos con 9mL de solución diluyente (sucia).
2. A la misma lechuga contenida en el frasco de dilución se le enjuagara con agua estéril, escurriendo el agua y se le agregara 90 mL de solución diluyente (dilución 10^{-1}) y se harán diluciones hasta 10^{-3} (lavada).
3. Adicionar un desinfectante comercial en cantidad y tiempo de acuerdo con las indicaciones del producto.



4. Se escurre la solución y se adicionan nuevamente 90 mL de solución diluyente (dilución 10^{-1}) (desinfectada).

En cada uno de los casos se utilizarán las diluciones siguientes, empleando los medios correspondientes para cada uno de los grupos estudiados.

Tabla 24. Especificaciones a seguir para evaluar calidad de desinfectante.

Lechuga sucia	Diluciones	Incubar	Tiempo
Mesófilos aerobios	10^{-1} 10^{-3} 10^{-5}	35 ± 2 °C	48
Org. Coliformes	10^{-1} 10^{-3} 10^{-5}	35 ± 2 °C	24
Org. Enterococos	10^{-1}	35 ± 2 °C	48
Lechuga lavada			
Mesófilos aerobios	10^{-1} 10^{-3}	35 ± 2 °C	48
Org. Coliformes	10^{-1} 10^{-3}	35 ± 2 °C	24
Org. Enterococos	10^{-1}	35 ± 2 °C	48
Lechuga desinfectada			
Mesófilos aerobios	10^{-1}	35 ± 2 °C	24
Org. Coliformes	10^{-1}	35 ± 2 °C	48
Org. Enterococos	10^{-1}	35 ± 2 °C	48

5. Incubar a la temperatura y tiempos señalados para cada uno de los grupos microbianos.
6. Al finalizar el tiempo de incubación, realizar los recuentos y llenar el cuadro de resultados.

SUGERENCIAS DIDÁCTICAS

- ✓ Realizar al inicio del curso, una visita al centro de Información de la Institución para orientar a los estudiantes en la búsqueda de material relacionado con la práctica.
- ✓ Inducción a la investigación documental actualizada, de campo o experimental, trabajando en forma individual y en equipos (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Fomentar el uso de la tecnología de información, particularmente consultando material disponible en Internet sobre el contenido del curso y que tenga respaldo científico.
- ✓ Fomentar foros para la exposición y discusión en clase de artículos científicos e información de otros tipos fuentes (libros, reportes, notas periodísticas, entre otras).
- ✓ Realizar talleres de solución de problemas (desarrollar la inducción, deducción, síntesis y análisis para fomentar las cualidades de investigación experimental).
- ✓ Participación en seminarios (discutir en grupos para intercambiar ideas argumentadas así como analizar conceptos y definiciones).
- ✓ Fomentar el uso de información en un segundo idioma.
- ✓ Propiciar el trabajo en equipo.
- ✓ Desarrollar prácticas de laboratorio de tal manera que los estudiantes apliquen los conocimientos adquiridos y los relacionen con otras disciplinas.
- ✓ Gestionar la vinculación con el campo laboral por medio de visitas a diversos sectores.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se tomaron diversas muestras de una lechuga en diferentes estados (sucia, lavada y desinfectada) para su posterior análisis microbiológico.



Figura 121. Toma de muestra de lechuga sucia mediante método del hisopo.

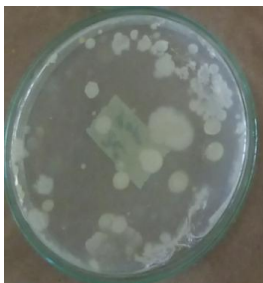


Figura 122. Desarrollo colonial mesófilos (lechuga sucia).



Figura 123. Desarrollo colonial coliformes (lechuga sucia).



Figura 124. Desarrollo colonial enterococos (lechuga sucia).



Figura 125.- Toma de muestra de lechuga lavada.



Figura 126. Desarrollo colonial mesófilos (lechuga lavada).



Figura 127. Desarrollo colonial coliformes (lechuga lavada).

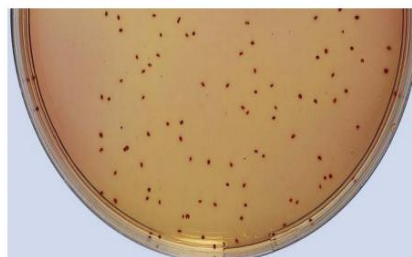


Figura 128. Desarrollo colonial enterococos (lechuga lavada).

De acuerdo a la Tabla 25 se observa que la lechuga sucia presentaba un alto índice de contaminación tanto de mesófilos, como de coliformes y enterococos. Después del lavado de la lechuga con agua constante se observó una disminución de mesófilos aerobios de un 52%, de coliformes en un 34% y de enterococos en un 25%. Finalmente se desinfectó la lechuga con microdyn se observó una reducción de presencia microbiana de 86% para mesófilos aerobios, 75% en coliformes y 100% para organismos enterococos.

Tabla 25. Evaluación de la actividad de un desinfectante.

Grupo microbiano	Sucio UFC/unidad	Lavado UFC/unidad	% Reducción	Desinfectada UFC/unidad	% Reducción
Mesófilos aerobios	112	54	52	16	86
Organismos coliformes	12	8	34	3	75
Organismos enterococos	8	6	25	0	100

CONCLUSIONES

Es recomendable elaborar, implementar y monitorear un protocolo de limpieza y desinfección de alimentos como frutas y verduras para garantizar a los consumidores la ingesta de alimentos de calidad que no vayan a afectar su salud. El uso de desinfectantes alimenticios previene enfermedades, aumenta la vida útil de los alimentos y mejora la calidad de los mismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DGEPI. 2008. Boletín epidemiológico.

http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/plantilla/intd_boletin.html

Flores, L.J.L. 2002. Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos. Ginebra: Food and Agricultural Organization. Corporate Document Repository.

Haro, J.A., Bolaños, A., Covarrubias, G., Nubes, A., Cabrera, R., Calderón, M.I., Grijalva, P., Hersch, J.G., Mada, L.B., Minjárez, J.L. Moreno, L., Noriega, J.E., Ramos, E. y Santillana, M. 2009. La prevención de daños evitables a la salud en México: una evaluación de la gestión del desempeño de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), tomo I. Informe final de investigación. Hermosillo: El Colegio de Sonora. <http://www.slideshare.net/JESUSARMANDO HARO/informe-2009evaluacion-cofepris>

López, A.D.F. 2007. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fúngica básica. Método de ensayo y requisitos. AENOR, UNE-EN 1275, 1-30.

Sánchez, G.R.T. 2009. Actividad bactericida y/o fungicida en superficies y alimentos. Ensayo cuantitativo de superficies y alimentos no porosos para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de los desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios en la industria, en el hogar y en la colectividad.