



MANUAL TEÓRICO - PRÁCTICO

MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

Biólogo - Microbiólogo

Primera edición 2025

Presentación virtual

www.florgarciah.com

Derechos reservados de autor

Dra. Flor Teresa García Huamán

Prohibida la reproducción total o parcial con fines comerciales.

CONTENIDO

Introducción a la microbiología agroindustrial	5
Práctica: Bioseguridad en el laboratorio	6
Práctica: Materiales, equipos y reactivos	7
Práctica: Coloración Gram	17
Bacterias, levaduras y hongos de interés agroindustrial	22
Práctica: Coloraciones bacterianas	32
Hongos: crecimiento, metabolismo y reproducción	35
Práctica: Preparados microscópicos para la observación de levaduras y mohos	44
Factores intrínsecos y extrínsecos que controlan el crecimiento bacteriano	46
Práctica: Preparación de medios de cultivo	53
Microorganismos indicadores y patógenos de importancia en la agroindustria	55
Práctica: Técnicas de siembra	62
Alteraciones químicas positivas y negativas causadas por microorganismos	64
Práctica: Análisis microbiano de alimentos frescos	66
Deterioro microbiano en la agroindustria	68
Fundamento de medios de cultivo	71
Práctica: Interpretación y fundamentación del crecimiento microbiano	81
Control del desarrollo microbiano	85
Práctica: Factores que afectan a la termorresistencia, agentes fisicoquímicos y círculo de Sinner	91
Criterios microbiológicos de calidad de productos alimentarios y no alimentarios	94
Muestreo microbiológico	98
Práctica: Plan de muestreo microbiológico	102
Práctica: Microorganismos que causan riesgo directo e indirecto en la salud	104
Principios de buenas prácticas de manufactura	106
Práctica: Aplicación de buenas prácticas de manufactura	109
Métodos de análisis aplicados a la microbiología	114
Método de conteo directo e indirecto de microorganismos	119
Aislamiento e identificación de microorganismos	123
Técnicas bioquímicas, inmunológicas, inmunomovilización y genéticas	125
Interpretación de resultados microbiológicos	147

ANEXOS

Inhibidores del crecimiento de las bacterias 151

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 152

INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL

La microbiología es una de las ramas que integran la biología y se enfoca en el estudio de los microorganismos.

El objeto de estudio de la microbiología son aquellos organismos no perceptibles al ojo humano, por lo que un instrumento propio de esta rama de la biología es el microscopio, inventado en el siglo XVII.

Entre los organismos que estudia la microbiología se encuentran los agregados celulares eucariotas y procariotas, las células, hongos, virus y bacterias y todos aquellos elementos microscópicos.

La microbiología agroindustrial es una rama de la microbiología que se enfoca en el estudio y la aplicación de microorganismos (como bacterias, hongos, levaduras, virus y otros) en los procesos agroindustriales. Estos microorganismos tienen un impacto significativo en la producción, conservación y transformación de productos agrícolas y alimentarios.

En esta disciplina, se investiga cómo los microorganismos pueden ser utilizados de manera beneficiosa en la industria, como en la fermentación para producir alimentos y bebidas (por ejemplo, pan, cerveza o yogur), en la mejora de la calidad del suelo, en la biotransformación de residuos agrícolas o en la producción de biocombustibles. También se estudian los riesgos relacionados con la contaminación microbiana y la seguridad alimentaria.

La microbiología agroindustrial permite aumentar la eficiencia, sostenibilidad y seguridad en la producción agrícola e industrial, contribuyendo al desarrollo económico y a la protección del medio ambiente.

Los avances recientes en microbiología agroindustrial han transformado significativamente la forma en que se producen alimentos, se manejan cultivos y se desarrollan productos sostenibles. Estos avances integran biotecnología, ingeniería genética, microbiomas y nuevas herramientas de diagnóstico.

Se han modificado bacterias y hongos para mejorar su eficiencia en la producción de enzimas, biocombustibles, antibióticos o biofertilizantes. También se han creado cepas resistentes a virus o contaminantes. Se está aplicando Inteligencia Artificial y aprendizaje automático para predecir condiciones óptimas de fermentación en la producción de alimentos, bebidas y bioproductos, mejorándose así el rendimiento, sabor, textura y seguridad de alimentos fermentados.

Los avances en microbiología agroindustrial están impulsando una agricultura más sostenible, eficiente y tecnológicamente avanzada, con beneficios tanto económicos como ambientales. La integración con otras ciencias como la bioinformática, la genética y la inteligencia artificial ha acelerado estos logros.

PRÁCTICA
BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

I.- **OBJETIVO:** Aplicar las normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología en el desarrollo de las prácticas.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

La bioseguridad se define como un conjunto de medidas encaminadas a proteger al personal de laboratorio de la exposición a riesgos biológico en el laboratorio, así como también la protección del ambiente.

La OMS define a la bioseguridad como el conjunto de normas y medidas destinadas a proteger la salud del personal frente a riesgos biológicos, químicos o físicos a los que esté expuesto durante el desempeño de sus funciones.

Los laboratorios se clasifican como sigue: Laboratorio básico: Nivel de bioseguridad 1; Laboratorio básico: Nivel de bioseguridad 2; Laboratorio de contención: Nivel de bioseguridad 3, y Laboratorio de contención máxima: nivel de bioseguridad 4.

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio
1	1	Enseñanza básica, investigación
2	2	Servicios de atención primaria, diagnóstico, investigación
3	3	Diagnóstico especial, investigación
4	4	Unidades de patógenos muy peligrosos

II. Mencione y explique las normas de bioseguridad en el laboratorio de microbiología

.....

.....

.....

.....

PRÁCTICA

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

I.-OBJETIVO: Reconocer el uso y la importancia de los materiales, equipos y reactivos en el laboratorio de microbiología

II. FUNDAMENTO TEÓRICO

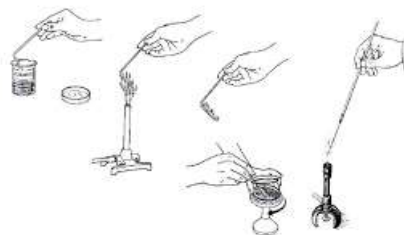
MATERIALES

Asa bacteriológica

- El asa bacteriológica o también llamada asa de Kolle es un instrumento de laboratorio que consta de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento que puede ser de nicron, wolfranio, o platino que termina o en un arito de 5 mm o en punta.
- Se emplea para transportar, arrastrar, trasvasar inóculos (pequeño volumen que contiene microorganismos en suspensión) desde la solución de trabajo también llamada “solución madre” al medio de cultivo (sólido o líquido) o de un medio a otro (resiembra). También sirve para la realización de frotis.
- La cantidad de inóculo que se trasvasa viene determinado por el diámetro del aro final del filamento, que se encuentra calibrado y normalmente oscila entre 0,01 y 0,001 ml.



El asa se debe esterilizar antes y después de usar. Para esterilizar el asa bacteriológica en el mechero se procede de la siguiente manera: se debe colocar el asa en la parte alta de la llama, adoptando una posición lo más vertical posible, de tal manera de esterilizar desde la punta hacia arriba.



Placas Petri

La placa o caja de petri es un instrumento de laboratorio que consta de una base circular y sus paredes son de una altura baja, aproximadamente de 1 cm.

La caja o placa de Petri es un recipiente redondo de cristal con una tapa de la misma forma, para que se pueda colocar encima y cerrar el recipiente, aunque no de forma hermética.

La placa de Petri es destinada para diversos fines tales como el crecimiento de bacterias u otros microorganismos.

Las placas Petri se rotulan en la cara trasera.



Tubos de Ensayo

El tubo de ensayo se utiliza principalmente como contenedor de líquidos y sólidos a los cuales se les va a someter a reacciones químicas u otras pruebas. Posee una forma cilíndrica alargada generalmente de vidrio. Su base tiene forma de “U” redondeada.

Están hechos de vidrio de borosilicato (más comúnmente), pero también pueden estar hechos de cuarzo fundido para soportar altas temperaturas.



Campanas Durham

La campana Durham es un tubo de laboratorio de vidrio con boca recta y fondo redondo. Es un tubo para la recuperación de gas. Se coloca boca abajo dentro de tubos de ensayo más grandes y permite la visualización de las burbujas de aire atrapadas que han generado los microorganismos.

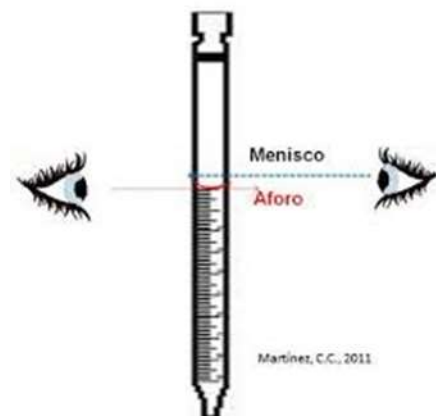


Pipetas

Una pipeta se usa para medir y para realizar la transferencia de un líquido desde un recipiente a otro. Por lo general están elaborados con materiales de plástico o vidrio, poseen una punta con forma cónica.

Las pipetas varían en volumen, midiendo entre 0 y 25.0 mililitros. Las pipetas graduadas tienen una escala dividida en unidades de 1, 1/10, 1/100 mililitro

Tipos de Pipeta: Pipeta Graduada, Pipeta Automática, Pipeta Volumetrica, Pipeta Aforada



Vaso de precipitación

El vaso de precipitación sirve para realizar ensayos. Tienen un pico vertedor. Ventajoso para transferir las soluciones, pero se convierte en un inconveniente para la conservación de muestras porque no tiene cerrado hermético.



Probeta

Es un instrumento graduado que se utiliza para medir el volumen de un líquido. Es cilíndrico, alto y estrecho. Cada línea marcada en el cilindro graduado representa un volumen de líquido, comúnmente en mililitros (ml). Pueden ser de plástico o de vidrio.



Matraz

El matraz es un recipiente de vidrio donde se mezclan soluciones, existen diferentes tipos según su uso. Esférica, la base plana y un cuello recto y estrecho con una marca (aforo) para indicar su capacidad. Se emplea para medir con exactitud un volumen determinado de líquido.

Para usar el matraz de aforo, es necesario realizar las siguientes acciones: medir o pesar la cantidad de sustancia que se necesita y pasarla al matraz. Una vez que la sustancia se encuentra dentro del matraz, es necesario agregarle líquido en cantidad necesaria para poder diluir la sustancia.



Frascos Goteros

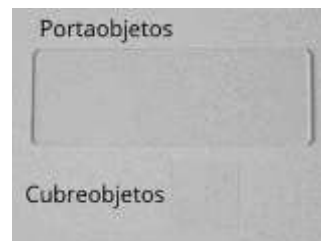
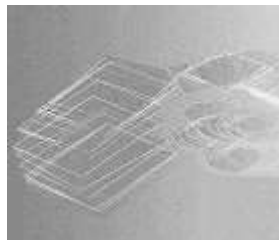
Frasco Gotero es un frasco pequeño que se utiliza para trasvasar o dosificar pequeñas cantidades de líquido vertiéndolo gota a gota.



Láminas portaobjeto y Láminas cubreobjeto (laminillas)

Los portaobjetos están compuestos por una lámina de vidrio de color transparente y con forma rectangular (generalmente 75 mm x 25 mm y 1 mm de grosor) que se utilizan para el almacenamiento y observación de muestras con el microscopio.

El cubreobjetos es también una lámina de vidrio, pero más pequeña y delgada que se coloca encima de la muestra para evitar su daño y permitir una mejor visualización.



Gradillas

Una gradilla es una herramienta que puede estar hecha de metal, madera o plástico. Contiene diversos espacios huecos que están destinados a sostener y almacenar tubos de ensayo



Varilla de coloración

Es un soporte de metal o fierro, se utiliza para realizar coloraciones bacterianas.



EQUIPOS

Microscópio

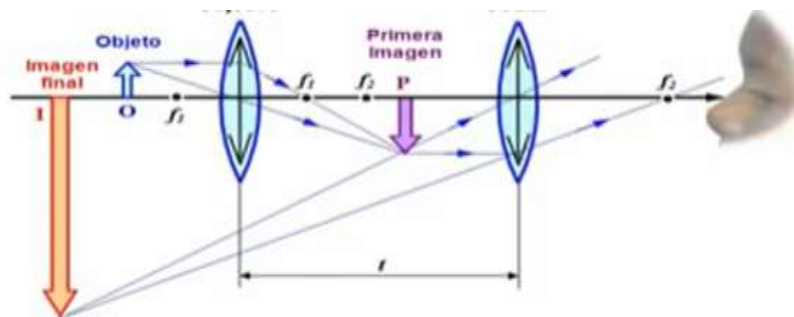
La ciencia que investiga los objetos pequeños utilizando el microscópio se llama microscopía.

El microscopio es una herramienta que permite observar objetos, que son demasiado pequeños para ser observados a simple vista.

El tipo más común y el primero que fue inventado es el microscopio óptico. Se trata de un instrumento que contiene dos lentes que permiten obtener una imagen aumentada del objeto y que funciona por refracción.

Hay muchos tipos de microscopios, el microscopio más común es el microscopio óptico, que utiliza lentes para refractar la luz visible que pasa a través de una muestra finamente seccionada, para producir una imagen observable.

Otros microscopios importantes son el microscopio de fluorescencia y el microscopio electrónico (tanto el microscopio electrónico de transmisión como el de barrido).





Estufa – Incubadora

Las estufas sólo calientan, pudiendo llegar hasta los 300°C; las incubadoras normalmente calientan desde temperatura ambiente hasta 80°C, niveles de temperatura que se conocen como biológicas, haciendo que éstas sirvan para hacer ensayos dentro de los campos de la microbiología.

Una incubadora es un dispositivo que sirve para mantener y hacer crecer cultivos microbiológicos o cultivos celulares. La incubadora mantiene la temperatura, la humedad y otras condiciones en grado óptimo, tales como el contenido de dióxido de carbono (CO₂) y de oxígeno en su atmósfera interior.

Los cultivos microbianos se incuban en condiciones controladas para promover su crecimiento y desarrollo, lo que permite a los investigadores y a los profesionales de la industria estudiar y manipular las células microbianas con fines de investigación, diagnóstico y producción.

Para el modo de uso o de empleo de una estufa de secado será necesario poner los recipientes en el interior de la estufa. En ella se genera calor seco a una temperatura en promedio de 180°C durante unas dos horas, lo que permite realizar la esterilización de todo el material dispuesto en la cavidad de secado.



Contador de Colonias

Un contador de colonias es un instrumento utilizado en los laboratorios de microbiología. Este aparato sirve para contar colonias de bacterias y microorganismos que por lo general crecen en una placa de agar.

Las placas sembradas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento.

Una colonia es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido; aunque varía de tamaño generalmente es visible a simple vista.



Refrigeradora

En el campo de la microbiología, los profesionales del área utilizan los refrigeradores para generar un entorno adecuado para la conservación de medios de cultivos, así como almacenamiento de microbianos.

Los cultivos microbianos son refrigerados con la finalidad de almacenamiento para su uso posterior, evitar su crecimiento excesivo y reducir la tasa de actividad celular.



Autoclave

Un autoclave es un equipo que sirve para esterilizar material de laboratorio, utiliza vapor de agua a alta presión y temperatura, evitando con las altas presiones que el agua llegue a ebullición a pesar de su alta temperatura.

Los autoclaves son capaces de eliminar todo tipo de microorganismos, como bacterias, virus e incluso esporas, que se sabe que sobreviven a altas temperaturas.



Cámara de Flujo laminar

Una cabina de flujo laminar, cámara de flujo laminar o campana de flujo laminar es un recinto que emplea un ventilador para forzar el paso de aire a través de un filtro Hepa o Uipa y proporcionar aire limpio a la zona de trabajo libre de partículas de hasta 0.1 micras. Este tipo de equipos se fabrican en forma generalmente prismática con una única cara libre (la frontal) que da acceso al interior, donde se localiza la superficie de trabajo, que normalmente permanece limpia y estéril.



Balanza

Las balanzas son instrumentos destinados a determinar la masa de un cuerpo.

Las balanzas se caracterizan por su *exactitud*, por su *precisión* y por su *sensibilidad*.

Antes de iniciar asegurar que la balanza esté calibrada.

La balanza analítica tiene una capacidad máxima comprendida en general entre 120-200 g. La exactitud o la fiabilidad de los resultados de pesada están muy relacionados con su emplazamiento y por esto se ha de colocar en un lugar:

- a) Con muy pocas vibraciones.

b) Sin corrientes de aire.

c) Con una temperatura ambiente y humedad lo más constantes posible.

Antes de empezar se ha de asegurar que la balanza esté bien nivelada (la mayoría de las balanzas tienen una burbuja de aire que permite comprobar su nivel). Es necesario verificar que la balanza señale exactamente el cero; es caso de no ser así, hay que calibrarla nuevamente.

Normas de utilización de una balanza analítica

Antes de empezar se ha de asegurar que la balanza esté bien nivelada (la mayoría de las balanzas tienen una burbuja de aire que permite comprobar su nivel). Es necesario verificar que la balanza señale exactamente el cero; en caso de no ser así, hay que calibrarla nuevamente.



REACTIVOS

- Colorantes Gram: Cristal Violeta, Lugol, Alcohol cetona, Safraniana.
- Azul de metileno (coloración simple).
- Fucsina (coloración simple).
- Verde de Malaquita (tinción de esporas).
- Reactivo de Kovacs (para determinar indol).

*Aceite de Inmersión



III. Explique la importancia del uso de los materiales, equipos y reactivos en el laboratorio de microbiología.

.....

.....

.....

PRÁCTICA COLORACIÓN GRAM

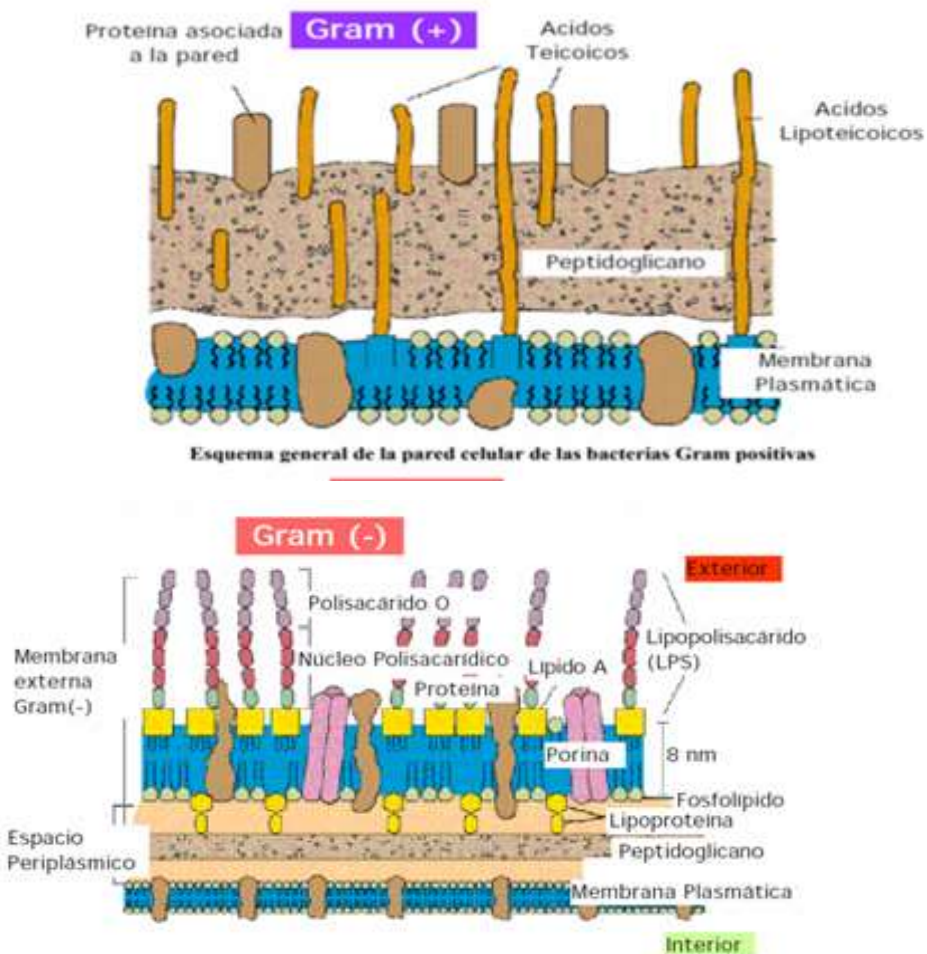
I.- OBJETIVO: Realizar la coloración Gram para observar microorganismos Gram positivos y Gram negativos utilizando colonias microbianas.

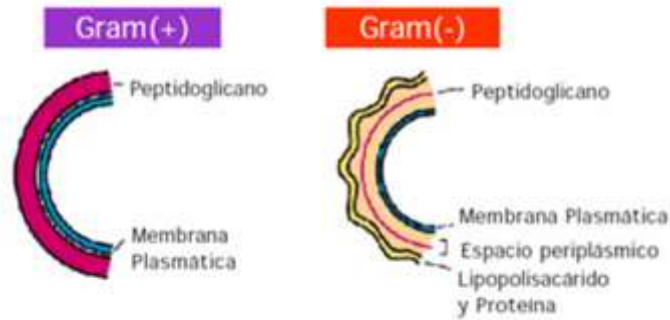
II. FUNDAMENTO TEÓRICO

La coloración Gram es el procedimiento de tinción más ampliamente usado en bacteriología. Permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos taxonómicos: Gram positivas y Gram negativas, según sea su comportamiento frente a la tinción.

La coloración que adquieren los dos grupos de bacterias se debe a la distinta composición química de la pared celular.

Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de mureína o peptidoglicano (de 20 a 80 nm de espesor) en su pared, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano (2 nm) más fina y una capa más externa de lipopolisacáridos, lipoproteínas y lípidos.





Principales componentes de las paredes celulares de bacterias Gram positivas y negativas.

	Gram Positivas	Gram negativas
Péptidos Glucano	+	+
Ácidos teicoicos	+	-
Polisacáridos	+	-
Proteínas	+/-	+
Lipopolisacáridos	-	+
Lipoproteínas	-	+

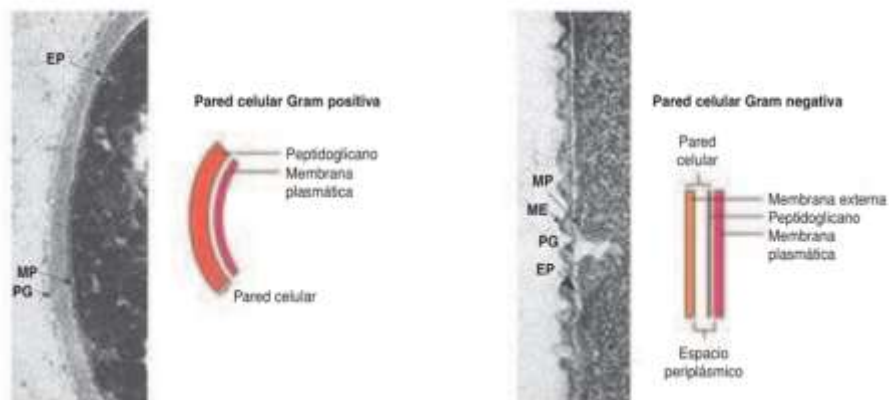
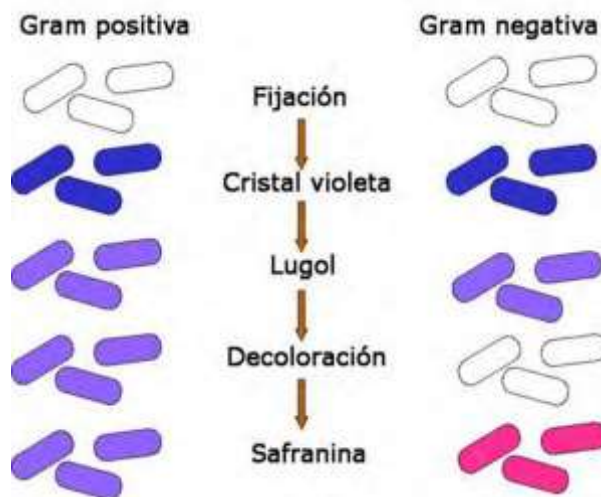


Figura 3.15 Paredes celulares de células Gram positivas y Gram negativas. La microfotografía de la envoltura Gram positiva corresponde a *Bacillus licheniformis* (izquierda), y la de la célula Gram negativa es de *Aquaspirillum serpens* (derecha). PG, capa de peptidoglicano o mureína; ME, membrana externa; MP, membrana plasmática; EP, espacio periplásmico.

La tinción requiere cuatro soluciones un colorante o tinte básico (cristal violeta), un mordiente (Lugol, sustancia que incrementa la afinidad entre la célula y el tinte), un decolorante (alcohol cetona, elimina el tinte de una célula teñida) y un segundo tinte o colorante de contraste (safranina, tinte de color diferente al inicial).

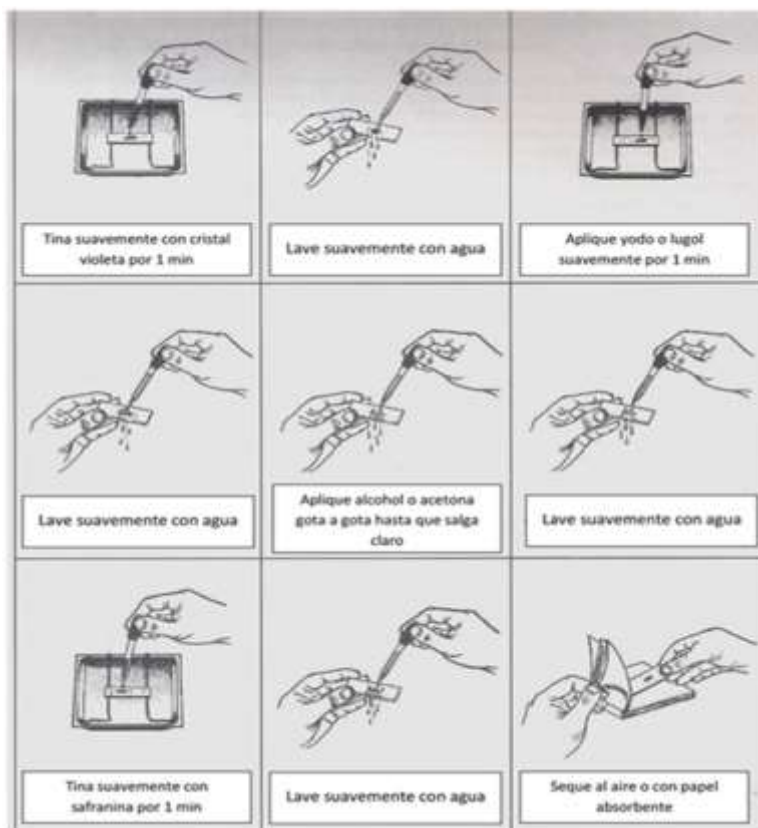
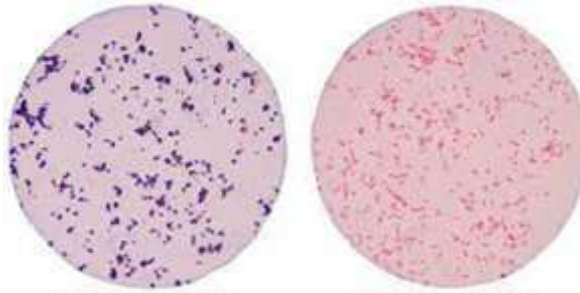


Tras la tinción con el primer colorante (Cristal violeta), se agrega un mordiente (Lugol) para fijar el color, luego se efectúa una decoloración con el alcohol cetona, que arrastrará al colorante sólo en las Gram negativas, mientras que en las Gram positivas el colorante queda retenido y las células permanecerán de color azul o violeta. Las células Gram negativas se teñirán después con el colorante de contraste (safranina) para que puedan observarse.

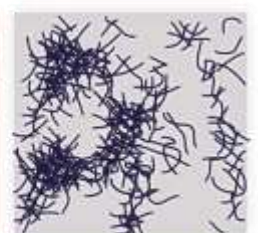


III. PROCEDIMIENTO

1. Con un asa bacteriológica tome una colonia y extiéndala en un porta con el fin de preparar un frotis bacteriano y fije la muestra al calor del mechero.
2. Colocar cristal violeta durante 30 segundos.
3. Retirar el exceso de colorante. Lavar con agua.
4. Añadir lugol, esperar un minuto. Lavar con agua.
5. Decolorar con alcohol cetona por 20 segundos. Lavar con agua.
6. Añadir el colorante de contraste, safranina, esperar 1 minuto. Lavar con agua.
7. Observar al microscopio con objetivo de inmersión (100x). Las bacterias Gram positiva se ven de color azul o violeta y las Gram negativa color rosado o grosella.

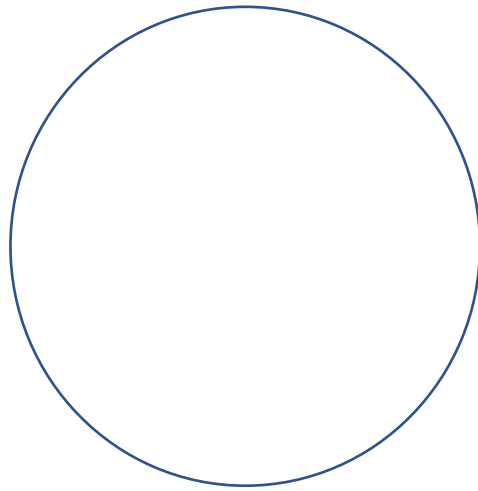


Gram-negativo

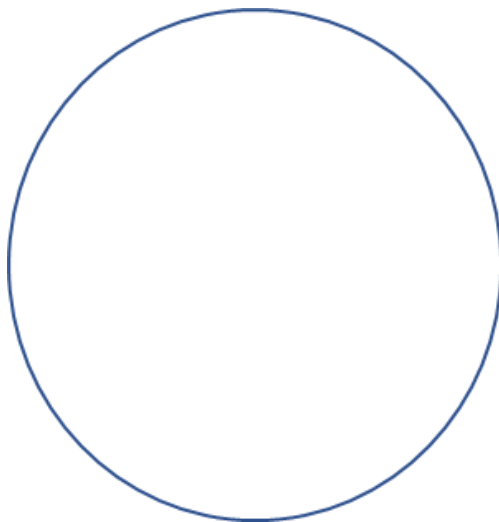


Gram-positivo

IV.-RESULTADOS



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:

VI.- CONCLUSIONES

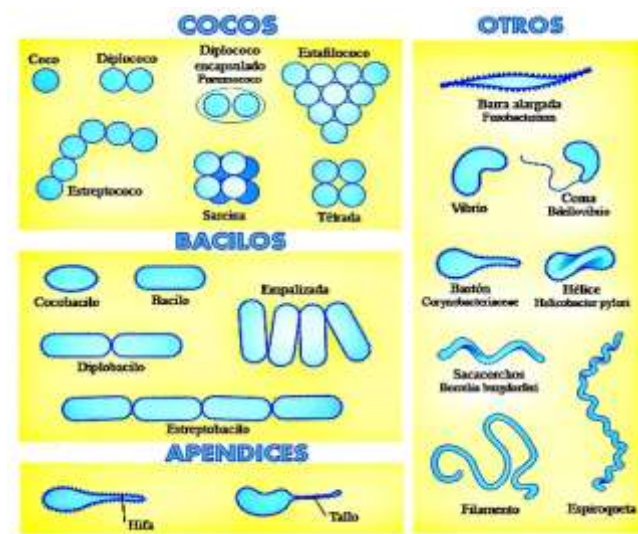
.....
.....
.....
.....

BACTERIAS, LEVADURAS Y HONGOS DE INTERES AGROINDUSTRIAL

BACTERIAS

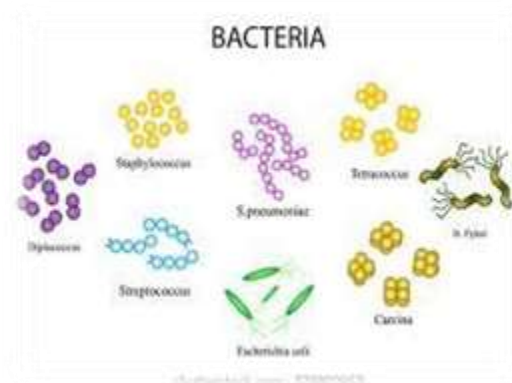
Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrometros (por lo general entre 0,5 y 5 um de longitud)

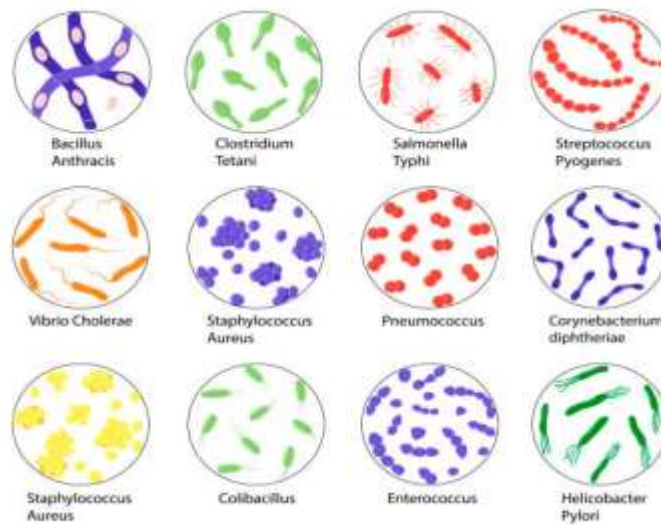
Tienen diversas formas, incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos), filamentos curvados (vibrios) y helicoidales (espirilos y espiroquetas)



Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas. Esta amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular y el citoesqueleto, esto es importante porque puede influir en la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes, unirse a superficies o moverse en presencia de estímulos.

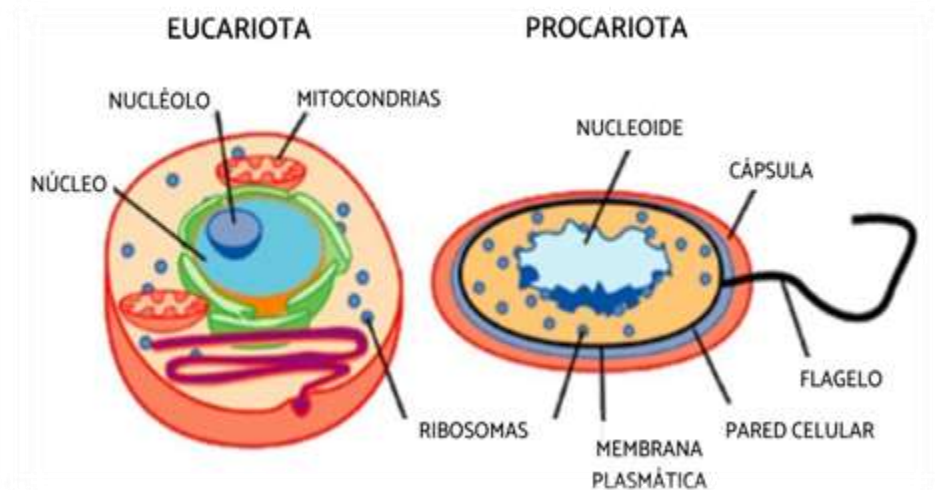
- *Nisseria* en forma diploide (por pares).
- *Streptococcus* en forma de cadenas.
- *Staphylococcus* en forma de racimos.
- *Actinobacteria* en forma de filamentos.



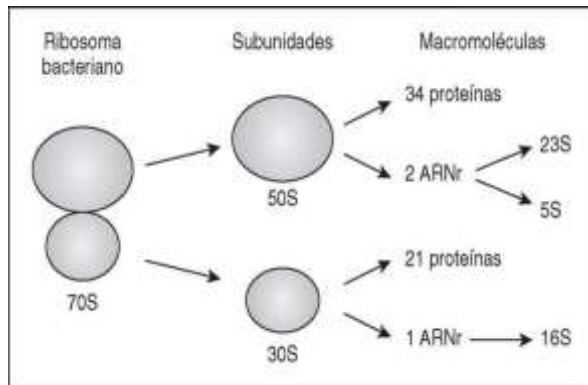
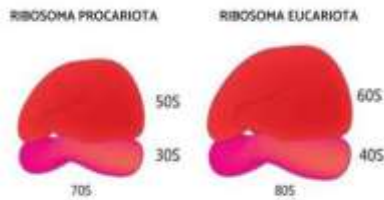
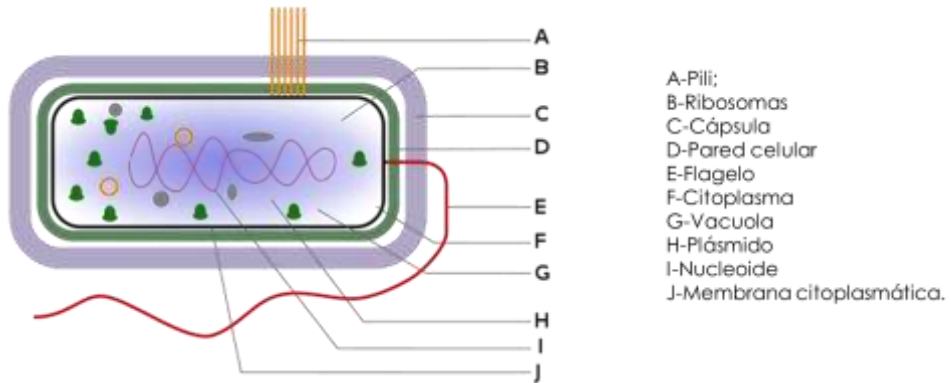


Las bacterias son células procariotas, por lo que, a diferencia de las células eucariotas (animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan en general orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y esta se compone de péptidoglicano (también llamado mureína).

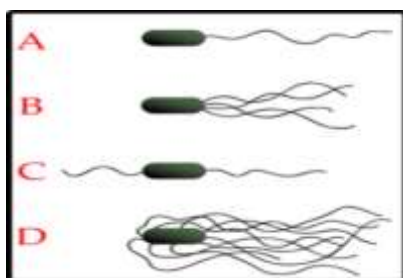
Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de locomoción para desplazarse.



Partes de una bacteria



Disposición de Flagelos Bacterianos



- A-Monotrico
- B-Lofotrico
- C-Anfitrico
- D-Peritrico

Factores de crecimiento bacteriano:

Temperatura. Humedad. Acidez (PH). Nutrientes.

Las bacterias necesitan un mínimo de nutrientes: agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales.



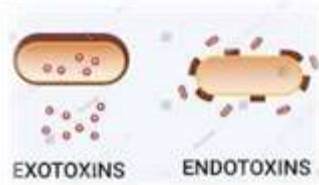
Toxinas Bacterianas

Las toxinas bacterianas son sustancias tóxicas formadas por bacterias, son lipopolisacridos o proteínas con elevado peso molecular y antigenicidad. Pueden dividirse en función a sus propiedades químicas y según su origen en: Exotoxinas y Endotoxinas.

Endotoxinas: Son lipopolisacridos de las membranas bacterianas Gram negativas. Todas son resistentes al calor como las Chutoxinas, Renatoxinas, Gastrotoxinas.

Exotoxinas: Son proteínas solubles generadas por patógenos y presentes en las bacterias gram positiva y gram negativa, presenta enzimas citolíticas. Se conocen tres tipos:

- ▶ Enterotoxinas: Que colonizan el tracto gastrointestinal.
- ▶ Citotoxinas: Se trata de toxinas de localización generalizada por todo el organismo.
- ▶ Neurotoxinas: Toxinas colonizadoras del Sistema nervioso central.



Comparación exotoxinas-endotoxinas		
Propiedad	Exotoxinas	Endotoxinas
✓ Composición	Proteínas	LPS
✓ Productores	Gram (+/-)	Gram (-)
✓ Conversión en toxoide	Si	No
✓ Inmunogenicidad	Alta	Baja
✓ Grado toxicidad	Alta	Baja
✓ Pirogenicidad	No	Si
✓ Termosensibilidad	Lábiles	Estables
✓ Modo acción/Actividad	Específica/Si	General/No
✓ Síntomas hospedador	Diversos	Idénticos

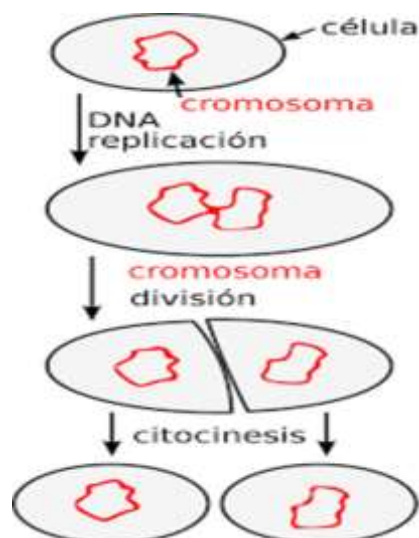
REPRODUCCIÓN DE LAS BACTERIAS

La reproducción asexual involucra un tipo de reproducción donde la constitución genética de los dos organismos que se producen es idéntica a la del progenitor.

Existen varios mecanismos sexuales o para sexuales por los que una bacteria puede adquirir nuevos genes. No son propiamente dichos mecanismo de reproducción, sin embargo, permiten a las bacterias adquirir material genético de otros individuos.

Reproducción Asexual: Fisión Binaria

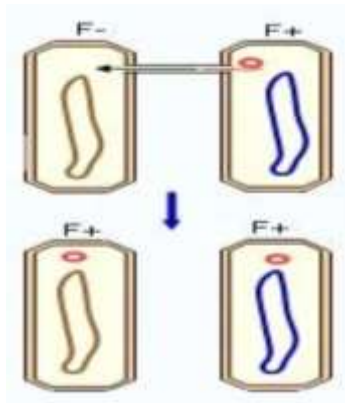
La bipartición. Es un tipo de reproducción asexual en el que la célula bacteriana se divide dando origen a dos células genéticamente idénticas entre sí pero de menor tamaño que la inicial. Este tipo es la más común en las bacterias



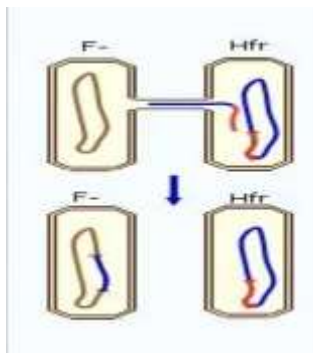
REPRODUCCIÓN PARASEXUAL

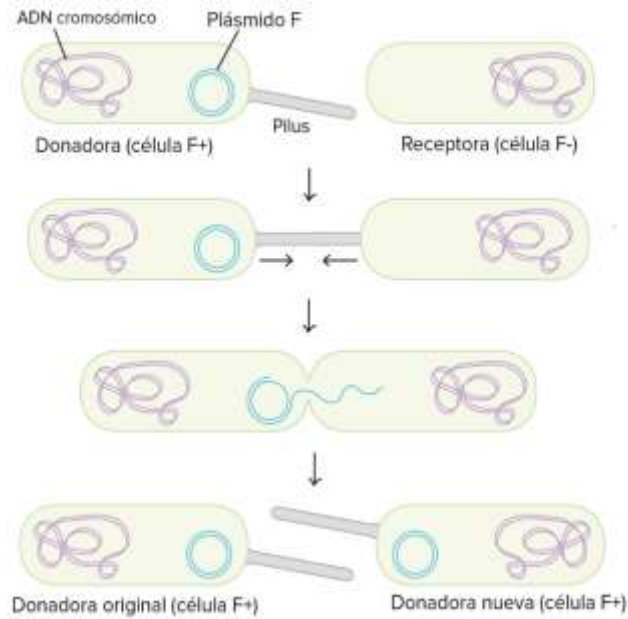
CONJUGACIÓN: Es la transferencia de **plásmidos** (pequeños fragmentos de ADN), desde una célula donadora a otra receptora. La conjugación está promovida por determinados tipos de plásmidos y requiere contacto directo entre ambas bacterias a través del *pili sexual*. Una **bacteria donadora** transfiere ADN de sus plásmidos a través del pili a una **bacteria receptora**. Pueden ocurrir 2 casos distintos:

- 1) El plásmido puede transmitirse y ser totalmente independiente del cromosoma.

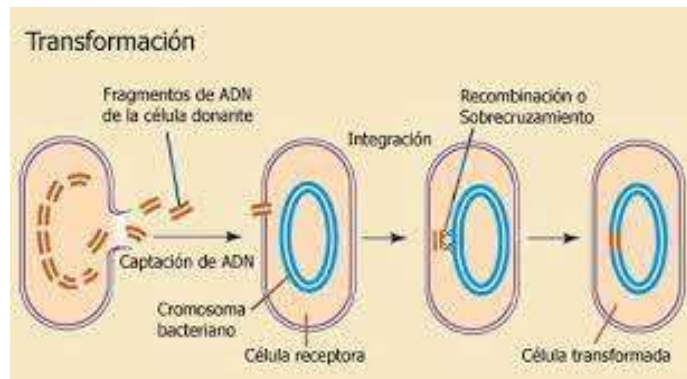


- 2) El plásmido puede integrarse al cromosoma bacteriano y recibe el nombre de **EPISOMA**. En una conjugación posterior esta bacteria puede arrastrar junto con el plásmido, parte de los genes del cromosoma bacteriano. Se calcula que *Escherichia coli* ha adquirido casi un 20% de su genoma con este mecanismo.

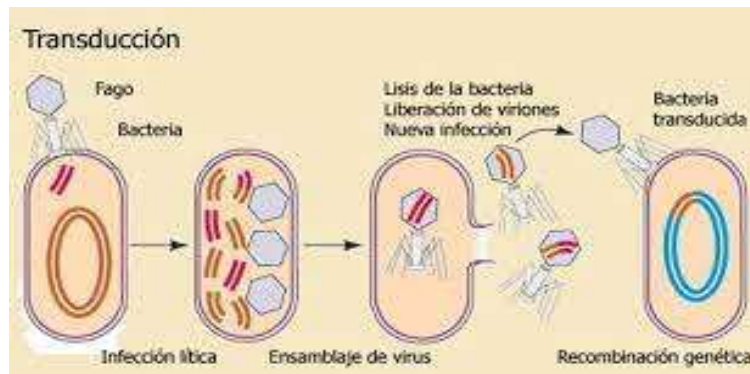




TRANSFORMACIÓN: Las bacterias pueden adquirir del medio, fragmentos de ADN procedentes de la lisis de otras bacterias o de otras células, integrándolos en sus cromosoma. Aquí no participa el pili sexual.



TRANSDUCCIÓN: En este mecanismo de transmisión de material genético, las bacterias intercambian fragmentos de ADN mediante un virus transmisor (bacteriófago). El ADN del virus, tras la infección, se integra con el ADN de la bacteria y permanece inactivo (CICLO LISOGÉNICO). Cuando se separa de él para empezar un CICLO LÍTICO, arrastra genes bacterianos que transmitirá a una nueva bacteria cuando la infecte (recombinación genética).



CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO

- La curva del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.
- Esta curva se divide en cuatro fases denominadas fase de latencia (Lag), fase exponencial o fase logarítmica (Log), fase estacionaria y fase de muerte.



RESPIRACIÓN DE LAS BACTERIAS

Las bacterias también se clasifican en dos grupos, según si necesitan oxígeno para vivir y crecer o no les es necesario.

Las que necesitan oxígeno se denominan aerobias y las que no necesitan oxígeno y tienen problemas para vivir o crecer cuando hay oxígeno se denominan anaerobias.

BACTERIAS ANAEROBIAS: CLASIFICACIÓN

<p>Bacilos Gram Positivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Esporulados <li style="padding-left: 20px;"><i>Clostridium</i> • No esporulados <li style="padding-left: 20px;"><i>Propionibacterium</i> <li style="padding-left: 20px;"><i>Lactobacillus</i> <li style="padding-left: 20px;"><i>Actinomyces</i> <p>Cocos Gram Positivos:</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Peptostreptococcus</i></p>	<p>Bacilos Gram Negativos:</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Bacteroides</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Prevotella</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Porphyromonas</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Fusobacterium</i></p> <p>Cocos Gram Negativos:</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Veillonella</i></p>
--	--

Ejemplos de bacterias aerobias

- Bacilos
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Nocardia*
- *Lactobacillus*
- *Pseudomonas*
- *Staphylococcus* (facultativo)
- Especies de *Enterobacteriaceae* (facultativas)

NUTRICIÓN DE LAS BACTERIAS

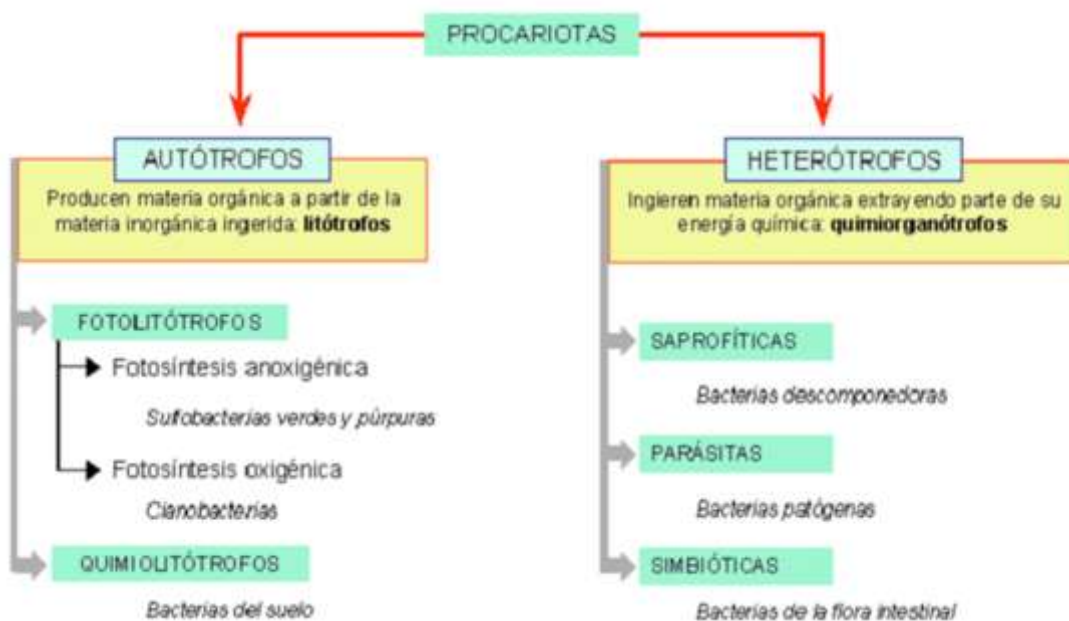
Las bacterias pueden obtener energía y nutrientes realizando fotosíntesis, descomponiendo organismos muertos y desechos, o descomponiendo compuestos químicos, estableciendo relaciones cercanas con otros organismos, incluyendo relaciones mutualistas y parasitarias.

Las bacterias, conforme a sus fuentes de obtención de energía, pueden ser de dos tipos: Autótrofas y Heterótrofas.

Las bacterias Autótrofas son aquellas que generan su propia energía, empleando el dióxido de carbono (CO₂) ya sea a través de procesos de fotosíntesis (fotótrofas) o de aprovechamiento del nitrógeno o del azufre (quimiótrofas).

Las bacterias Heterótrofas, obtienen el dióxido de carbono (CO₂) de sustancias orgánicas como carbohidratos y proteínas. La mayoría de las bacterias son heterótrofas. Pueden ser consumidores, o descomponedores que se alimentan de animales en descomposición.

Tipo de nutrición	Fuente de energía	Fuente de materia	Ejemplo
Fotoautótrofa	Luz	Materia inorgánica	<i>Chlorobium</i>
Fotoheterótrofa	Luz	Materia orgánica	<i>Rhodospirillum</i>
Quimioautótrofa	Compuestos inorgánicos	Materia inorgánica	<i>Nitrobacter</i>
Quimioheterótrofa	Compuestos orgánicos	Materia orgánica	<i>Mycobacterium</i>



PRÁCTICA

COLORACIONES BACTERIANAS

I.- OBJETIVO: Realizar coloraciones bacterianas a partir de muestras de alimentos alterados en olor y color para diferenciar tipos y agrupaciones bacterianas.

II.-FUNDAMENTO TEÓRICO

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

III.- PROCEDIMIENTO

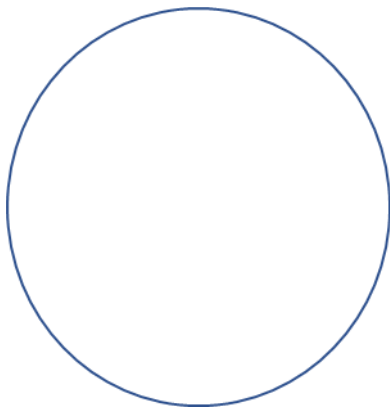
COLORACIÓN SIMPLE

- 1) En una lámina portaobjeto fijar y extender la muestra al calor del mechero.
- 2) Colocar la lámina fijada en la varilla de coloración.
- 3) Luego cubrir la muestra con el colorante (azul de metileno).
- 4) Dejar reposar por 1 a 3 minutos.
- 5) Lavar. Secar.
- 6) Observar al microscópio con objetivo de 100X.
- 7) Dibujar las observaciones microscópicas.

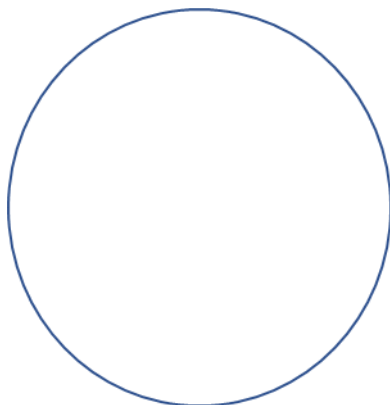
COLORACIÓN GRAM

- 1) En una lámina portaobjeto fijar y extender la muestra al calor del mechero.
- 2) Colocar la lámina fijada en la varilla de coloración.
- 3) Luego cubrir la muestra con el colorante cristal violeta (primer colorante). Dejar reposar de 1 a 3 minutos. Lavar.
- 4) Agregar el lugol (mordiente). Dejar reposar de 1 a 3 minutos. Lavar.
- 5) Agregar el alcohol cetona (decolorante). Dejar reposar de 1 minutos. Lavar.
- 6) Cubrir la muestra con el colorante safranina (segundo colorante). Dejar reposar de 1 a 3 minutos. Lavar. Secar a temperature ambiente.
- 7) Observar al microscópio con objetivo de 100X.
- 8) Dibujar las observaciones microscópicas.

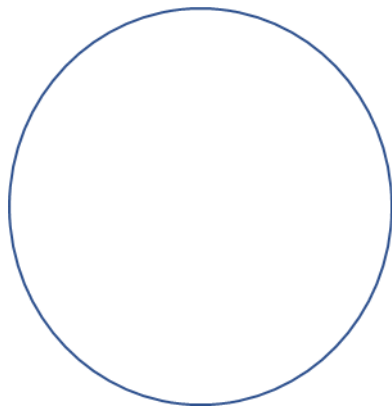
III. RESULTADOS



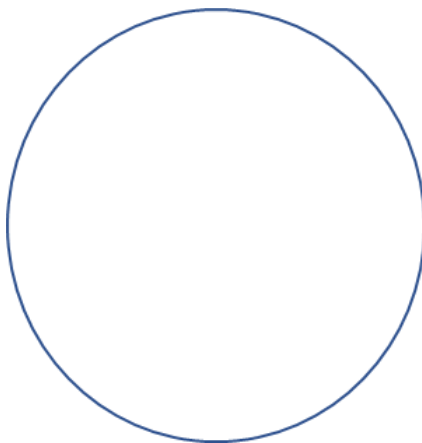
Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:

IV. CONCLUSIONES

.....
.....
.....
.....

V.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.....
.....
.....
.....

HONGOS: Crecimiento, metabolismo y reproducción

La micología ciencia que se dedica al estudio de los hongos. Es una de las ramas de la ciencia más extensas diversificadas con avances significativos en la investigación y desarrollo tecnológico.

El término hongo procede del latín fungus, que significa hongo. Estos seres han sido considerados tradicionalmente más próximos a las plantas que a otros seres vivos debido a su similitud en la composición química y a su estructura ultramicroscópica, aunque en la actualidad son grupos que se estudian por separado.

Los hongos están ampliamente distribuidos en la naturaleza abundando en el suelo, vegetación, en la materia existente en el agua y en general en cualquier ambiente húmedo.

En su mayoría muy beneficiosos para el hombre ya que se encargan de destruir la materia orgánica compleja degradándola a formas químicas simples que pasan a formar parte del suelo, donde finalmente son absorbidas por otras generaciones de plantas, encargándose en gran medida de la fertilidad de la tierra.

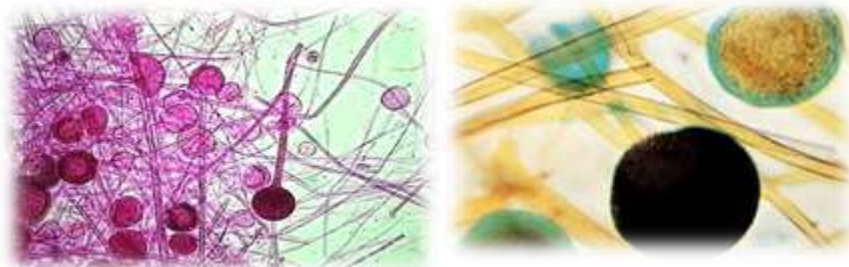
Los hongos son seres vivos cuya estructura celular es de tipo eucariota, lo que les va a diferenciar de todas las bacterias que son procariontas.

Los hongos son heterótrofos, es decir necesitan materia orgánica como nutriente. Se pueden comportar como saprófitos; en estos casos su alimento es materia orgánica generalmente muerta, procedente de animales y plantas. Existen otras especies que se pueden comportar como parásitas; en estos casos su alimento procede de huéspedes vivos a los que parasita.

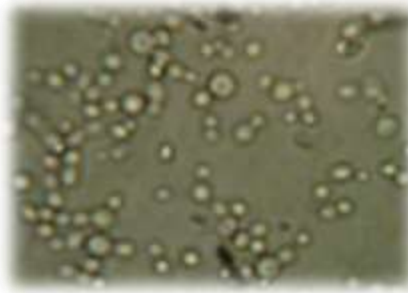
En general los hongos se encuentran en la naturaleza formando hifas, que son la forma vegetativa del moho. En estos casos, el hongo es pluricelular. También puede encontrarse en forma de levadura, en estos casos, es una única célula esférica. Se reproducen de manera natural por medio de esporas aunque existen excepciones.

Estas esporas se originan de forma sexual o asexual según especies. No tienen clorofila y poseen pared celular que contiene quitina y en ocasiones celulosa. Muchos hongos presentan dimorfismo como característica, es decir, pueden existir en la naturaleza en forma de levadura (unicelular) o en forma de moho (pluricelular).

Mohos

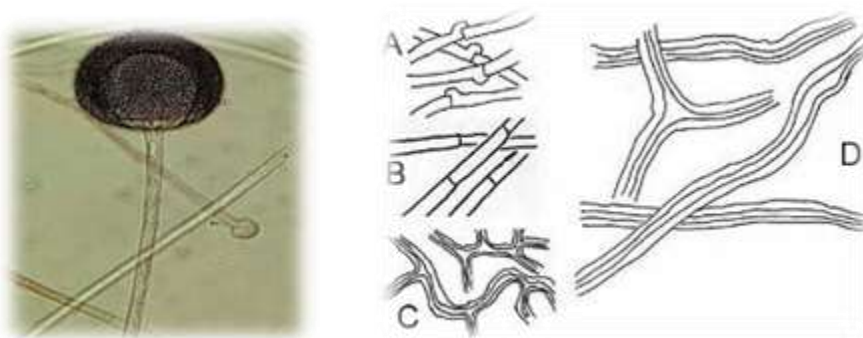


Levaduras



Crecimiento

Los hongos pueden crecer en la naturaleza pluricelularmente (micelio) y/o unicelularmente (levadura). Cuando crece pluricelularmente se pueden llamar mohos u hongos pluricelulares. Aquí se forman estructuras tubulares, las hifas, que crecen formando un conjunto de ramificaciones entrelazadas llamadas micelios. Dichas hifas crecerán por elongación de sus extremos y con producción de ramas laterales (crecimiento apical).



A: hifas generativas con fíbulas. B: hifas generativas sin fíbulas y septos. C: hifas esqueléticas. D: hifas conectivas.



Este micelio puede a su vez ser aéreo, si el crecimiento del hongo es hacia la superficie y si contiene esporas o células reproductores se denominará micelio reproductor. Si el crecimiento del micelio se realiza hacia el interior de un medio en busca de nutrientes, se denominará micelio vegetativo.

En general los micelios, sean del tipo que sean, suelen crecer en lugares líquidos o sólidos húmedos.

Las colonias que forman en su crecimiento son irregulares, algodonosas, filamentosas y secas y en ciertas ocasiones, pueden estar necrosadas por falta de nutrientes y/u oxígeno.

Las hifas que forman un micelio pueden estar divididas por paredes transversales llamadas septos; de ahí el concepto de pluricelular, aunque en algunas ocasiones tal tabicación no existe.

Si el crecimiento es unicelular nos encontramos con las levaduras, que corresponden a células eucariotas esféricas u ovals con un diámetro de 3 a 5 micras aproximadamente; su reproducción es por gemación y crecen en cualquier caso de forma más lenta que la mayor parte de las bacterias, aunque existan excepciones.

Poseen una pared celular rígida que recubre la parte externa de la membrana citoplasmática y la estructura fundamental de ésta es igual en todos los hongos. Está formada por polímeros de hexosas y hexosaminas y en muchos casos presenta quitina. (N-acetil-glucosamina).

Metabolismo

Los hongos son heterótrofos, constituyendo el suelo su hábitat natural. En su mayoría son aerobios, donde el oxígeno actúa como aceptor final de hidrogeniones. También existen en la naturaleza algunas especies facultativas y otras obtienen su energía de procesos fermentativos o crecen en medios mínimos donde utilizan el nitrógeno en forma de nitratos, nitritos, etc. Otras especies pueden utilizar cualquier fuente de carbono, que es siempre un factor limitante para su desarrollo.

La fuente de carbono más utilizada en su metabolismo suele ser la glucosa u otros componentes más complejos como el almidón o la celulosa. También pueden necesitar en pequeñas cantidades hierro, zinc, cobre, magnesio, fósforo, potasio, etc.

Su metabolismo suele desarrollarse a temperaturas que pueden oscilar entre los 0°C y los 60°C aunque la temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre 22-30°C. Suele crecer mejor concentraciones de acidez relativamente elevadas, aunque pueden encontrarse excepcionalmente en algunos medios alcalinos. El pH óptimo para casi todas las especies se suele situar en torno a pH 5,5.

Necesitan humedad para su desarrollo y pueden obtener agua de la atmósfera y del medio, aunque muchos mohos pueden sobrevivir en ambientes muy deshidratados debido a la presencia de esporas.

Reproducción

Los hongos pueden reproducirse por medio de ciclos sexuales o asexuales.

La estructura responsable de cada uno de estos ciclos es la espora y según las características de su formación hablamos de reproducción sexual o asexual.

Reproducción Asexual

Consiste en el crecimiento vegetativo de un micelio, produciéndose división nuclear sin verdadera división celular, no hay formación de gametos y no hay fusión nuclear.

Se conocen tres tipos:

1. Esporulación por germinación de esporas.
2. Gemación.
3. Fragmentación

1.-ESPORULACIÓN POR GERMINACIÓN DE ESPORAS:

La estructura del hongo que produce las esporas asexuales se denomina conidióforo. Estos conidióforos no son más que hifas especializadas situadas en las zonas apicales de éstas y con gran diversificación en cuanto a forma, color, tamaño, tipo de septación, etc. Tales estructuras especializadas tienen especial importancia para la determinación taxonómica de cada hongo. Las esporas que allí se forman se denominan genéricamente conidios o conidiosporas.

Ejm: *Género Aspergillus*, *Género Rhizopus*, *Género penicillum*



Género Aspergillus



Género penicillum

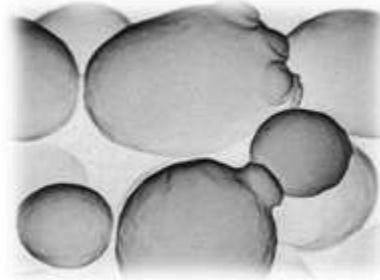


Género Rhizopus

2.-GEMACIÓN:

El principal mecanismo de reproducción asexual en levaduras es la gemación y consiste en la formación de una gema o yema en cualquier lugar de la célula madre, creciendo hacia afuera y aumentando de tamaño a partir de la célula madre.

El núcleo de la célula madre se divide y uno de los núcleos resultantes pasará a la célula o yema hija, después de esta, ambas terminan separándose.



3.-FRAGMENTACIÓN DE HIFAS:

Consiste en fragmentar parte de una colonia e implantar este fragmento en otro nuevo medio. Se ha observado que este método de reproducción origina un nuevo micelio.

Este mecanismo es el utilizado para el cultivo de hongos de laboratorio.

Reproducción Sexual

Consiste en la reproducción de esporas previa fusión de dos núcleos haploides sexualmente compatibles. Este proceso se efectúa de la siguiente forma:

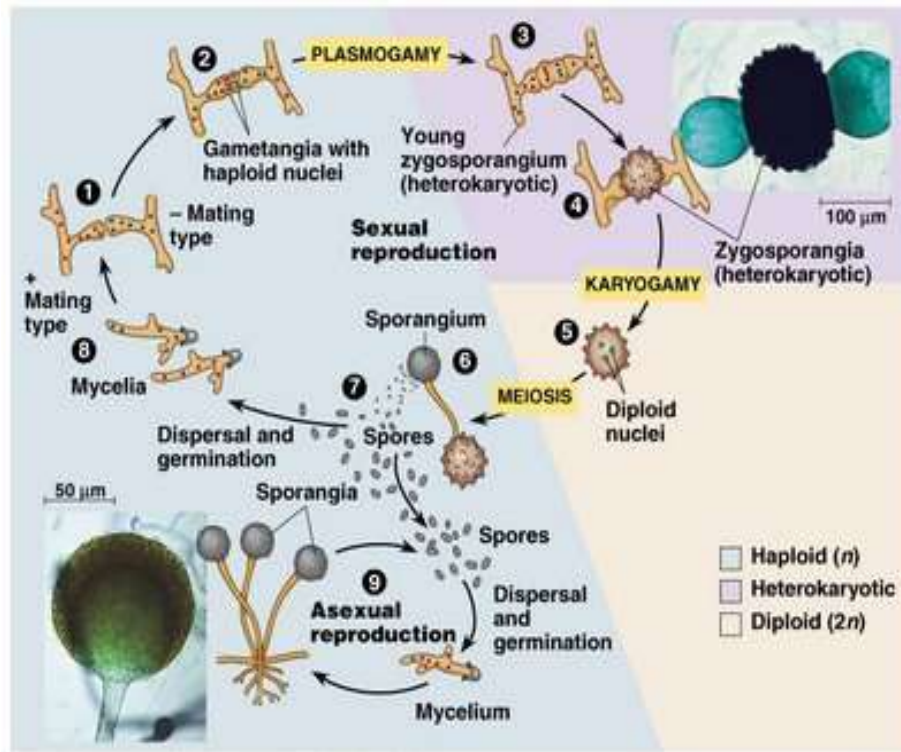
Un núcleo haploide de un célula donante (el macho) penetra en el citoplasma de la célula receptora (la hembra). Esta fase se denomina fase de plasmogamia.

Ambos núcleos cuando se encuentran y fusionan, forman un nuevo núcleo cigoto diploide (fase de cariogamia). Este cigoto, por meiosis origina cuatro núcleos haploides (fase de reproducción cromatínica).

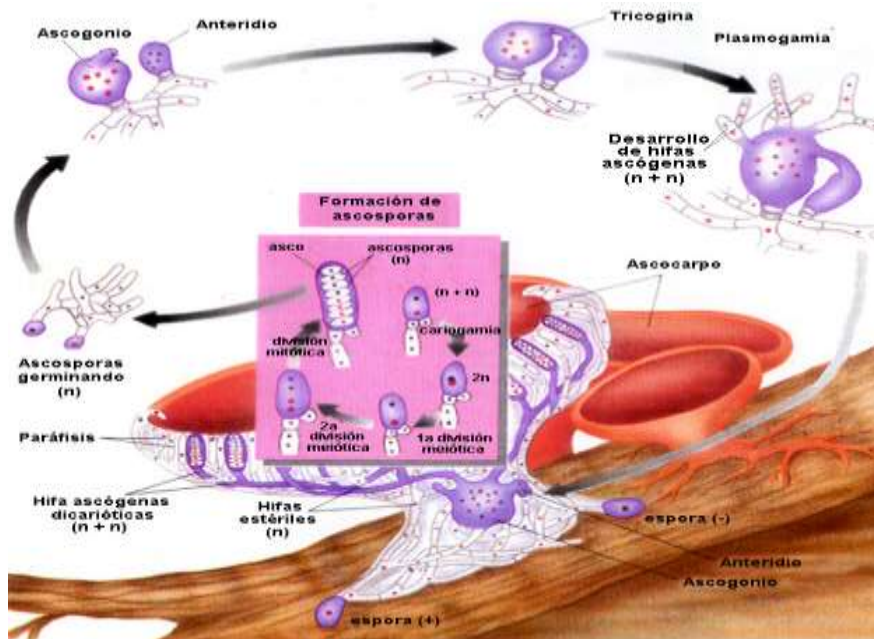
Las esporas sexuales se reproducen con menor frecuencia y en menor cantidad que las asexuales y existen distintos tipos:

- a) Zigosporas: Son esporas sexuales con cuerpo grande, pared gruesa, formadas por la fusión de los anteridios de dos hifas que se juntan.
- b) Ascosporas: Son esporas sexuales originadas por fusión de dos hifas y posterior fecundación, originándose este proceso en un saco conocido como asca. Cada asca suele contener un total de 8 esporas.

Formación de Zigosporas



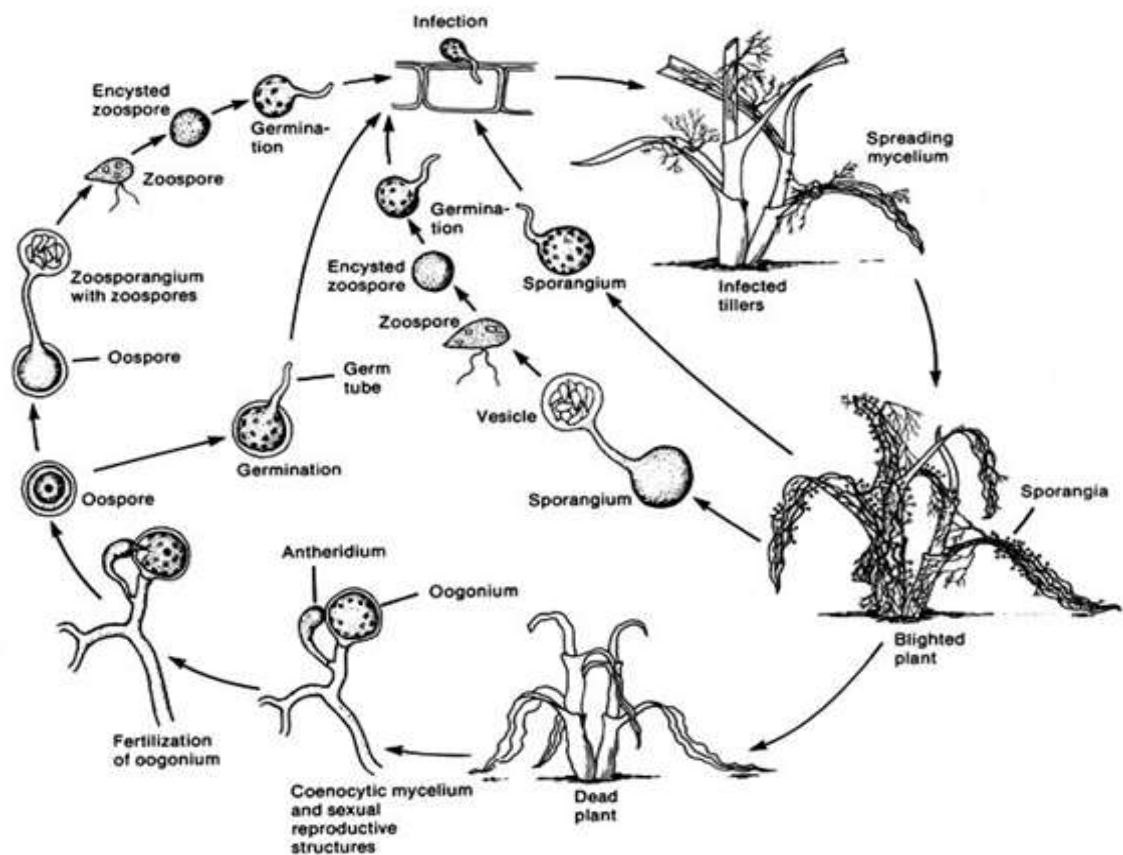
Formación de Ascosporas



c) Oosporas: Son esporas sexuales producidas por la fusión de 2 gametos distintos que se encuentran dentro de una estructura específica denominada Oogonio.

d) Basidiosporas: Son esporas sexuales que se forman generalmente de 4 en 4 en la pared terminal de una estructura en forma de clavo llamado basidio. Surge por la unión de 2 núcleos de una hifa. A este tipo corresponde la formación de setas.

Formación de Oosporas



(Courtesy R.W. Smiley, P.H. Dernoeden, and B.B. Clarke), Compendium of Turfgrass diseases, 2nd edition, Page 47.)

- d) Clase Hypochytridiomycetes: Son hongos acuáticos que se desplazan por medio de un flagelo. Son parásitos de ciertas algas y también existen especies saprófitas. Desde el punto de vista clínico, no presentan gran interés.
- e) Clase Trichomycetes: Son parásitos o comensales de artrópodos.
- f) Clase Basidiomycetes: Hay especies parásitas de ciertos cereales, árboles frutales, arbustos, etc. A esta clase pertenecen también los hongos macroscópicos como las setas. No presentan interés para el hombre.
- g) Clase Zygomycetes: Aquí se encuentran especies de hongos *Mucor*, *Rhizopus*, etc. Responsables de efectos patógenos para el hombre.
- h) Clase Ascomycetes: Este tipo de hongos especialmente las levaduras, son importantes para el hombre, pues son utilizadas en la industria alimentaria. Aquí se encuentran géneros tan importantes como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Candida*, *Mycrosporium*, *Trichophyton*, etc. Presentan gran interés clínico para el hombre por sus posibles efectos patógenos.
- i) Clase Deuteromycetes: Esta clase incluye también especies importantes en la industria y la medicina. También muchas de estas especies son responsables de micosis cutáneas superficiales o infecciones fúngicas generalizadas.

PRÁCTICA

PREPARADOS MICROSCÓPICOS PARA LA OBSERVACIÓN DE LEVADURAS Y MOHOS

I.-OBJETIVO: Realizar preparados microscópicos para observar mohos y levaduras a través de los preparados en fresco o examen directo utilizando alimentos cítricos.

II.-FUNDAMENTO TEÓRICO

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

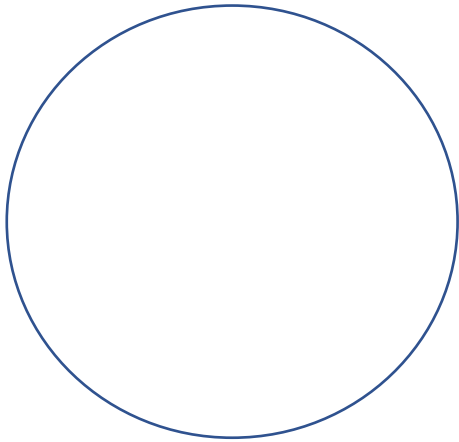
.....

.....

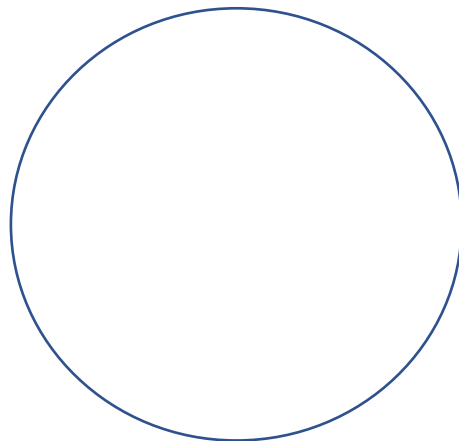
III. PROCEDIMIENTO

Examen Directo:

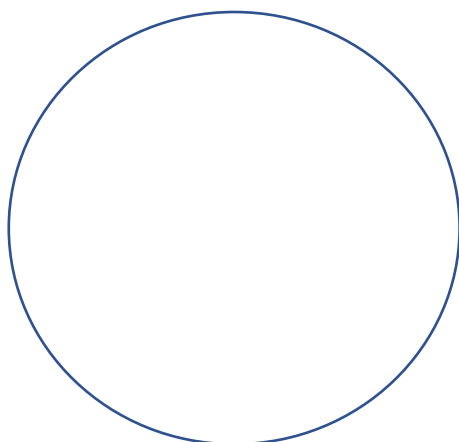
- 1) Colocar una gota de azul de lactofenol en una lámina portaobjeto.
- 2) Con un asa bacteriológica colocar la muestra y cubrir con una laminilla.
- 3) Observar al microscópio con objetivo de menor aumento.
- 4) Dibujar las observaciones microscópicas.



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:



Muestra:
Objetivo:
Aumento:
Observación:

FACTORES INTRÍNSECOS Y EXTRÍNSECOS QUE CONTROLAN EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Existen muchos factores que afectan el desarrollo bacteriano y, por lo tanto, pueden aumentar la probabilidad de ocurrencia de ETA.

Esos factores pueden estar relacionados con las características del alimento (intrínsecos) o con el ambiente en el cual dicho alimento se encuentra (extrínsecos).

Los factores intrínsecos son la actividad de agua (A_w), acidez (pH), potencial de óxido-reducción (Eh), composición química del alimento (nutrientes) y otros.

Los factores extrínsecos más importantes son la humedad del medio y la temperatura.

FACTORES INTRÍNSECOS

1.- ACTIVIDAD DE AGUA (A_w)

Los microorganismos necesitan de “agua disponible” para crecer. Esta agua no está ligada a otras moléculas del alimento ni ligada químicamente a otros componentes, como la sal (NaCl). El término “actividad de agua” (A_w) se refiere a esta agua disponible para el crecimiento microbiano, y su valor varía de 0 a 1,0. La menor A_w en la cual una bacteria patógena puede desarrollarse, es 0,85. Los valores de actividad de agua favorables para el desarrollo bacteriano están entre 0,97 y 0,99. De ese modo, los alimentos con A_w dentro de esa variación favorecen a los agentes de enfermedades bacterianas.

2.- ACIDEZ Y PH (pH)

El pH de los alimentos se mide en una escala de 0 (muy ácido) a 14,0 (muy alcalino o básico), siendo 7,0 el pH neutro. La mayoría de las bacterias se desarrolla mejor en pH neutro o cercano a él, y la mayoría de los alimentos considerados favorables a estos agentes tienen el pH entre 4,6 y 7,0. A partir de ese concepto, se dividieron los alimentos en dos categorías: poco ácidos, o de baja acidez y ácidos. Estas categorías se establecieron con base en el desarrollo del *Clostridium botulinum*.

3.- POTENCIAL DE ÓXIDO-REDUCCIÓN (Eh)

Los procesos de oxidación y reducción se relacionan con el intercambio de electrones entre las sustancias químicas. El potencial de óxido-reducción puede definirse como la capacidad de determinados sustratos de ganar o perder electrones. El elemento que pierde un electrón se denomina oxidado, y el que gana, reducido.

Los microorganismos aeróbicos necesitan de valores de Eh positivos para su crecimiento. En ese grupo, están casi todos los mohos, levaduras oxidativas y muchas bacterias, principalmente las deteriorantes de alimentos (*Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, etc.) y algunas bacterias patógenas aeróbicas (como *Bacillus cereus*).

Del mismo modo, los microorganismos anaeróbicos necesitan valores de Eh menores. En ese grupo están algunas bacterias patógenas (*Clostridium botulinum*) y deteriorantes. Algunas bacterias anaeróbicas facultativas se desarrollan mejor en condiciones un poco reducidas y se denominan microaerófilas, como los lactobacilos y *Streptococcus*.

El desarrollo bacteriano puede darse con o sin aire, éstas son las llamadas aeróbicas facultativas. En ese grupo están las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*.

El *Campylobacter sp* pertenece a la clase de bacterias microaerófilas, o sea, se desarrollan mejor en bajas concentraciones de oxígeno (entre 3 y 5%).

Los mohos y levaduras importantes para la ciencia de los alimentos son aeróbicos, raramente son facultativos.

4.- COMPOSICION QUÍMICA

Los microorganismos difieren en cuanto a la exigencia de factores de crecimiento y capacidad de usar diferentes sustratos de la composición de alimentos.

Fuentes: Carbono, nitrógeno, vitaminas, minerales.

A) Fuente de Carbono

El carbono puede ser un factor limitante para el desarrollo bacteriano. Carbohidratos complejos (polisacáridos), como almidón y celulosa, son usados directamente por un pequeño número de microorganismos. Los mohos son muy importantes en el deterioro de materia prima con ese sustrato.

Grasas y aceites son usados por microorganismos lipolíticos, como varios mohos, levaduras y bacterias (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y otras). Sin embargo, muchos microorganismos no pueden desarrollarse en ese sustrato.

B) Fuente de Nitrógeno

Proviene de aminoácidos, nucleótidos, péptidos y proteínas, además de otros compuestos nitrogenados. Los aminoácidos son la fuente más importante de nitrógeno para los microorganismos.

C) Fuente de Vitamina

Generalmente, los alimentos poseen la cantidad de vitamina necesaria para el desarrollo de los microorganismos. Por ejemplo, frutas pobres en vitaminas del Complejo B no favorecen el desarrollo de algunas bacterias. Las bacterias Gram-positivas son más exigentes que las Gram-negativas y los mohos, que pueden sintetizar algunas de esas vitaminas. Las más importantes son las vitaminas del Complejo B, la biotina y el ácido pantoténico.

D) Sales Minerales

Pese a usarse en pequeñas cantidades, son factores indispensables para el desarrollo de microorganismos, debido a su papel en las reacciones enzimáticas. Los más importantes son sodio, potasio, calcio y magnesio.

5. PRESENCIA DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS NATURALES

La estabilidad de algunos productos de origen animal y vegetal ocurre, en la naturaleza, debido a la presencia de sustancias antimicrobianas. Éstos son algunos ejemplos:

Huevo: Posee la lisozima (muramidasa), que destruye la pared celular de bacterias Gram positivas. En la albúmina del huevo existe la avidina, sustancia que actúa contra algunas bacterias y levaduras.

Clavo: Tiene eugenol (aceite esencial), que actúa contra bacterias (*Bacillus*, *S. aureus*, *Aeromonas*, y *Enterobacteriaceae*).

Mora, Ciruela y frutilla: Poseen el ácido benzoico con acción bactericida y fungicida, siendo más eficaz en valores de pH entre 2,5 y 4,5.

Canela: Tiene aldehído cinámico y eugenol, que actúan contra mohos y bacterias, respectivamente.

Ajo: Tiene alicina, sustancia que combate la *Salmonella*, *Shigella*, *micobacterias*, *I. plantarum*, *S. aureus*, *Leuconosac mesenteroides*, *C. botulinum*, *Candida albicans*, *A. flavus* y *Penicillium*, entre otras.

Leche: En la leche cruda existen muchos grupos de sustancias con actividad antimicrobiana, como el sistema lactoperoxidasa, lactoferrina y otras proteínas que se asocian al hierro, protegiendo la leche contra el deterioro e inhibiendo el desarrollo de bacterias patógenas.

6. MICROBIOTA COMPETITIVA

La competición de la microbiota del alimento puede favorecer o inhibir algunas especies o grupos de microorganismos. Las bacterias lácticas, por ejemplo, pueden producir ácido láctico y bacteriocinas que inhiben o eliminan otros microorganismos presentes en el mismo alimento.

Determinadas bacterias, como *S. aureus* y *C. botulinum*, son competidoras pobres y por eso no se desarrollan bien en alimentos con concentración elevada de otros microorganismos como en los alimentos crudos (carne, pescado, verduras de hoja, legumbres, incluyendo palmitos, hongos, etc.).

FACTORES EXTRÍNSECOS

Temperatura

El factor ambiental que más afecta el desarrollo de los microorganismos es la temperatura, a pesar de que los microorganismos existentes son capaces de proliferar a diferentes intervalos. Desde -8° a +90°C (17,6 a 194°F), la temperatura óptima para casi todos los patógenos es 35°C (95°F). La temperatura puede afectar la duración de la fase latente, la velocidad de crecimiento, las exigencias nutricionales y la composición química y enzimática de las células de los microorganismos.

Humedad Relativa

La humedad relativa influye directamente sobre la actividad de agua del alimento. Si un alimento con baja actividad de agua está almacenado en un ambiente con alta humedad relativa, la actividad de agua de ese alimento aumenta, permitiendo la multiplicación de microorganismos.

La combinación entre humedad relativa y temperatura no puede ser despreciada. Generalmente, cuanto mayor es la temperatura de almacenaje, menor la humedad relativa, y viceversa. Modificando el gas de la atmósfera es posible retardar el deterioro sin disminuir la humedad relativa.

Composición de la Atmósfera

- Influencia de CO₂
- Influencia del O₃ (Ozono)
- Organismos indicadores
- Algunas bacterias patogénicas causantes de ETA

Influencia de CO₂

El almacenaje de alimentos en atmósferas gaseosas (como CO₂), en cantidad previamente establecida, se denomina “atmósfera controlada”. Esta técnica se usa para frutas (como manzana y pera), retardando la putrefacción por hongos filamentosos.

Probablemente, a la inhibición de la producción de etileno por el gas carbónico, pues el etileno actúa en las frutas como un factor de madurez. Además, considerando que los mohos son microorganismos aeróbicos, la merma en la concentración de oxígeno en la atmósfera no favorece su desarrollo. La concentración de CO₂ no debe exceder 10%.

Las atmósferas de gas carbónico se usan para aumentar el tiempo de almacenaje de carnes. Las bacterias Gram-negativas son más sensibles al CO₂ que las Gram-positivas. Atmósferas con CO₂ y O₂ son más eficaces que aquellas que contienen sólo gas carbónico.

Influencia del O₃ (Ozono)

Algunos vegetales, especialmente las frutas, se conservan en atmósferas con O₃, entre 2 y 3 ppm. Ese tipo de atmósfera no es recomendable para alimentos con alto tenor de lípidos, ya que el ozono acelera la oxidación.

El ozono y el gas carbónico:

- Son eficaces para retardar las alteraciones en la superficie de carnes almacenadas.
- Se usan para aumentar el tiempo de almacenaje de carnes. Las bacterias Gram-negativas son más sensibles al CO₂ que las Gram-positivas.

Atmósferas con CO₂ y O₂ son más eficaces que aquellas que contienen sólo gas carbónico.

ORGANISMOS INDICADORES

Los organismos indicadores en un alimento no representan un peligro directo para la salud, sin embargo, son grupos o tipos de microorganismos que, por su origen, procedencia, resistencia térmica, temperatura óptima para desarrollo y otras características, pueden indicar exposición, manipulación y conservación inadecuadas del producto alimenticio. Son útiles también para indicar la presencia de un peligro potencial para la salud, cuando se consideran -por ejemplo- el mismo origen o procedencia. Generalmente, estos organismos o pruebas relacionadas pueden indicar:

1. La posible presencia de patógenos y toxinas.

2. La posibilidad de prácticas inadecuadas de higiene durante la producción, el procesamiento, el almacenaje y/o la distribución.

Los organismos indicadores se usan para indicar una contaminación de origen fecal o falla en la higiene durante el proceso. Las bacterias coliformes y la *Escherichia coli* son dos indicadores bastante usados con ese propósito. Deben ser de detección rápida y fácil; ser fácilmente distinguibles de la microbiota natural de alimentos y del agua; tener el mismo origen y procedencia que el organismo patogénico; tener características de multiplicación y muerte similar al microorganismo patogénico para el mismo tipo de alimento; y estar ausente o en cantidad mínima en el alimento cuando el patógeno esté ausente. Sin embargo, no siempre se encuentran todas esas condiciones.

ALGUNAS BACTERIAS PATÓGENAS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA (ETA)

- *Salmonella spp.*
- *Shigella spp.*
- *Escherichia coli.*
- *Yersinia enterocolítica.*
- *Campylobacter spp.*

MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo es una sustancia que contiene nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura el crecimiento de los microorganismos.

Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido.

El objetivo de utilizar un medio de cultivo es variado por ejemplo para identificación, multiplicación y antibiograma.

Uno de los sistemas más importantes para la identificación 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 y el crecimiento de los microorganismos es el Cultivo.

Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial se debe reunir una serie de condiciones como: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad.

Existen rangos de temperatura dónde la tasa máxima de crecimiento se encuentra entre 20 y 40 °C. A esas bacterias se las conoce como mesófilas.



Un medio de cultivo debe contener los nutrientes mínimos para establecer un medio que contenga los componentes necesarios para el crecimiento y debe estar exento de todo microorganismo contaminante.



Clasificación de los medios de cultivo:

Según sus cualidades físicas

- Líquidos: Las bacterias aeróbicas de los cultivos con mayor profundidad crecen solamente en la superficie; mientras que las de menor profundidad se desarrollan por debajo de las condiciones y cada vez son más anaeróbicas.
- Semisólidos
- Sólidos: Para obtener un medio de cultivo sólido se introduce a los caldos de cultivos sustancias solidificantes, como por ejemplo agar agar, que dan a la disolución una consistencia gelatinosa.

Según su origen

- Naturales: Son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como ser extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.
- Sintéticos: Son los medios que contienen una composición química definida cualitativamente y cuantitativamente. Se utilizan para obtener resultados reproducibles.
- Semisintéticos: Son los sintéticos a los que se les añaden factores de crecimiento bajo una forma de un extracto orgánico complejo, como por ejemplo extracto de levadura.

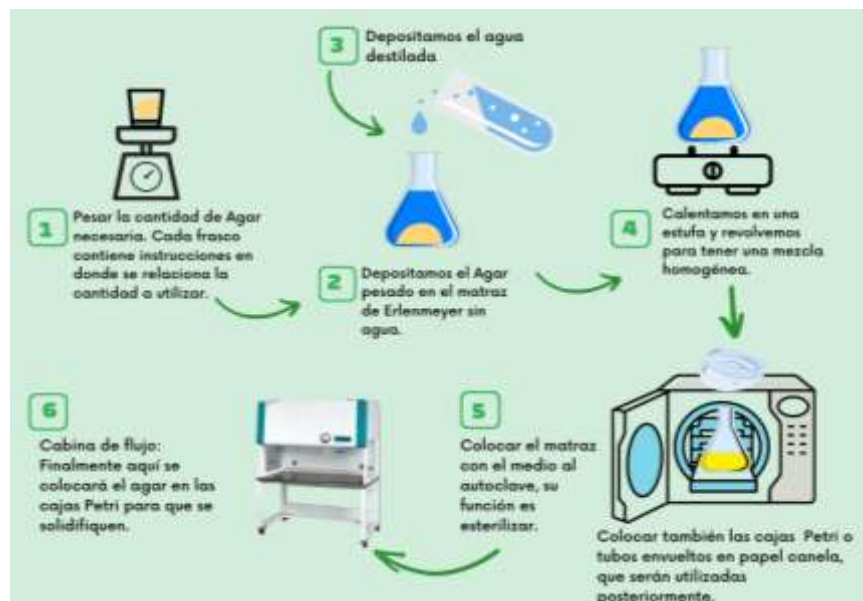
Según su formulación

- Químicamente definidos: Se conoce la cantidad exacta de cada uno de los compuestos que hay en el medio.
- Complejos: Se realizan a partir de extractos naturales (extracto de levadura, sangre, etc.); no se conoce exactamente cuál es la composición del medio; sin embargo, presenta la ventaja de que ya están presentes todos o casi todos los elementos que una célula puede requerir. También para algunos grupos de organismos es común usar: mosto, leche de coco, jugo de zanahoria, etc. A este tipo de cultivo se lo denomina también no definido.

Según su uso

- Medio general: Medio en donde crecen todo tipo de microorganismos, excepto los que necesitan condiciones especiales (por ejemplo, agar nutritivo).
- Medio selectivo: permite seleccionar el crecimiento de una especie o grupo determinado (hongos, bacterias entéricas, protozoos). Ejm: Agar Baird Parker
- Medio diferencial: Permite identificar una especie con otra, ambas en el mismo medio. Puede ser por su crecimiento, su metabolismo, su respiración, etc. (por ejemplo, medio Mac Conkey).
- Medio de enriquecimiento: Contiene los nutrientes necesarios para apoyar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos, se utiliza para la cosecha de diferentes tipos de microorganismos en un mismo medio. (ejm: caldo selenito, caldo tetrionato)
- Medio mínimo: Contiene la mínima cantidad de nutrientes posible que permite el crecimiento de una especie. Ejm: PCA
- Medio de transporte: preparado para servir como almacenamiento temporal a especímenes transportados o en transferencia; mantienen su viabilidad y su concentración simple. Ejm: Cary Blair.

PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO



IV.-RESULTADOS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

V.-CONCLUSIONES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

MICROORGANISMOS INDICADORES Y PATÓGENOS DE IMPORTANCIA EN LA AGROINDUSTRIA

MICROORGANISMOS INDICADORES

Los microorganismos indicadores son organismos utilizados para evaluar la calidad microbiológica de ambientes, alimentos, agua, suelo, entre otros. No necesariamente causan enfermedades, pero su presencia indica una posible contaminación por patógenos o condiciones sanitarias inadecuadas.

Principales tipos de indicadores:

1) Indicadores de contaminación fecal:

Coliformes totales: Grupo que incluye diversas bacterias presentes en los intestinos de humanos y animales, pero también en el suelo y la vegetación.

Coliformes termotolerantes (o fecales): Subconjunto de coliformes que crecen a 44,5°C; Indican contaminación por heces de sangre caliente.

Escherichia coli (E. coli): Bacteria más específica para indicar contaminación fecal reciente.

Enterococos (estreptococos fecales): Otro indicador de origen fecal, más resistente en ambientes salinos (por ejemplo, agua de mar).

2) Indicadores de higiene para alimentos y superficies:

Staphylococcus aureus: Indica mala manipulación de alimentos (presente en piel y mucosas).

Bacterias mesófilas aeróbicas: Indican la carga bacteriana total; Los recuentos altos sugieren una higiene deficiente o un almacenamiento inadecuado.

Mohos y levaduras: Comunes en alimentos y ambientes húmedos; Puede causar deterioro.

3) Indicadores de procesos industriales y control sanitario:

Clostridium perfringens: se utiliza para verificar la eficacia de los tratamientos térmicos y el control de esporas.

Bacterias reductoras de sulfato: indican condiciones anaeróbicas y presencia de procesos de corrosión en las industrias.

Los microorganismos indicadores se usan por lo siguiente:

- Son más fácil y más barato de detectar que los patógenos.
- Permiten una evaluación rápida de las condiciones sanitarias.
- Sirven como base legal y regulatoria (ejem: normas de Anvisa, OMS, EPA, etc.).

MICROORGANISMOS PATÓGENOS

Un microorganismo patógeno es un organismo microscópico (como bacterias, virus, hongos o parásitos) que causa enfermedades en humanos, animales o plantas. La palabra "patógeno" proviene del griego *pathos* (enfermedad) y *genes* (productor), por lo que literalmente significa "productor de enfermedad".

Tipos de microorganismos patógenos

1. Bacterias

Son organismos unicelulares que pueden vivir en distintos ambientes. Algunas bacterias beneficiosas habitan en el cuerpo humano (como en el intestino), pero otras causan enfermedades. Ejemplos de bacterias patógenas:

- *Escherichia coli* (ciertas cepas causan diarrea)
- *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis)
- *Salmonella sp.*

2. Virus

Son más pequeños que las bacterias y no pueden vivir ni reproducirse por sí solos. Necesitan invadir células para multiplicarse. Ejemplos de virus patógenos:

- Virus de la hepatitis A
- Norovirus
- Rotavirus
- Adenovirus entérico

3. Hongos

Pueden ser unicelulares (como las levaduras) o multicelulares. Algunos causan infecciones, especialmente en personas inmunodeprimidas. Ejemplos de hongos patógenos:

- *Penicillium*
- *Aspergillus spp.* (aspergilosis)
- *Fusarium*
- *Claviceps purpurea*

4. Protozoarios

Son organismos unicelulares eucariotas. Viven en ambientes húmedos o acuáticos, y algunos pueden infectar humanos. Ejemplos de protozoos patógenos:

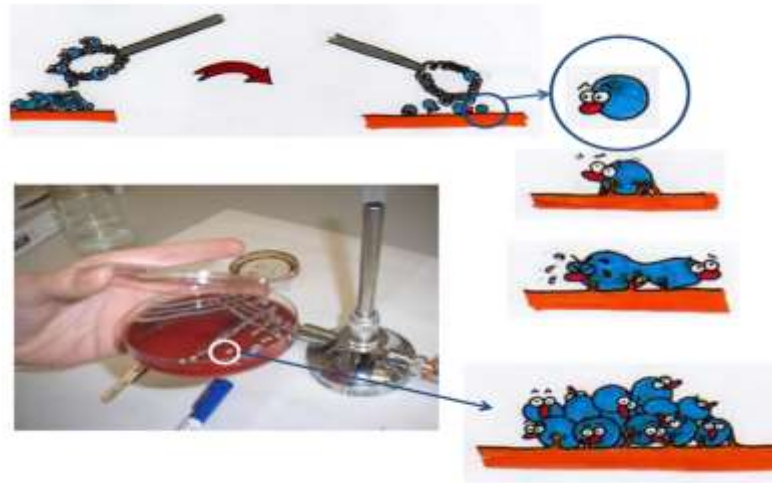
- *Plasmodium spp.* (malaria)
- *Giardia lamblia* (giardiasis)
- *Entamoeba histolytica* (amebiasis)

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS Y TÉCNICAS DE SIEMBRA MICROBIANA

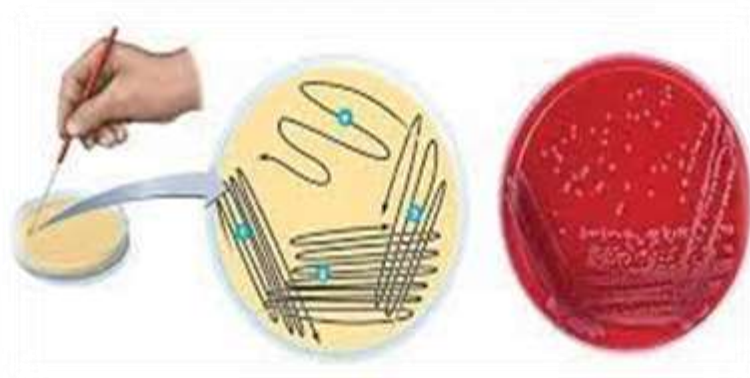
TÉCNICA DE SIEMBRA POR ESTRÍA

La siembra por estría es un método cualitativo de aislamiento de microorganismos por agotamiento en placa a partir de una muestra natural o de un cultivo de laboratorio. Este método está basado en arrastrar, mediante un asa de siembra, un número cada vez más pequeño de individuos. Esta técnica se utiliza para aislamiento primario de microorganismos.

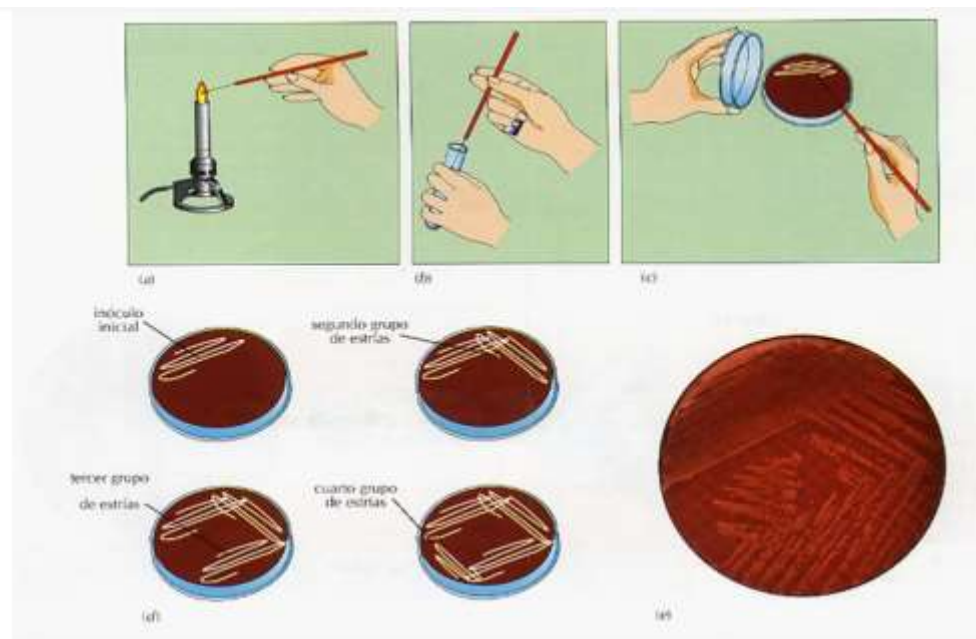
El método más usado es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de petri. Para ello se toma una pequeña cantidad de muestra con un asa bacteriológica y se reparte sobre la superficie del medio de cultivo. Sobre el medio quedan separadas e inmovilizadas las células bacterianas.



Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación.

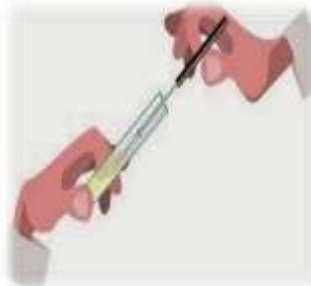


En la Siembra por agotamiento o aislamiento en estría, se toma con el asa de siembra (previamente esterilizado por flameado) una cantidad adecuada de muestra problema depositando el inóculo en uno de los extremos superiores de la placa; a partir de aquí se realizarán movimientos en zig-zag de un extremo a otro de la placa no tomándose en ningún momento nuevo inóculo y no levantándose el asa hasta concluir la siembra de toda la placa.

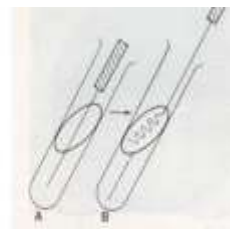


TÉCNICA DE SIEMBRA POR PUNTURA

En esta técnica de siembra el medio de cultivo que se emplea está solidificado en tubo en forma vertical y la siembra se realiza con asa bacteriológica en punta, la que se introduce con el inóculo en el centro del medio de cultivo y se retira de la misma forma por donde ingresó el asa bacteriológica en punta. La punción se realiza en el centro del medio del agar inclinado.



Consiste en la utilización de las dos técnicas anteriormente descritas. Este método se lleva a cabo cuando el medio es sólido y está inclinado. Primero se realiza la siembra por picadura y posteriormente la siembra por estría; son ejemplos de este tipo de siembra la prueba en medio KIA y la prueba en medio citrato, entre otras.

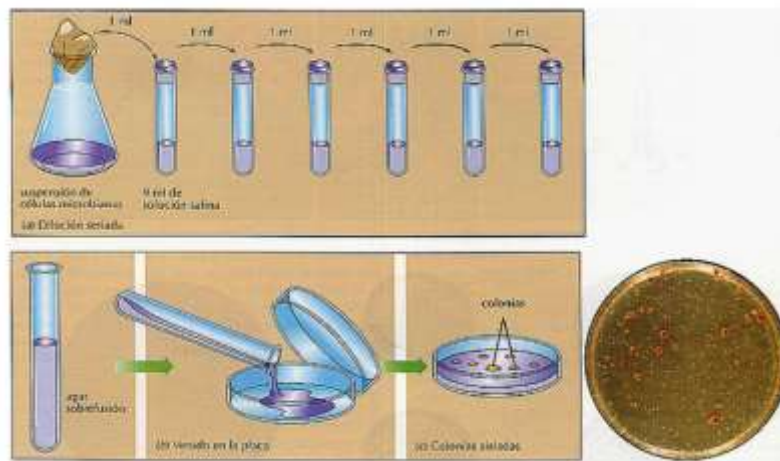


Se toma con asa de siembra previamente esterilizada por flameado una cantidad de muestra adecuada. Se coloca la muestra en el tubo desde el fondo hasta la superficie de este, realizando movimientos en zig-zag hasta completar toda la superficie del medio. Este método es utilizado para conservar cepas durante largos periodos, así como para la realización de ciertas pruebas bioquímicas, como, por ejemplo, la prueba de la ureasa, TSI, LIA, Citrato.

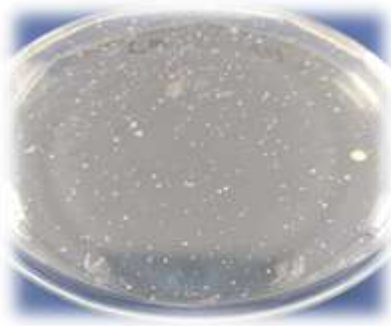


TÉCNICA DE SIEMBRA POR INCORPORACIÓN

La metodología de recuento en placa por plaqueo es una metodología ampliamente utilizada (Hoben y Somasegaran, 1982), que consiste en realizar diluciones seriadas 1:10 y extender 100 μ l de cada dilución en una placa; las placas se incuban hasta que las colonias son apreciables para su recuento.



El recuento en placa es uno de los métodos más utilizados para determinar cuál es el número de microorganismos viables en una muestra. Cuando la concentración es baja se procede a filtrar la muestra a través de una membrana que será pasada al medio de cultivo, en una placa de Petri.



TÉCNICA DE SIEMBRA POR DISEMINACIÓN

En esta técnica de siembra se deposita, una asada o una gota con pipeta del material a sembrar, sobre el medio sólido contenido en la placa, luego se extenderá por toda la superficie del medio con una espátula de DRIGALSKY.

*La espátula se introduce inmediatamente después de su uso en un recipiente para su esterilización en autoclave o en formaldehído al 5 %.

- ▶ **ASA DE DIGRASKY:** Son asas de vidrio con forma de triángulo. Se utilizan para extender el inoculo líquido previamente adicionado en la placa. Se esterilizan en estufa, en autoclave, aunque generalmente se puede hacer metiéndola en alcohol y prendiendo la llama hasta agotar el alcohol del asa.



- ▶ **HISOPOS:** Sirve para extender la muestra a través del hisopo en el medio cultivo. Se suele comercializar ya estéril, listo para utilizar y desechables.



TECNICA DEL NÚMERO MAS PROBABLE (NMP)

La técnica del NMP consiste en la inoculación de una muestra diluida en tubos que contienen medio de cultivo líquido selectivo. Lo que se busca es saber si presenta la muestra tiene algún tipo de contaminación bacteriana.

La determinación de microorganismos **coliformes totales** por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 48 h., utilizando un medio de cultivo que contenga sales biliares.

La determinación del número más probable de microorganismos **coliformes fecales** se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 a 48 h.



IV.-RESULTADOS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

V.-CONCLUSIONES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VI.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

ALTERACIONES QUÍMICAS POSITIVAS Y NEGATIVAS CAUSADAS POR MICROORGANISMOS

Los microorganismos pueden provocar tanto alteraciones químicas positivas como negativas en diversos contextos, dependiendo de su tipo, del entorno y del sustrato en el que actúan.

ALTERACIONES QUÍMICAS POSITIVAS

Estas son transformaciones que benefician al ser humano o al ambiente. Generalmente se utilizan en procesos biotecnológicos, industriales o ecológicos.

1. Fermentación

- *Microorganismos:* Levaduras, bacterias lácticas.
- *Productos:* Alcohol, pan, yogur, queso, vinagre.
- *Reacción química:* Transformación de azúcares en alcohol o ácidos (como ácido láctico o acético).

2. Producción de antibióticos

- *Microorganismos:* Hongos como *Penicillium* y bacterias como *Streptomyces*.
- *Ejemplo:* Producción de penicilina mediante fermentación.

3. Biorremediación

- *Microorganismos:* Bacterias degradadoras (como *Pseudomonas*).
- *Aplicación:* Degradan hidrocarburos, metales pesados y otros contaminantes tóxicos.

4. Fijación de nitrógeno

Microorganismos: Bacterias como *Rhizobium* en simbiosis con leguminosas.

Función: Convierten el nitrógeno atmosférico en formas asimilables por plantas (como nitratos y amonio).

5. Digestión anaerobia / producción de biogás

Microorganismos: Bacterias metanogénicas.

Resultado: Conversión de residuos orgánicos en metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂).

ALTERACIONES QUÍMICAS NEGATIVAS

Estas transformaciones tienen efectos nocivos sobre la salud, los alimentos o el medio ambiente.

1. Putrefacción

- *Microorganismos:* Bacterias proteolíticas y anaerobias (ej. *Clostridium*).
- *Reacción:* Degradación de proteínas en carne, pescado o huevos, liberando compuestos tóxicos como aminas, amoníaco, sulfuros, etc.

2. Contaminación de alimentos

- *Microorganismos: Salmonella, Listeria, Escherichia coli* patógena.
- *Resultado: Producción de toxinas o alteración de compuestos que causan enfermedades.*

3. Corrosión microbiana

- *Microorganismos: Bacterias sulfato-reductoras (ej. Desulfovibrio).*
- *Reacción: Generación de ácido sulfhídrico que corroe metales (problema en tuberías y estructuras industriales).*

4. Formación de biopelículas en sistemas industriales o médicos

- *Microorganismos: Pseudomonas, Staphylococcus, entre otros.*
- *Efecto químico: Producción de polímeros extracelulares que dificultan la limpieza y aumentan la resistencia química de las superficies.*

5. Acidificación no deseada de suelos o aguas

- *Microorganismos: Bacterias oxidantes del azufre o nitrificantes en exceso.*
- *Consecución: Conversión de compuestos en ácidos (como ácido nítrico o sulfúrico), afectando el pH y la vida biológica.*

PRÁCTICA

ANÁLISIS MICROBIANO DE ALIMENTOS FRESCOS

I.- OBJETIVO: Realizar el análisis microbiológico de dos alimentos utilizando técnicas de aislamiento microbiano.

II.- FUNDAMENTO TEÓRICO:

Los microorganismos pueden provocar tanto alteraciones químicas positivas como negativas en diversos contextos, dependiendo de su tipo, del entorno y del sustrato en el que actúan.

El análisis microbiano de alimentos frescos es un proceso clave en la evaluación de la calidad sanitaria e inocuidad de frutas, verduras, carnes, pescados, entre otros productos no procesados. Este análisis permite detectar y cuantificar la presencia de microorganismos patógenos y alterantes, asegurando que los alimentos sean aptos para el consumo humano.

Los objetivos principales de un análisis microbiológico son:

1. Detectar microorganismos patógenos: como *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (particularmente la E. coli O157:H7), *Clostridium perfringens*, entre otros.
2. Evaluar la carga microbiana total: incluyendo bacterias aerobias mesófilas, coliformes totales y fecales, mohos y levaduras.
3. Verificar condiciones higiénico-sanitarias durante la producción, almacenamiento y transporte.
4. Prevenir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

III.- MUESTRAS BIOLÓGICAS

- 100 ml. de leche de vaca
- 100g. de queso.

IV.-MATERIALES Y REACTIVOS

- Medios de Cultivo: Agar Mac Conkey, Agar TSI, Agar LIA, Agar Citrato.
- Matraces
- Tubos de ensayo 13x100mm
- Placa Petri de vidrio 90mm
- Mechero de alcohol
- Asa bacteriológica
- Gradilla

V.-EQUIPOS

- Autoclave

- Estufa

VI.-PROCEDIMIENTO:

- 1) Preparación de los medios de cultivo: Agar Mac Conkey, agar TSI, agar LIA, Agar Citrato.
- 2) Aislamiento primario de microorganismos por la “Técnica de siembra por estría” en agar Mac Conkey.
- 3) Identificación bioquímica de los microorganismos en agar TSI, agar LIA, Agar Citrato por la “Técnica de siembra por estría”.
- 4) Identificación de microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

VII.-RESULTADOS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VIII.-CONCLUSIONES

.....

.....

.....

.....

IX.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.....

.....

.....

.....

DETERIORO MICROBIANO EN LA AGROINDUSTRIA

El deterioro microbiano en la agroindustria es un proceso en el que microorganismos (como bacterias, hongos y levaduras) afectan negativamente los productos agrícolas y sus derivados, causando pérdidas económicas, disminución de la calidad, riesgos para la salud humana y complicaciones en la comercialización.

Los principales factores que propician el deterioro microbiano incluyen:

- Presencia de agua (actividad de agua alta).
- Temperaturas inadecuadas de almacenamiento.
- Contaminación cruzada durante el procesamiento.
- Higiene deficiente en maquinaria o personal.
- pH favorable para el crecimiento microbiano.

Microorganismos comunes implicados

- Bacterias: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*
- Hongos y mohos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*
- Levaduras: *Saccharomyces*, *Candida*

Productos comúnmente afectados

- Frutas y verduras frescas (moho, podredumbre)
- Lácteos (fermentación indeseada, mal olor)
- Carnes y embutidos (bacterias patógenas y putrefacción)
- Cereales y granos (micotoxinas por mohos)
- Jugos y bebidas (contaminación por levaduras o bacterias)

Medidas preventivas

- Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).
- Control de temperatura y humedad.
- Envases herméticos o atmósfera modificada.
- Uso de conservantes naturales o químicos.
- Procesos de pasteurización, irradiación o desinfección.
- Higiene y capacitación del personal.

Impacto del deterioro microbiano

- Económico: Pérdidas por productos no comercializables.
- Sanitario: Riesgo de enfermedades alimentarias.
- Ambiental: Incremento del desperdicio de alimentos.

MÉTODOS DE CONTROL MICROBIANO

Los métodos de control microbiano en la agroindustria son estrategias físicas, químicas y biológicas diseñadas para prevenir, reducir o eliminar el crecimiento de microorganismos no deseados en los alimentos y sus procesos de producción.

1. Métodos físicos

a) Temperatura

- Calor (pasteurización, esterilización): elimina la mayoría de los microorganismos.
- Frío (refrigeración, congelación): ralentiza el crecimiento microbiano.

b) Deshidratación

Reduce la actividad de agua (A_w), impidiendo el desarrollo microbiano.

c) Radiación

Irradiación ionizante (rayos gamma o electrones): destruye ADN microbiano sin afectar demasiado la calidad del producto.

d) Filtración

Uso en líquidos (como jugos o leche) para remover microorganismos sin aplicar calor.

e) Presión hidrostática

Tecnología de altas presiones para destruir microorganismos sin calor (HPP - High Pressure Processing).

2. Métodos químicos

a) Conservantes químicos

- Ácidos orgánicos: ácido acético, sórbico, benzoico.
- Nitratos y nitritos: en carnes curadas.
- Sulfito y dióxido de azufre: en frutas secas y jugos.

b) Gases antimicrobianos

Uso de atmósferas modificadas (CO_2 , N_2) para inhibir microorganismos.

c) Desinfectantes

Hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, ozono: usados en limpieza y desinfección de superficies e instalaciones.

3. Métodos biológicos

a) Uso de microorganismos beneficiosos

- Fermentación controlada: bacterias lácticas que inhiben patógenos.
- Probióticos: compiten con microorganismos dañinos.

b) Bacteriocinas

Proteínas antimicrobianas (como la nisina) producidas por bacterias, usadas como conservantes naturales.

c) Enzimas antimicrobianas

Como la lisozima, que destruye paredes celulares bacterianas.

4. Buenas Prácticas de Higiene y Manufactura

- Control de puntos críticos (HACCP).
- Limpieza y desinfección de equipos.
- Capacitación del personal.
- Control de plagas y materias primas.

Combinación de métodos: Hurdle Technology

El uso combinado de varios métodos (temperatura, pH, conservantes, etc.) genera múltiples "barreras" para impedir el desarrollo microbiano, maximizando la inocuidad sin afectar la calidad.

FUNDAMENTO DE MEDIOS DE CULTIVO

AGAR MAC CONKEY

Es un agar selectivo para el aislamiento de Salmonellas, Shiguellas y bacterias coniformes a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales, etc.

Formas de Actuación:

Las sales biliares y el cristal inhiben considerablemente la flora Gram Positiva. La lactosa junto con el indicador de pH rojo neutro, sirven para la comprobación de la degradación de dicha azúcar.

Los medios de cultivo preparados son claros y de color rojo parduzco.

Empleo e Interpretación:

Sembrar las placas por el método de estría. Incubar de 18 a 24 horas a 37 °C.

Las colonias Lactosa negativas son incoloras y las lactosa positivas son rojas con un halo turbio debido al descenso de pH provocado por los ácidos biliares.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Incoloras, transparentes	<i>Salmonella, Shiguella, Proteus</i> y otros
Grandes, rojas y halo turbio	<i>Escherichia Coli</i>
Más grandes, rosadas, mucosas	<i>Enterobacter, Klebsiella</i>
Diminutas, de crecimiento aislado y opacas.	<i>Enterococos, Estafilococos</i> y otros



Agar MacConkey con colonias Lac+ (izquierda)
y colonias Lac- (derecha).

CITRATO SIMMONS

Para la demostración de la utilización microbiana del citrato. Este medio de cultivo sirve especialmente para la identificación de *Escherichia coli*, se utiliza para la identificación de microorganismos especialmente de enterobacterias y ciertos hongos, basado en el empleo de citrato como única fuente de carbono.

Forma de Actuación:

La degradación del citrato por los microorganismos da lugar a una alcalinización del medio de cultivo, lo que se manifiesta por un viraje a azul oscuro del indicador de pH azul de bromotimol.

Empleo e Interpretación:

Placas o tubos con medio de cultivo son claros y de color verde.

CRECIMIENTO	MICROORGANISMOS
Positivo: Medio de cultivo azul oscuro.	Citrato Positivos: <i>Citrobacter, Enterobacter, Salmonella paratyphi B., Klebsiella, Serratia.</i>
Negativo o inhibido	Citrato Negativos: <i>Shiguella, Escherichia, S. Typhi, otros.</i>



Prueba negativa Prueba positiva

AGAR HIERRO TRES AZÚCARES (TSI)

Para la identificación de enterobacteriaceas.

Forma de Actuación:

La degradación del azúcar con formación de ácido se manifiesta por un cambio de color del indicador Rojo de Fenol que vira de anaranjado rojizo a amarillo, o por un viraje a rojo intenso en caso de alcalinización. El tiosulfato es reducido por algunos gérmenes a ácido sulfhídrico, el cual reacciona con la sal férrica produciendo sulfuro de hierro de color negro.

Composición:

Peptona de caseína, peptona de carne, extracto de carne, extracto de levadura, NaCl, lactosa, sacarosa, glucosa, amonio de hierro (III), citrato, tiosulfato sódico, rojo de fenol, agar.

*Color claro y rojo anaranjado.

Empleo e Interpretación:

Se siembra el cultivo puro sometido a investigación tanto por estría en la superficie inclinada como en la columna vertical mediante puntura.

Microorganismo	Tubo	Gas	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	A/A	+	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	K/A	+	+



Diferentes cultivos de microorganismos en agar TSI:(de izquierda a derecha) [E. coli](#), [Shigella flexneri](#), [Salmonella Typhimurium](#), [P. aeruginosa](#)



Resultados de un agar TSI: (de izquierda a derecha)
Tubo control, [P. aeruginosa](#), [E. coli](#), [Salmonella Typhimurium](#), [Shigella flexneri](#).

AGAR LISINA HIERRO (LIA)

Agar de ensayo para la demostración simultánea de lisina descarboxilasa (LD) y de la formación de H₂S (Acido sulfhídrico) para la identificación de enterobacteriaceas sobre todo *Salmonellas* y *Arizona*.

Forma de Actuación:

La lisina puede ser descarboxilada por microorganismos LD positivos, que la transforman en la amina Cadaverina. Esto produce un viraje al violeta del indicador de pH Púrpura de bromo Cresol. Puesto que la descarboxilación sólo tiene lugar en medio ácido (pH inferior a 6), es necesario que se produzca previamente la acidificación del medio de cultivo, por la fermentación de la glucosa. Por este motivo, este medio de cultivo solo puede utilizarse para la diferenciación de cultivos que fermentan la glucosa.

Los microorganismos LD (-) pero fermentadores de la glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo. La incubación prolongada puede ocasionar una alcalinización en la zona de la superficie del medio y en consecuencia, se produce un viraje al violeta. La formación de H₂S produce una coloración negra debida al FeS producido.

Las cepas del grupo *Proteus-Providencia*, con excepción de algunas cepas de *Proteus morganii*, desaminan a la lisina a ácido alfa cetocarbónico. Este último forma compuestos pardo rojizos en la región superficial del medio de cultivo con la sal de hierro y bajo la influencia de oxígeno.

Empleo e Interpretación:

Este medio nutritivo se siembra con el cultivo puro sometido a ensayo, tanto por estría sobre la superficie inclinada como por picadura central en la columna vertical subyacente.

Incubación 16-18 horas a 37°C.

Microorganismo	Tubo	H ₂ S
<i>Escherichia coli</i>	K/A	-

Microorganismos	Color del medio de cultivo		Formación de H ₂ S
	Superficie Inclinada	Columna vertical	
<i>Arizona</i>	Violeta	Violeta	+
<i>Salmonella</i>	Violeta	Violeta	+
<i>Proteus mirabilis</i>	Pardo rojizo	Amarillo	+
<i>Proteus vulgaris</i>	Pardo rojizo	Amarillo	+
<i>Proteus morganii</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Proteus rettgeri</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Providencia</i>	Pardo rojizo	Amarillo	-
<i>Citrobacter</i>	Violeta	Amarillo	+
<i>Escherichia</i>	Violeta	Amarillo o -	-

<i>Shiguella</i>	Violeta	Amarillo	-
<i>Klebsiella</i>	Violeta	Violeta	-



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Descarboxilación de la lisina:

Resultado Positivo: superficie alcalina / profundidad alcalina (pico violeta / fondo violeta).

Resultado negativo: superficie alcalina / profundidad ácida (pico violeta / fondo amarillo).

Desaminación de la lisina:

Resultado positivo: superficie roja / profundidad ácida. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y algunas de *Morganella* spp.

Producción de SH₂:

Resultado positivo: ennegrecimiento del medio de cultivo (especialmente en el límite entre la superficie y profundidad).

Resultado negativo: el medio de cultivo permanece sin cambio de color.

CALDO VERDE BRILLANTE BILIS LACTOSA (CALDO BRILA)

Para el enriquecimiento selectivo y numeración de *Escherichia coli* en aguas, leche, alimentos y otros materiales mediante la determinación del título según la Técnica del Numero Más Probable (NMP).

Forma de Actuación:

La bilis y el verde brillante inhiben notablemente el crecimiento de la flora indeseable acompañante, incluso clostridios degradadores de la lactosa (Por ejemplo *Clostridium perfringens*). La fermentación de la lactosa con formación de gas, que es un indicativo de la presencia de *E. coli*, se demuestra mediante campanas de Durham, los restantes coliformes no fecales también crecen en este medio, pero casi siempre sin formación de gas.

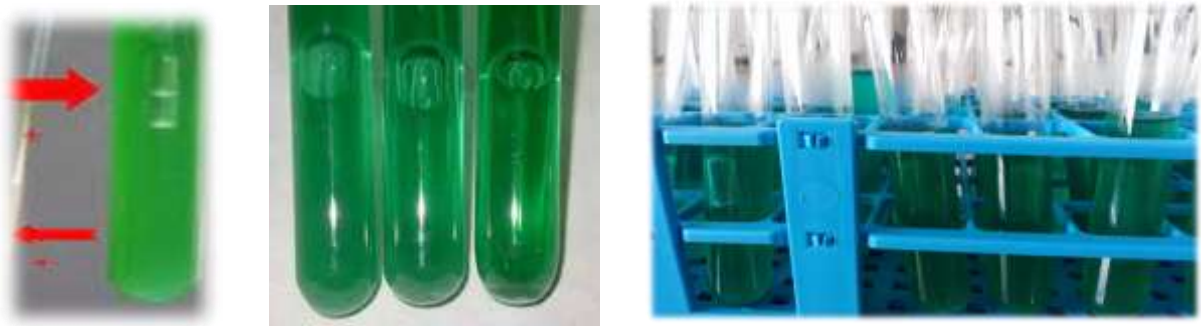
El caldo preparado es claro y de color verdoso.

Coliformes: *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus*.

Empleo e Interpretación:

Incubar 24 – 48 horas a 37°C o a la temperatura indicada.

El título de E. coli corresponde al volumen más pequeño de material a investigar que todavía produce gas. Como garantía de la investigación hay que complementar el estudio con la diferenciación del cultivo desarrollado.



AGAR SALMONELLA SHIGUELA (SS AGAR)

Para el aislamiento de Salmonellas y Shiguellas a partir de heces, alimentos y otros materiales objeto de investigación.

Forma de Actuación:

El verde brillante, la bilis de buey y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben considerablemente la flora acompañante. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

Las colonias de coliformes quedan señaladas por la demostración de la degradación de lactosa a ácido a cargo del indicador de pH rojo neutro.

Las placas con medio de cultivo son claras y parduzcas.

Empleo e interpretación:

Sembrar por estría la superficie del medio de cultivo con el material de muestra o con el procedente de un cultivo de enriquecimiento previo.

Las colonias de gérmenes lactosa negativas son incoloras y las de gérmenes lactosa positivas son rosadas hasta rojas.

Las colonias de microorganismos formadores de H₂S presentan un centro negro.

COLONIAS	MICROORGANISMOS
Incoloras, transparentes	<i>Shiguellas</i> y la mayoría de <i>Salmonellas</i>
Transparentes con centro negro	<i>Proteus</i> y algunas <i>Salmonellas</i>
Rosadas hasta rojas	<i>Escherichia coli</i>
Mayores que las de <i>E.coli</i> rosadas hasta de color cremoso-blanquesinas, opacas y mucosas.	<i>Enterobacter aerogenes</i>

AGUA PEPTONADA O TRIPTONADA

Para la demostración de la formación microbiana de indol en la identificación bioquímica de microorganismos.

Forma de actuación:

La peptona de caseína (Tryptona) contiene una elevada proporción de triptófano, el cual es degradado por los microorganismos indol positivos formándose indol. La formación del indol se comprueba con el reactivo de KOVACS.

AGAR XLD

El agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato) es un medio selectivo diferencial, utilizado para el aislamiento y diferenciación de patógenos entéricos Gram negativos, especialmente, del género Shiguela.

Composición

- Xilosa 3,75 g
- L- Lisina 5,0 g
- Lactosa 7,5 g
- Sacarosa 7,5 g
- Cloruro de Sodio 5,0 g
- Extracto de Levadura 3,0 g
- Rojo Fenol 0,08 g
- Desoxicolato de Sodio 2,5 g
- Tiosulfato de Sodio 6,8 g
- Citrato Férrico de Amonio 0,8 g
- Agar 15,0 g
- Agua destilada c.s.p. 1000 mL
- pH final 7,4 ± 0,2

La degradación de los carbohidratos presentes en el medio (xilosa, lactosa y sacarosa) genera la producción de ácido haciendo virar el indicador (rojo fenol) de rojo a amarillo. En este medio se

incorpora la xilosa porque es prácticamente fermentada por todas las enterobacterias con excepción de los microorganismos pertenecientes al género *Shigella*.

La lisina se incluye para aumentar la diferenciación de los microorganismos pertenecientes al género *Salmonella*, ya que sin la lisina estos microorganismos rápidamente fermentan la xilosa produciendo la acidificación del medio y no se pueden diferenciar de otras especies no patógenas. Como la cantidad de este carbohidrato es limitada, una vez que estos microorganismos lo consumen, comienzan a utilizar la lisina lo cual produce la alcalinización del medio; este hecho se evidencia porque el rojo fenol nuevamente vira a un color rojo.

En el caso de los coliformes lisina positiva, para prevenir la alcalización del medio por la utilización de la lisina, se incorpora en el medio un exceso de lactosa y sacarosa.

El medio también tiene la capacidad de detectar la producción de H₂S, a través del sistema indicador tiosulfato de sodio y citrato férrico amonio. Cuando el microorganismo produce H₂S se observan colonias con el centro negro.

Los microorganismos no patógenos productores de H₂S no descarboxilan la lisina; cuando están presentes estos microorganismos la reacción ácida producida por la utilización de los carbohidratos previene en ennegrecimiento de las colonias.

El desoxicolato de sodio es utilizado como un inhibidor de los microorganismos Gram positivos.

Las colonias sospechosas de *Shigella* sobre el agar XLD son transparentes y parecen rojas por el color del medio. Este género bacteriano al no fermentar la xilosa, la lactosa, ni la sacarosa, no da lugar a que el rojo fenol vire a amarillo. Como estos microorganismos tampoco tienen la capacidad de alcalinizar el medio por la descarboxilación de la lisina, no se produce color rojo púrpura alrededor de las colonias.

Las colonias típicas de la *Salmonella* son de color rojo con el centro negro debido a la producción de H₂S. Mientras que las de *E. coli* son grandes, amarillas con o sin precipitado de bilis.





AGAR BAIRD PARKER

El Agar Baird - Parker es un medio moderadamente selectivo usado para el aislamiento, la enumeración e identificación presuntiva de *Staphylococcus aureus* a partir de diversos materiales, tales como alimentos, cosméticos, aguas y muestras ambientales, incluyendo muestras clínicas.

Fórmula (en gramos por litro)

- | | | |
|------------------------|------|------|
| • Peptona de caseína | 10.0 | |
| • Extracto de carne | | 5.0 |
| • Extracto de Levadura | 1.0 | |
| • Cloruro de Litio | | 5.0 |
| • Glicina | 12.0 | |
| • Piruvato de sodio | | 10.0 |
| • Agar | 17.0 | |
| • Ph Final: 6.8+/-0.2 | | |

*Agregar 50 mL. Yema telurito

El agar Baird Parker, es un medio altamente nutritivo, en el cual la peptona de caseína y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos.

El agar es el agente solidificante. Permite el crecimiento selectivo de estafilococos ya que el telurito de potasio y el cloruro de litio inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra.

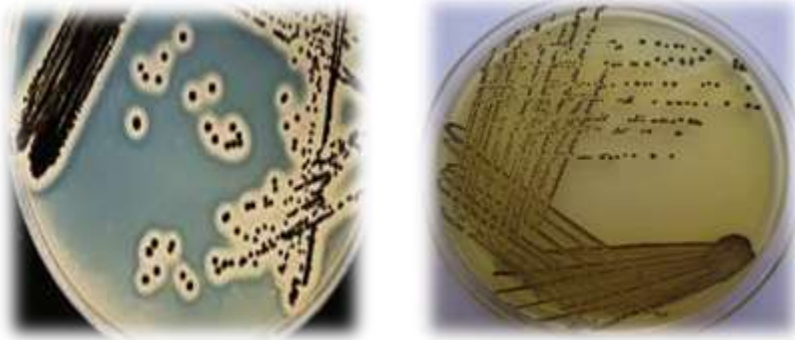
La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitinásica de los microorganismos.

Los estafilococos coagulasa positiva reducen el telurito a teluro y originan colonias de color grisáceo-negro, y tienen actividad lecitinásica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia.

Interpretación de Resultados

Observar las características de las colonias

- Bacterias que reducen el telurito de potasio: Colonias de color grisáceo-negro.
- Bacterias que no reducen el telurito de potasio: Colonias de color del medio, transparentes.
- Bacterias con actividad lecitinásica: Halo claro en el medio de cultivo alrededor de la colonia. Pueden existir también un halo opaco alrededor de la colonia con un halo claro externo.
- Bacterias sin actividad lecitinásica: Ausencia de halo claro alrededor de la colonia.



AGAR NUTRITIVO

Es un medio utilizado para para el aislamiento de microorganismos con pocas exigencias nutritivas.

El medio contiene extracto de carne, peptona y agar, siendo una formulación suficiente para el desarrollo de los microorganismos. El extracto de carne proporciona al medio fuente de carbohidratos, de nitrógeno y vitaminas.

Escherichia coli: Colonias grandes, crema brillante y lisas,

Staphylococcus aureus: Colonias grandes ligeramente amarillas, brillantes y lisas,

Enterococcus faecalis: Colonias pequeñas, crema opacas y lisas



2) Agar

.....

Técnica de siembra

.....

Indicador de Ph

.....

Lectura:

Tubo1.....

Tubo2.....

Tubo3.....

Tubo4.....

Explique el fundamento:

Tubo1.....

.....

.....

.....

Tubo2.....

.....

.....

.....

Tubo3.....

.....

Tubo2.....
.....
.....
.....

Tubo3.....
.....
.....
.....

4) Agar.....

Técnica de siembra
.....

Indicador de Ph
.....

Lectura:
.....

Explique el fundamento:
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

CONTROL DEL DESARROLLO MICROBIANO

El control del desarrollo microbiano se refiere al conjunto de métodos utilizados para eliminar, inhibir o limitar el crecimiento de microorganismos (como bacterias, hongos, virus y protozoos) en distintos entornos, incluyendo alimentos, equipos médicos, superficies, agua y organismos vivos.

PRINCIPALES MÉTODOS DE CONTROL MICROBIANO

1. Métodos físicos

Calor

- *Calor seco* (como en hornos): destruye microorganismos por oxidación.
- *Calor húmedo* (como en autoclave o ebullición): desnaturaliza proteínas; el más eficaz es el autoclave (121 °C, 1 atm, 15-20 min).



El calor seco elimina los microorganismos mediante la oxidación de los componentes celulares, incluyendo proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. A diferencia del calor húmedo (como el vapor de autoclave), el calor seco no penetra tan eficientemente en los materiales, por lo que se requieren temperaturas más altas y tiempos de exposición más prolongados para lograr una esterilización efectiva.

Mecanismo de acción:

- Desnaturalización y coagulación de proteínas: aunque esto es más eficiente con humedad, el calor seco también produce efectos destructivos a nivel molecular.
- Oxidación de lípidos de membrana: lo que compromete la integridad de la célula.
- Deseccación del contenido celular: contribuye a la inactivación microbiana.
- Destrucción del ADN y ARN: a altas temperaturas.

Condiciones típicas del horno de calor seco:

- 160 °C durante 2 horas
- 170 °C durante 1 hora

- 180 °C durante 30 minutos

Estas condiciones aseguran la destrucción de esporas bacterianas, que son las formas más resistentes.

Ventajas del calor seco:

- Ideal para materiales que no pueden ser esterilizados con humedad (vidrio, metales, polvos, aceites).
- No corroe ni daña instrumentos quirúrgicos metálicos.

Limitaciones:

- No adecuado para materiales sensibles al calor.
- No es eficaz para líquidos o medios de cultivo.
- Requiere más tiempo y energía que el calor húmedo.



El calor húmedo, aplicado mediante un autoclave, es uno de los métodos más eficaces y ampliamente utilizados para la esterilización de materiales y medios de cultivo en microbiología, medicina y otras ciencias biológicas. Este método emplea vapor de agua a alta presión, lo que permite alcanzar temperaturas superiores a los 100 °C, típicamente 121 °C a 1atm durante 15 a 20 minutos.

Mecanismo de acción del calor húmedo:

- Coagulación y desnaturalización de proteínas celulares: el vapor de agua transfiere calor de manera eficiente, lo que causa una rápida y profunda desnaturalización de las proteínas microbianas.
- Ruptura de membranas celulares y paredes celulares.

- Desnaturalización de ácidos nucleicos (ADN y ARN).
- Destrucción de esporas bacterianas (forma más resistente de vida microbiana).

La eficacia del calor húmedo es mayor que la del calor seco debido a la mejor transferencia de calor del vapor, lo que permite un mayor poder penetrante y una acción más rápida sobre las estructuras microbianas.

Condiciones estándar del autoclave:

Temperatura: 121 °C

Presión: 1 atm(libras por pulgada cuadrada)

Tiempo: 15–20 minutos (según el tipo y volumen del material).

Otros ciclos posibles:

- 134 °C por 3 minutos (uso hospitalario o materiales especiales)
- 115 °C por 30 minutos (para materiales sensibles)

Ventajas del calor húmedo:

- Altamente eficaz para eliminar bacterias, virus, hongos y esporas.
- Rápido y confiable.
- Seguro para esterilizar líquidos, textiles, instrumentos quirúrgicos, vidrio y medios de cultivo.

Limitaciones:

- No se puede usar con materiales termosensibles o que se dañen con la humedad (plásticos, polvos, aceites).
- Algunos tipos de plásticos pueden deformarse.
- Requiere un equipo especializado (autoclave) y seguimiento de protocolos de seguridad.



La **pasteurización** o **pasterización** es un proceso térmico que es realizado en líquidos (generalmente alimentos, como por ejemplo la leche), con la intención de reducir la

presencia de agentes patógenos (como por ejemplo ciertas bacterias, protozoos, mohos, levaduras, etcétera) que puedan contener.

Debido a las altas temperaturas (80 grados), la gran mayoría de los agentes bacterianos mueren. Este proceso fue descubierto por el científico químico francés Louis Pasteur, junto a Claude Bernard, el 20 de abril de 1864.

Uno de los motivos del tratamiento térmico es un método de control de microorganismos de los alimentos líquidos, alterando lo menos posible su estructura física, sus componentes químicos y sus propiedades organolépticas.

En la pasteurización, los productos tratados se enfrían rápidamente y se sellan herméticamente con fines de seguridad alimentaria; por esta razón, es básico en la pasteurización el conocimiento del mecanismo de la transferencia de calor en los alimentos.

A diferencia de la esterilización, la pasteurización no destruye completamente las esporas de los microorganismos, ni elimina todas las células de microorganismos termófilos.

Louis Pasteur mejoró la calidad de vida al hacer posible que productos alimenticios básicos, como la leche, se pudieran transportar largas distancias sin ser afectados por la descomposición. En la pasteurización, el objetivo primordial no es la eliminación completa de los agentes patógeno sino la disminución sustancial de sus poblaciones, reduciéndolas a niveles que no causen intoxicaciones alimentarias a los humanos (siempre que el producto pasteurizado se mantenga refrigerado correctamente y que se consuma antes de la fecha de caducidad indicada).

La pasteurización es un proceso térmico químico realizado a los alimentos. Los procesos térmicos se pueden realizar con la intención de disminuir las poblaciones patógenas de microorganismos o para desactivar las enzimas que modifican los sabores de ciertos alimentos. No obstante, en la pasteurización se emplean generalmente temperaturas por debajo del punto de ebullición (en cualquier tipo de alimento), ya que en la mayoría de los casos las temperaturas superiores a este valor afectan irreversiblemente ciertas características físicas y químicas del producto alimenticio.

Así, por ejemplo, si en la leche se sobrepasa el punto de ebullición, las micelas de la caseína se coagulan irreversiblemente. El proceso de calentamiento de la pasteurización, si se hace a bajas temperaturas, tiene además la función de detener los procesos enzimáticos.

La pasteurización se realiza a los alimentos en un proceso industrial continuo aplicado a alimentos viscosos, con la intención de utilizar la energía de manera eficiente y disminuir así también costes de producción.

Existen tres tipos de procesos de pasteurización:

1) Proceso VAT (LTL, Low Temperature, Long Time) o lenta 63 °C durante 30 minutos.

2) Proceso a altas temperaturas durante un breve período (HTST, High Temperature/Short Time), 72 °C durante 15 segundos.

3) Proceso a altas temperaturas (UHT, Ultra-High Temperature), 138 °C durante un período de al menos 2 segundos.

Radiación

- *UV*: daña el ADN, útil en superficies y aire.
- *Ionizante* (rayos gamma, X): rompe enlaces del ADN, usado para esterilizar materiales médicos.

Filtración

- Retiene microorganismos en una membrana con poros pequeños (usado para líquidos sensibles al calor como antibióticos).

Desecación y presión osmótica

- La eliminación de agua o el uso de alta sal o azúcar impide el crecimiento microbiano (conservación de alimentos).

2. Métodos químicos

- Desinfectantes (para superficies inanimadas)

Ej.: cloro, alcohol, peróxido de hidrógeno.

- Antisépticos (para tejidos vivos)

Ej.: yodo, clorhexidina.

- Antibióticos y quimioterapéuticos

Sustancias que inhiben o matan bacterias dentro del cuerpo.

3. Control biológico

Uso de otros microorganismos o productos derivados para controlar el crecimiento de patógenos (bacterias beneficiosas, fagos).

4. Prácticas de asepsia y antisepsia

Esterilización de instrumentos, lavado de manos, uso de guantes y mascarillas para prevenir contaminación.

OBJETIVOS DEL CONTROL MICROBIANO

- Prevenir enfermedades infecciosas.
- Conservar alimentos y bebidas.
- Evitar la contaminación en laboratorios y hospitales.
- Proteger productos industriales y farmacéuticos.

Ventajas y desventajas de la aplicación de métodos físicos

Tipo	Método	Ventajas	Desventajas
Físico	Calor seco (horno)	- Eficaz para objetos metálicos - No deja residuos	- Tiempo prolongado - No apto para materiales sensibles al calor
	Calor húmedo (autoclave)	- Esterilización rápida y eficaz - Mata esporas	- No se puede usar en materiales termosensibles
	Radiación UV	- Rápido - Sin residuos químicos - Ideal para superficies y aire	- Baja penetración - Ineficaz en líquidos o sólidos opacos
	Radiación ionizante	- Alta penetración - Esteriliza productos empaquetados	- Costoso - Requiere equipos especiales y medidas de seguridad
	Filtración	- Conserva la actividad de compuestos termosensibles	- Solo retira microorganismos, no los mata - Puede obstruirse fácilmente
	Desecación/osmótica	- Método económico - Útil en conservación de alimentos	- No elimina todos los microorganismos - Algunos sobreviven en estado latente

Aplicación de Métodos de Control Microbiano

Tipo de material	Método aplicado	Tipo de control microbiano	Detalles de aplicación
Frascos de vidrio y pinzas	Calor seco (horno)	Esterilización física	160 °C durante 2 horas
Medios de cultivo líquidos	Calor húmedo (autoclave)	Esterilización física	121 °C, 1 atm, 15-20 minutos
Superficies de trabajo	Desinfectante químico	Desinfección química	Alcohol al 70 % o solución de hipoclorito
Manos del personal	Antiséptico químico	Antisepsia química	Gel hidroalcohólico o lavado con jabón antiséptico

PRÁCTICA

FACTORES QUE AFECTAN A LA TERMORRESISTENCIA, AGENTES FÍSICOQUÍMICOS Y CIRCULO DE SINNER

I.- OBJETIVO:

Comprender como los factores que afectan la termorresistencia, agentes fisicoquímicos y círculo de Sinner se aplican en la higiene, control microbiológico y seguridad alimentaria.

II.- FUNDAMENTO TEÓRICO

La termorresistencia se refiere a la capacidad de los microorganismos para resistir temperaturas elevadas. Los factores que la afectan incluyen:

- Tipo de microorganismo: Algunos son más resistentes que otros. Por ejemplo, las esporas bacterianas (como *Bacillus* o *Clostridium*) son más resistentes que las bacterias en estado vegetativo.
- Estado fisiológico del microorganismo: Microorganismos en fase estacionaria son más resistentes que en fase de crecimiento.
- Naturaleza del medio: Grasas, azúcares y proteínas pueden proteger a los microorganismos del calor.
- Humedad: A mayor humedad, menor resistencia térmica. En medios secos, los microorganismos sobreviven más tiempo.
- pH: Los extremos de pH (muy ácido o muy alcalino) reducen la termorresistencia.
- Presencia de sustancias antimicrobianas: Como sal, alcohol o conservantes que reducen la resistencia térmica.
- Velocidad de calentamiento y enfriamiento: Cambios rápidos pueden dañar más a los microorganismos.

Los agentes físicos y químicos se usan para eliminar o inhibir microorganismos. Se dividen en:

Agentes físicos:

- Temperatura: Elevada (esterilización, pasteurización) o baja (congelación).
- Radiación: UV, gamma (esterilización por daño en ADN).
- Filtración: Para remover microorganismos sin aplicar calor.
- Desección: El secado inhibe el crecimiento microbiano.
- Presión osmótica: Altas concentraciones de sal o azúcar.

Agentes químicos:

- Alcoholes (etanol, isopropanol): Desnaturalizan proteínas.
- Halógenos (cloro, yodo): Oxidan componentes celulares.
- Fenoles y derivados: Dañan membranas celulares.
- Compuestos cuaternarios de amonio: Disruptores de membranas.
- Óxidos (como el óxido de etileno): Esterilizantes gaseosos.

CÍRCULO DE SINNER

El Círculo de Sinner es un modelo que describe los factores que intervienen en la limpieza efectiva, especialmente en la industria alimentaria, farmacéutica y hospitalaria.

Sus cuatro factores principales son:

1. Tiempo: Duración del proceso de limpieza.
2. Temperatura: Grado de calor usado.
3. Acción mecánica: Agitación, fricción o presión que facilita la remoción de suciedad.
4. Acción química: Detergentes, desinfectantes o agentes químicos utilizados.

Si uno de los factores disminuye, otro debe aumentar para mantener la eficacia del proceso. Ejemplo: si se reduce la temperatura, se puede compensar aumentando el tiempo o la acción química.

Es importante porque:

- Garantiza eliminación eficaz de residuos orgánicos y microorganismos.
- Previene contaminación cruzada entre lotes de alimentos.
- Mejora la vida útil del producto.
- Cumple con normas de seguridad alimentaria (HACCP, ISO 22000, etc.)

El modelo del Círculo de Sinner se aplica principalmente en la industria alimentaria en:

- Limpieza de líneas de producción (equipos, tanques, cintas transportadoras, etc.)
- Lavado de frutas y verduras.
- Higienización de superficies y utensilios.
- Control de contaminantes biológicos (microorganismos), físicos y químicos.

Factores del Círculo de Sinner en la industria alimentaria:

Factor	Ejemplo en la industria alimentaria
Temperatura	Uso de agua caliente (50–85 °C) para limpieza o desinfección térmica. En procesos CIP (Clean in Place) se usan temperaturas controladas.
Acción química	Uso de detergentes alcalinos, ácidos o enzimáticos y desinfectantes como hipoclorito, ácido peracético, amonios cuaternarios.
Acción mecánica	Presión del agua en boquillas, turbulencia en tanques, cepillado automático, limpieza por aspersion o chorros de agua (sistemas CIP/SIP).
Tiempo	Tiempo de contacto de detergentes y desinfectantes, tiempo de ciclo de limpieza, remojo o lavado.

Ejemplos de aplicación del Círculo de Sinner: Interacción de cuatro factores: Tiempo, temperatura, acción química y acción mecánica):

1) Lavado de vajilla en un restaurante industrial

- Temperatura: 60–70 °C en lavavajillas industrial.
- Acción química: Uso de detergente alcalino.
- Acción mecánica: Chorros de agua a presión.
- Tiempo: Ciclos de 2–5 minutos.

Si se reduce la temperatura para ahorrar energía, se puede aumentar el tiempo de lavado o usar un detergente más fuerte.

2) Limpieza de superficies en la industria alimentaria

- Temperatura: Agua caliente o a temperatura ambiente.
- Acción química: Desinfectantes como hipoclorito o ácido peracético.
- Acción mecánica: Cepillado, presión con máquinas o esponjas industriales.
- Tiempo: Depende del nivel de suciedad; puede ser de varios minutos.

Si hay acceso limitado a agua caliente, se aumenta el tiempo de contacto con el desinfectante.

3) Limpieza de un tanque de leche en una planta láctea (CIP)

- Temperatura: Agua a 60–80 °C para desinfección térmica.
- Acción química: Detergente cáustico seguido de ácido para eliminar residuos de proteínas y minerales.
- Acción mecánica: Aspersores rotativos internos que aplican presión.
- Tiempo: Cada fase dura varios minutos (prelavado, lavado cáustico, enjuague, lavado ácido, desinfección final).

Si baja la temperatura, puede compensarse con más detergente o mayor tiempo de acción.

III.-EXPLIQUE COMO APLICARÍA EL CÍRCULO DE SINNER EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE PRODUCTOS ALIMENTARIOS Y NO ALIMENTARIOS

La calidad e inocuidad de los productos alimentarios y no alimentarios son de vital importancia para la protección de la salud pública como también de una garantía de productos seguros al consumidor. Por lo que, en este contexto, los criterios microbiológicos se constituyen de una serie de herramientas esenciales que son necesarios para evaluar la aceptabilidad de materias primas, procesos de elaboración y productos culminados.

Estos criterios son definidos en función de la presencia, ausencia o concentración de determinados microorganismos presentes como también sus toxinas que se tiene que evitar en su gran mayoría, dichos criterios permiten establecer pautas de riesgo, orientar acciones correctivas y asegurar el cumplimiento de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Programas de Higiene y sistemas de gestión como HACCP.

Para productos alimentarios, los criterios que se definen son la aceptabilidad de materias primas, procesos y productos finales se usan límites cuantitativos y cualitativos. Su diseño considera factores como la epidemiología de enfermedades transmitidas por alimentos, las características intrínsecas del producto y las prácticas de manufactura.

Para productos no alimentarios, que cuentan con especificaciones diferentes, se mantiene el principio de prevenir riesgos microbiológicos mediante controles en diversas etapas productivas (verificación de sistemas preventivos, protección al consumidor, armonización regulatoria, etc.). La interpretación adecuada de dichos resultados microbiológicos requiere no solo de métodos analíticos estandarizados y validados, sino también de un informe de estandarización del cual se obtienen las muestras, como el tipo de producto (crudo o listo para consumo), condiciones de proceso, almacenamiento, distribución y características del consumidor objetivo.

Por lo tanto, en alimentos convencionales como en formulaciones innovadoras, el monitoreo microbiológico cobra gran importancia permitiendo validar la inocuidad y vida útil, cumpliendo con las normativas vigentes.

Los criterios microbiológicos son parámetros que están establecidos, los cuales nos van a permitir evaluar la calidad higiénico-sanitario de los productos alimentarios y también los no alimentarios, tienen como fin proteger la salud del consumidor y que se garantice la inocuidad en la producción, procesamiento, almacenamiento y comercialización. Es un componente esencial de los sistemas de gestión de inocuidad, como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP), el cual establece puntos críticos donde se deben aplicar medidas de control específicas para reducir o eliminar peligros microbiológicos (FAO/WHO, 2006).

La evaluación sistemática de estos criterios a lo largo de la cadena productiva va a ayudar a tomar decisiones informadas que influyen directamente sobre la calidad, seguridad y viabilidad comercial de los productos (ISO, 2020).

Además, consisten en la presencia, ausencia o número de microorganismos. Pueden ser patógenos los cuales causan enfermedades, o microorganismos indicadores los cuales evidencian fallas durante el proceso, o alterantes que afectan las propiedades sensoriales o tecnológicas del producto sin representar un riesgo sanitario directo, permitidos en una cantidad determinada de un producto, su aplicación va a permitir lo siguiente:

- 1) Verificar el cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura (MBP): En sí las MBP comprenden lo que es un conjunto de procedimientos que aseguran condiciones higiénicas adecuadas durante la producción, manipulación y almacenamiento. Un resultado microbiológico que exceda los límites establecidos puede revelar fallos en aspectos como la limpieza del equipo, la higiene del personal, el control ambiental o el manejo de materias primas.
- 2) Evaluar la eficacia de los procesos de conservación: se le cuenta como a la pasteurización, esterilización, refrigeración o en todo caso adición de conservantes. Puede que se encuentre o detecte microorganismos termorresistentes en un producto que ha sido sometido a pasteurización, esto nos indicará una falla térmica en el proceso, una contaminación o también puede haber presencia de esporas resistentes.
- 3) Toma de decisión respecto a la aceptabilidad o rechazo de un lote de productos: en el control de calidad de un alimento los resultados microbiológicos funcionan como criterio de corte; si en lote está dentro del rango permitido el lote será considerado aceptable, en cambio si los resultados superan el rango permitido se toman acciones correctivas en la procesamiento, volver a etiquetar o en peor de los casos destrucción del producto, todo va a depender del riesgo involucrado.
- 4) Garantizar que el producto sea seguro y apto para el consumo humano o algún uso industrial: la ausencia de patógenos y la limitación de microorganismos alterantes ayudan a eliminar o disminuir brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), alargar la vida útil del alimento, preservar su calidad organoléptica y mantener la confianza del consumidor.

Componentes de un criterio microbiológico:

- Microorganismo objetivo: Puede ser patógeno, indicador de higiene o alterante.

-Categoría del producto: Alimento o no alimento, en una etapa específica (procesamiento, almacenamiento o consumo).

-Límite microbiológico: Generalmente expresado como UFC/g (unidades formadoras de colonias por gramo), NMP/g (número más probable) o presencia/ausencia en una cantidad determinada de muestra

- Plan de muestreo: Incluye el número de muestras que se deben tomar (n), el número máximo permitido de muestras con resultados positivos (c), y los valores microbiológicos aceptables (m) y tolerables (M), especialmente en planes de muestreo de tres clases.

-Acción a tomar: Determina las medidas correctivas (rechazo del lote, reprocesamiento, etc.).

Criterios microbiológicos para la evaluación de la calidad de productos alimentarios

- Seguridad alimentaria: Diseñada para proteger la salud del consumidor y prevenir enfermedades transmitidas por alimentos, en este caso los microorganismos que se tienen en cuenta son: *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*.
- Higiene del proceso: verificación de la salubridad durante el procesamiento, producción y almacenamiento del producto. Se determina con la ayuda de indicadores como: *Escherichia coli* Aerobios mesófilos coliformes totales y fecales Enterobacterias
- Calidad microbiológica: se evalúa la vida útil del producto, se realiza especialmente en productos de fermentación o no esterilizados. Los microorganismos que intervienen son: Levaduras y mohos Bacterias lácticas, Psicrotrofos, *Bacillus spp*

Criterios microbiológicos para la evaluación de la calidad de productos no alimentarios

- Recuento microbiano total: Evaluación de la carga microbiana del producto. Se analiza la presencia de Bacterias aerobias mesófilas, Mohos y levaduras.
- Presencia de microorganismos patógenos: Entre ellos se controla comúnmente: *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella spp*.

Tipos de evaluación de la calidad de los productos

Las evaluaciones de calidad de un producto se refieren a la manera de revisar un producto y comprobar si este cumple con estándares o requisitos para establecer la garantía al consumidor, eficacia y aceptación de este.

- 1) Evaluación cualitativa: En este tipo de evaluación se utiliza para confirmar la ausencia o presencia de microorganismos patógenos en una muestra más no el conteo. Existen dos posibles resultados:
Están presentes: Los resultados después de hacer las pruebas a las muestras dan presencia de microorganismos, siendo indicadores en los alimentos.
No presentes: Este resultado no significa que no existan microorganismos patógenos, sino que no fueron detectados o la prueba que se realizó no detecta a estos microorganismos.
- 2) Evaluación cuantitativa: En esta evaluación se detectan microorganismos patógenos por lo cual se va a realizar un conteo de la cantidad de microorganismos que tiene ese alimento y si es seguro para el consumo humano.

En conclusión, los criterios microbiológicos son herramientas esenciales para evaluar la calidad y seguridad de los productos alimentarios y no alimentarios, permitiendo verificar la eficacia de los sistemas de higiene y los procesos de producción. Por lo que su aplicación, basada en análisis de riesgos, optimiza recursos y esfuerzos para ofrecer alimentos seguros al consumidor.

Una correcta aplicación de los criterios microbiológicos contribuye significativamente a la protección de la salud del consumidor, al establecer límites aceptables para microorganismos patógenos y sus toxinas en los alimentos, estos criterios se dividen en criterios de seguridad alimentaria y criterios de higiene del proceso.

La armonización de los criterios microbiológicos facilita el comercio internacional y asegura el cumplimiento de estándares de calidad, promoviendo la confianza del consumidor y la competitividad de la industria alimentaria, dicho cumplimiento de las normas microbiológicas evita crisis alimentarias y permite la exportación de productos alimenticios.

Los criterios microbiológicos son importantes, pero como no son suficientes por sí solos para garantizar la inocuidad de los alimentos, es necesario una implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y un sistema HACCP para un control integral de la calidad. El análisis microbiológico es una herramienta para mejorar la calidad de los alimentos y su procesamiento.

MUESTREO MICROBIOLÓGICO

Un muestreo microbiológico es el proceso de tomar y analizar muestras de un entorno, producto, superficie, agua, aire, alimentos, entre otros, con el fin de detectar, identificar y cuantificar microorganismos presentes (como bacterias, hongos, virus, levaduras, etc.).

Un plan de muestreo microbiológico es un conjunto estructurado de procedimientos que establece cómo, dónde, cuándo y cuántas muestras deben recolectarse con el propósito de detectar, identificar o cuantificar microorganismos en un producto, superficie, ambiente o sistema determinado. Este plan forma parte fundamental de los sistemas de control de calidad e inocuidad en diversas industrias, especialmente en la alimentaria, farmacéutica y ambiental.

El objetivo principal de este plan es obtener resultados confiables y representativos de la situación microbiológica de un entorno o producto, permitiendo tomar decisiones adecuadas en función de los riesgos identificados. Un plan bien diseñado considera varios aspectos esenciales: el tipo de muestra, el tamaño muestral, la frecuencia de muestreo, la técnica de recolección, los métodos analíticos y los criterios de aceptación o rechazo según normativas vigentes (ISO, 2017).

La selección de un plan de muestreo adecuado depende del propósito del análisis, la naturaleza del producto o matriz, el nivel de riesgo microbiológico, así como del cumplimiento de requisitos legales y reglamentarios. Por ejemplo, en alimentos listos para el consumo, se requieren planes más rigurosos por su alto riesgo para la salud del consumidor.

Además, los planes pueden ser cualitativos (presencia o ausencia de un microorganismo) o cuantitativos (recuento de unidades formadoras de colonias por gramo o centímetro cuadrado), y pueden aplicarse tanto a productos terminados como a materias primas, utensilios, equipos o ambientes.

Objetivos del Plan de Muestreo Microbiológico

- Clasificación de un lote como aceptable o no aceptable a partir del resultado de la inspección o análisis de una muestra.
- Tomar la decisión de aceptación o rechazo, basado en las características del plan de muestreo acordados de antemano.
- Evaluar la seguridad y calidad microbiológica de alimentos, agua, superficies u otros productos, identificando la presencia o concentración de microorganismos patógenos o indicadores

- Cumplir con normativas y criterios microbiológicos establecidos por organismos reguladores y estándares internacionales (codex Alimentarius, etc.)
- Proveer información relevante para la toma de decisiones en sistemas de gestión de inocuidad alimentaria (por ejemplo, HACCP).

ELEMENTOS FUNDAMENTALES DE UN PLAN DE MUESTREO

1. Definición del objetivo y alcance: Especificar el propósito del muestreo (por ejemplo, control de calidad, cumplimiento normativo, investigación de brotes, etc.) y el producto, proceso o sistema al que se aplica.
2. Selección del microorganismo o parámetro a analizar: Determinar qué microorganismos, toxinas o metabolitos se buscarán y por qué, considerando el riesgo sanitario y la relevancia para el producto.
3. Unidad de muestra y representatividad: Definir la unidad de muestra (por ejemplo, gramos, mililitros, piezas) y asegurar que las muestras sean representativas del lote o área a evaluar.
4. Número de muestras y tamaño de cada unidad (n): Establecer cuántas unidades se tomarán del lote y el tamaño mínimo de cada una, según el análisis a realizar y la heterogeneidad esperada.
5. Criterios de aceptación/rechazo (c, m, M): Definir:
 - n: número de unidades de muestra a analizar.
 - c: número máximo de unidades no conformes admitidas.
 - m: concentración máxima permitida para considerar una unidad como aceptable.
 - M: concentración máxima absoluta, por encima de la cual la unidad es inaceptable (en planes de tres clases).
6. Procedimiento de muestreo: Describir cómo, cuándo y dónde se tomarán las muestras, incluyendo puntos críticos del proceso, métodos de selección aleatoria y medidas para evitar contaminación cruzada.
7. Manipulación, conservación y transporte: Especificar las condiciones para la manipulación, conservación y transporte de las muestras hasta el laboratorio, para evitar alteraciones que afecten los resultados (por ejemplo, temperatura, tipo de envase, tiempo máximo de traslado).

8. Métodos analíticos: Seleccionar y documentar los métodos de análisis microbiológico a emplear, preferiblemente validados y reconocidos por organismos oficiales o normas internacionales.
9. Documentación y trazabilidad: Registrar toda la información relevante sobre la toma de muestras, condiciones, responsables, fechas, lotes y cualquier factor que pueda influir en la interpretación de los resultados.
10. Interpretación y medidas correctivas: Establecer los criterios para la interpretación de resultados y las acciones a tomar en caso de incumplimiento (rechazo del lote, investigación de causas, acciones correctivas, etc.).

MÉTODOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Según el tipo de muestra biológica y los objetivos específicos del análisis microbiológico, los especialistas de laboratorio pueden aplicar una variedad de métodos técnicos para obtener datos precisos sobre la composición microbiana de una muestra algunas de las técnicas más utilizadas son:

- 1) Cultivo microbiológico: Esta técnica tradicional implica la siembra de la muestra en un medio de cultivo específico que contiene los nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de ciertos microorganismos. Luego, se incuba a una temperatura controlada durante un tiempo determinado. El crecimiento de colonias microbianas permite a los profesionales identificar visualmente los tipos de microorganismos presentes, analizar sus características morfológicas y realizar pruebas bioquímicas para su clasificación.
- 2) Microscopía: Utilizando microscopios ópticos o electrónicos, los técnicos pueden observar directamente los microorganismos presentes en una muestra. Para mejorar la visibilidad y diferenciar tipos de bacterias, se emplean técnicas de tinción, siendo una de las más comunes la tinción de Gram. Esta permite distinguir entre bacterias Gram positivas y Gram negativas en función de las características de su pared celular.
- 3) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): La PCR es una técnica molecular avanzada que permite amplificar fragmentos específicos de ADN microbiano. Esto facilita la detección rápida, sensible y específica de microorganismos, incluso cuando están presentes en cantidades muy pequeñas. Es especialmente útil en diagnósticos clínicos y en el análisis de patógenos difíciles de cultivar.

4) Inmunoensayos: Estos métodos se basan en la interacción entre antígenos (moléculas presentes en los microorganismos) y anticuerpos específicos. A través de reacciones inmunológicas, como ELISA o inmunocromatografía, se puede detectar la presencia de microorganismos o la respuesta inmune del organismo frente a ellos. Son técnicas muy utilizadas por su rapidez y sensibilidad.

5) Espectrometría de masas: Esta tecnología moderna y altamente eficiente permite identificar microorganismos mediante el análisis de su perfil proteico. El procedimiento consiste en ionizar las proteínas presentes en una colonia microbiana y analizar su masa con gran precisión. La información obtenida se compara con una base de datos para determinar la especie del microorganismo en pocos minutos, lo que hace de esta técnica una herramienta ideal para laboratorios clínicos con alta carga de trabajo.

Los microorganismos que se pueden encontrar mediante un plan de muestreo microbiológico incluyen bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* patógena, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, y *Staphylococcus aureus*; además de levaduras, mohos, virus y parásitos. La presencia de estos microorganismos en los alimentos se debe a múltiples factores, como la contaminación cruzada durante su manipulación, condiciones higiénicas deficientes, almacenamiento inadecuado, materias primas contaminadas o procesos térmicos insuficientes.

El plan de muestreo permite establecer el número de unidades a inspeccionar, definir criterios de aceptación o rechazo del lote y asegurar que las muestras sean representativas y manejadas adecuadamente para evitar alteraciones que afecten los resultados. Además, contribuye a verificar el cumplimiento de normas y buenas prácticas de manufactura, así como a proteger a grupos vulnerables de consumidores.

Por ello, su importancia del plan de muestreo radica en su capacidad para identificar y restringir microorganismos dañinos que pueden estar presentes en los alimentos, garantizando su inocuidad y previniendo enfermedades transmitidas por estos (ETA). Estos planes se consideran componentes esenciales de los sistemas de seguridad alimentaria, y pese a que no garantizan una seguridad del 100%, contribuyen significativamente al bienestar de las personas.

El plan de muestreo microbiológico es clave para la seguridad alimentaria, detectando patógenos como *Salmonella* y *E. coli* derivados de la contaminación. Implementarlo previene enfermedades transmitidas por alimentos, protegiendo la salud pública, aunque no elimina todos los riesgos.

PRÁCTICA

PLAN DE MUESTREO MICROBIOLÓGICO

I.- OBJETIVO:

Los estudiantes adquieren habilidades y conocimientos aplicados para realizar correctamente el proceso de recolección, transporte y análisis de muestras destinadas a identificar y cuantificar microorganismos en diferentes alimentos.

II.- FUNDAMENTO TEÓRICO

Un plan de muestreo microbiológico se basa en principios científicos y normativos que aseguran que las muestras recolectadas representen adecuadamente la población microbiana de un entorno o producto, permitiendo realizar análisis fiables, reproducibles y válidos.

El muestreo microbiológico es el proceso sistemático de recolectar una o más porciones representativas de un material o superficie con el objetivo de detectar, identificar y cuantificar microorganismos presentes, tales como bacterias, hongos o virus.

El muestreo microbiológico es importante por lo siguiente:

- ✓ Permite evaluar la calidad microbiológica de productos, superficies, aire, agua, alimentos, entre otros.
- ✓ Sirve como base para la toma de decisiones en salud pública, inocuidad alimentaria, control ambiental y procesos industriales.
- ✓ Es fundamental para cumplir con normativas y estándares (como ISO, FDA, EPA, NOM, etc.).

Son principios básicos del muestreo

- Representatividad: La muestra debe reflejar con precisión las condiciones microbiológicas del lote, superficie o ambiente.
- Aleatoriedad: Minimiza el sesgo en la selección del sitio o muestra.
- Reproducibilidad: El procedimiento debe poder replicarse obteniendo resultados consistentes.
- Esterilidad y bioseguridad: Para evitar contaminaciones cruzadas y proteger al personal.
- Documentación y trazabilidad: Permite la verificación del proceso y seguimiento de resultados.

Los factores a considerar en un plan de muestreo son:

- Objetivo del muestreo: Detección de patógenos, verificación de limpieza, evaluación de calidad, etc.
- Tipo de muestra: Alimentos, agua, superficies, aire, productos farmacéuticos, etc.
- Técnica de muestreo: Hisopado, filtración, sedimentación, muestreo en placa, muestreo volumétrico, etc.
- Frecuencia de muestreo: Depende del riesgo, normativas, o procesos de control.
- Tamaño de muestra: Determinado estadísticamente o por normativa.
- Condiciones de transporte y conservación: Temperatura, tiempo y tipo de envase.
- Métodos analíticos posteriores: Cultivo, PCR, conteo en placa, etc.

PRÁCTICA

MICROORGANISMOS QUE CAUSAN RIESGO DIRECTO E INDIRECTO EN LA SALUD

I.- OBJETIVO:

Los estudiantes aplican técnicas de muestreo microbiológico para alimentos frescos, incluyendo la toma de muestra, diluciones seriadas y siembra en medios de cultivo, para evaluar la carga microbiana e identificar microorganismos patógenos.

II.-FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos son organismos microscópicos que incluyen bacterias, virus, hongos, protozoos y algunos parásitos. Si bien muchos de ellos son inofensivos o incluso beneficiosos, algunos pueden representar un riesgo para la salud humana, ya sea de forma directa o indirecta, al provocar infecciones, enfermedades, o facilitar condiciones propicias para otros patógenos.

El riesgo directo se refiere al daño que un microorganismo puede causar al infectar directamente al ser humano. Este tipo de microorganismos son conocidos como patógenos y pueden invadir tejidos, liberar toxinas o desencadenar respuestas inmunológicas peligrosas.

El riesgo indirecto se refiere a microorganismos que no causan enfermedad directamente, pero que:

1. Contaminan alimentos, agua, superficies u objetos, facilitando la transmisión de enfermedades.
2. Alteran el equilibrio del microbioma, permitiendo que patógenos prosperen.
3. Afectan a personas inmunocomprometidas, actuando como patógenos oportunistas.

III.-MATERIALES NECESARIOS

- Muestras de alimentos frescos (ej. tomate, fresa, lechuga, cilantro, manzana, etc.)
- Bolsas estériles o frascos con tapa
- Solución salina estéril (0.85%) o agua peptonada
- Pipetas estériles.
- Tubos de ensayo estériles para diluciones (con 4.5mL de solución salina)
- Placas Petri con medios de cultivo:
 - Agar Nutritivo (para aerobios mesófilos)
 - Agar MacConkey (para coliformes)
 - Agar PDA (para hongos y levaduras)
- Incubadora (a 35–37 °C y 25 °C)
- Rotuladores, etiquetas

IV.-PROCEDIMIENTO

1. Preparación de la muestra:
 - Seleccionar un alimento fresco sin lavar.
 - Tomar aproximadamente 25 g del alimento (porción representativa).
2. Colocar en bolsa estéril y añadir 225 mL de solución salina estéril (dilución 10^{-1}). Homogeneizar durante 1 minuto. (manual, licuadora o stomacher) y continuar con las diluciones hasta 10^{-3}
3. Siembra:
 - Tomar 0.1 mL de cada dilución y sembrar en agar nutritivo por la técnica de incorporación

- Sembrar por estría en el agar MacConkey y PDA para identificar diferentes grupos microbianos.
- 4. Incubación:
 - Incubar placas:
 - A 35–37 °C por 24-48 h para bacterias mesófilas y coliformes.
 - A 25 °C por 3-5 días para mohos y levaduras en PDA.
- 5. Análisis de resultados:
 - Contar UFC (unidades formadoras de colonias) en las placas con crecimiento.
 - Calcular UFC/g según la dilución.
 - Describir morfología de colonias.

V.- RESULTADOS

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VI.- CONCLUSIONES

.....

.....

.....

.....

.....

.....

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

.....

.....

.....

.....

PRINCIPIOS DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA (BPM)

Las BPM son un conjunto de normas y procedimientos que garantizan la inocuidad, calidad y trazabilidad de los productos alimentarios durante su fabricación.

El objetivo principal es proteger la salud del consumidor y asegurar productos consistentes y seguros.

Se aplica en todas las etapas de producción, desde la recepción de materias primas hasta el despacho del producto final.

PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DE LAS BPM

a. Higiene y sanidad (personal e instalaciones)

- Instalaciones adecuadas: pisos, paredes, techos fáciles de limpiar.
- Higiene personal: uso de ropa protectora, lavado de manos, prohibición de fumar, comer o portar objetos contaminantes.
- Control de plagas: programas de monitoreo y eliminación.

b. Limpieza y desinfección

- Procedimientos documentados.
- Uso de detergentes y desinfectantes aprobados.
- Frecuencia de limpieza establecida.



c. Manejo de materias primas y productos

- Recepción y almacenamiento adecuados.
- Identificación y trazabilidad.
- Control de temperaturas.



d. Control de procesos

- Control de parámetros críticos (tiempo, temperatura, pH, etc.).
- Prevención de contaminaciones cruzadas.



e. Documentación y registros

- Manuales y procedimientos escritos.
- Registros de limpieza, producción, mantenimiento, capacitación.
- Facilitan auditorías y trazabilidad.

Datos de la empresa CONTROL DE TRAZABILIDAD					
Fecha y hora	Alimento o producto con inconformidad	Características	Proveedores o clientes relacionados	Medidas correctivas	Responsable

f. Capacitación del personal

- Entrenamiento continuo en BPM.
- Concientización sobre la importancia de la inocuidad.



IMPORTANCIA DE LAS BPM EN LA INDUSTRIA AGROINDUSTRIAL

- Prevención de riesgos para la salud pública.
- Cumplimiento normativo (ej. normas nacionales, Codex Alimentarius).
- Mejora de la calidad del producto.
- Acceso a mercados internacionales.

PRÁCTICA

APLICACIÓN DE BUENAS PRÁCTICAS DE MANUFACTURA

I.- OBJETIVO GENERAL:

Aplicar los principios básicos de las Buenas Prácticas de Manufactura en una simulación de procesamiento de alimentos, con énfasis en la higiene, seguridad y documentación.

Objetivos Específicos:

1. Identificar los requisitos fundamentales de las BPM en un entorno de procesamiento agroindustrial.
2. Ejecutar procedimientos de limpieza y desinfección del área de trabajo y utensilios.
3. Aplicar normas de higiene personal y control de contaminación cruzada.
4. Elaborar registros básicos de control como parte de la documentación requerida en BPM.

II.-FUNDAMENTO TEÓRICO

III.-MATERIALES Y EQUIPOS

- Mesas de trabajo
- Lavamanos con jabón y papel toalla
- Termómetro
- Balanza digital
- Registro de BPM (formato impreso)

- Alcohol al 70%
- Solución desinfectante (cloro o amonio cuaternario)
- Guantes, mandiles, cofia y mascarilla
- Alimento simple para simular procesamiento (ej. jugo, ensalada de frutas o yogurt)
- Etiquetas para trazabilidad

IV.-PROCEDIMIENTO

4.1.-Elaboración de Yogurt:

Muestra: Cultivos lácticos. Insumos: Leche fresca o leche en polvo o leche UHT

Materiales:

- Probeta de 100 ml.
- Matraz de 1 L.
- Vaso de precipitación 500 ml.
- Tazón grande de aluminio
- Cuchara grande
- Cucharón pequeño

- Colador
- Embudo
- Mecheros
- Bolsas plásticas 3x8 mm

Equipos

-Baño maría a 85°C

PROCEDIMIENTO:

Activación del cultivo:

- 1) Medir un litro de leche fresca o 130g. de leche en polvo disuelta en 1 litro de agua hervida fría.
- 2) Calentar la leche a 85°C por 30 min. y luego retirar la nata. Dejar enfriar.
- 3) Agregar el sobre del cultivo láctico y mezclar suavemente (no burbujas).
- 4) Dividir en partes y colocar en recipientes pequeños o bolsitas plásticas de primer uso y congelar hasta su utilización. Antes de utilizarlo en la preparación del yogurt descongelar las bolsitas a temperatura ambiente.

Nota:

El sobre de cultivo láctico es para 100 litros de yogurt. Por lo tanto, si preparamos un litro de inóculo, este rendirá 100 litros de yogurt.

Se sugiere preparar inóculos de 50ml. para 5 litros de yogurt (proporción de 10ml. de inóculo para 1lt. De yogurt).

Elaboración del Yogurt

- 1) Calentar la leche a 62°C y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- 2) Agregar el inóculo e incubar a 42°C a 45°C por 4h a 6h.
- 3) Batir el yogurt. Agregar el colorante y saborizante (puede agregar almíbar de frutas).
- 4) Refrigerar por 2h.

Nota: El yogurt preparado no tiene conservantes.

4.2.-Elaboración de Vino:

Muestra: Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* y Frutos maduros de *Vitis vinefera* "Uva"

Insumos: -Azúcar comercial, -Bisulfito de sodio, -Sulfato de amonio.

Materiales:

- 1 probeta de 500 ml.
- 3 matraz de 1 L.
- 1 densímetro
- 3 tazones grandes
- 3 coladores
- 3 embudos
- 1 m. de tocuyo
- 1m. de gasa

- 3 mecheros
- 1 balde con tapa de 5 litros
- 75 cm. de manguera delgada 5mm (o tubo de látex)
- Botellas de 750ml. estériles

Equipos

- Baño maría
- Balanza digital

PROCEDIMIENTO:

- 1) Pesar la uva y luego lavar. Despalillar y eliminar los granos que se encuentran en malas condiciones. Nuevamente lavar los granos de uva.
- 2) Estrujar los granos de uva hasta que toda la pulpa sea desagregada y obtener el mosto.
- 3) Filtrar el mosto y separar las pepas y los hollejos. Luego medir el volumen y colocar en el recipiente de fermentación (lavado e higienizado).
- 4) Suplementar:
- 5) Adicionar bisulfito de sodio (antiséptico para la flora nativa y acompañante). Alternativamente el mosto puede ser higienizado por pasteurización a 87°C por 2 minutos y enfriando rápido a 15°C.
- 6) Adicionar hollejos de uva.
- 7) Adicionar azúcar.
- 8) Adición de fuente nitrogenada (sulfato de amonio, para el proceso de fermentación de las levaduras).
- 9) Adicionar el inóculo con *Saccharomyces cerevisiae*
- 10) Cerrar herméticamente el recipiente y en el centro de la tapa colocar 75 cm. de manguera (para permitir la salida del CO₂). El dispositivo de salida del CO₂ puede sumergirse en una solución de cloruro de sodio saturada. La velocidad de burbujeo es un indicador de la velocidad de fermentación. El proceso debe monitorearse cada 24 horas, durante 5 a 8 días.
- 11) Alcanzado el grado alcohólico y la concentración de azúcares residuales, deseados, se eliminan los hollejos y el vino joven es vertido en las botellas de vidrio estériles.
- 12) Pasteurización: Las botellas con el vino joven son colocados en baño maría y sometidas a tratamiento térmico. La pasteurización se realiza a 65°C por 30 minutos.
- 13) Culminada la pasteurización se inicia el proceso de sedimentación y posteriormente el trasiego.
- 14) Pasteurizar nuevamente las botellas y colocar el corcho para sellar la tapa.

4.3.- Análisis microbiológico del vino y yogurt:

Se realizará la determinación de bacterias coliformes totales por el método del Número Más Probable (TNMP).

Se preparará Caldo Brila y se analizará una muestra de yogurt y otra muestra de vino para determinar la presencia de bacterias coliformes totales.

Se realizará recuento de microorganismos en agar nutritivo mediante la técnica de incorporación.

V.- RESULTADOS

VI.- CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS: ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

Actividad 1: Inducción y revisión de higiene personal

- Uso correcto de mandil, guantes, mascarilla, cofia (gorro).
- Lavado de manos según BPM
- Toma de temperatura corporal

Actividad 2: Preparación del área de trabajo

- Limpieza y desinfección de mesas, utensilios y superficies.
- Verificación visual y sensorial.

Actividad 3: Simulación del proceso de elaboración de un alimento

- Selección y verificación de materias primas.
- Preparación del alimento siguiendo normas de inocuidad.
- Empacado y etiquetado simulado con información básica (fecha, lote, responsable).

Actividad 4: Documentación y control

- Llenado de formatos:
 - Lista de verificación de higiene personal
 - Registro de limpieza
 - Control de temperatura
 - Bitácora de producción

Cuestionario Post-Práctica (para discusión o informe)

1. ¿Qué errores de higiene se pudieron observar o evitar durante la práctica?
2. ¿Qué importancia tiene la documentación en un sistema de BPM?
3. ¿Cómo se asegura la trazabilidad en un proceso agroindustrial?
4. ¿Qué cambios aplicarías si esta fuera una producción real?

Normas de Referencia

- Codex Alimentarius: Recomendaciones generales de higiene.
- Decreto Supremo N° 007-98-SA – Reglamento sobre vigilancia y control sanitario de alimentos y bebidas (Perú).
- ISO 22000 e ISO 9001 como referencias complementarias.

MÉTODOS DE ANÁLISIS APLICADOS A LA MICROBIOLOGÍA

La ingeniería agroindustrial se erige como una disciplina fundamental en la salvaguarda de la calidad y seguridad de los alimentos y productos derivados, desde su origen en el campo hasta la mesa del consumidor. En este vasto y complejo ámbito, la microbiología ocupa un lugar central, ya que los microorganismos, sean benéficos o perjudiciales, ejercen una influencia determinante sobre la vida útil, las propiedades organolépticas y, crucialmente, la inocuidad de estos bienes. La presencia de patógenos, el deterioro por acción microbiana o la necesidad de optimizar procesos fermentativos son solo algunas de las razones que subrayan la indispensable aplicación de métodos de análisis microbiológico rigurosos y precisos.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Es un conjunto de técnicas que permiten identificar y cuantificar microorganismos en diferentes muestras. Se lleva a cabo para evaluar la presencia de bacterias, virus, hongos y parásitos, lo que ayuda a prevenir enfermedades y garantizar la calidad de los productos.

En el caso de la industria alimentaria, son esenciales para evitar el deterioro y garantizar la calidad de los productos. Dicho de otro modo, permiten valorar la carga microbiana, identificar y restringir los microorganismos dañinos que puedan deteriorar los alimentos y garantizar la seguridad frente a las ETA.

Según Hernández & Giles (2021), el análisis microbiológico de un alimento se realiza principalmente por tres razones:

- Realizar el control de la calidad y determinar la vida de anaquel.
- Verificar las técnicas de manipulación y producción higiénica
- Sospechar de intoxicaciones o infecciones a través de alimentos.

FUNDAMENTOS Y MÉTODOS CLÁSICOS DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

El análisis microbiológico se cimienta sobre principios esenciales que permiten la detección, identificación, enumeración y caracterización de microorganismos. Estos fundamentos son universales y han sido la base de la microbiología desde sus inicios.

Esterilización y Asepsia

Es el proceso de eliminar o destruir todas las formas de vida microbiana, incluyendo esporas. La asepsia se refiere a las prácticas que previenen la contaminación con microorganismos no deseados. Son cruciales para asegurar que los resultados de un análisis provengan únicamente de los microorganismos de interés y no de contaminantes ambientales o del material.

Preparación de Medios de Cultivo

Los microorganismos requieren nutrientes específicos y condiciones ambientales como temperatura, pH, humedad y atmósfera para crecer y multiplicarse. Los medios de cultivo proporcionan estos requisitos. Pueden ser líquidos (caldos) o sólidos (agares) y se formulan para ser selectivos, favorecen el crecimiento de algunos y suprimen otros microorganismos o diferenciales que permiten distinguir entre diferentes microorganismos.

Aislamiento y Cultivo de Microorganismos

A partir de una muestra compleja (que contiene muchos tipos de microorganismos), es necesario separar y obtener colonias puras de un solo tipo de microorganismo para su estudio detallado. Esto se logra mediante técnicas de siembra como la siembra por estría, siembra por vertido en placa o siembra por extensión.

Recuento y Cuantificación

Determina el número de microorganismos viables (Unidades Formadoras de Colonias, UFC) o el número total de células en una muestra. Métodos clásicos incluyen el recuento en placa (siembra por vertido o extensión) y el método del Número Más Probable (NMP).

Identificación y Caracterización

Una vez aislados, los microorganismos se identifican basándose en sus características morfológicas (observación microscópica, tinción de Gram), fisiológicas y bioquímicas (pruebas enzimáticas, fermentación de azúcares, etc.), y en algunos casos, propiedades genéticas (aunque los métodos genéticos son más modernos, las pruebas bioquímicas siguen siendo un fundamento).

Microscopía

El uso del microscopio para visualizar los microorganismos, determinar su morfología (forma, tamaño, agrupación) y la respuesta a tinciones (ej., tinción de Gram). Es una herramienta fundamental para la observación directa de los microorganismos, proporcionando información inicial crucial para su clasificación e identificación.

Métodos Clásicos de Análisis Microbiológico

Recuento en Placa

Se basa en la dilución seriada de la muestra y la siembra de alícuotas en medios de cultivo sólidos (agar). Tras la incubación, cada microorganismo viable, forma una unidad formadora de colonias (UFC) visible que se puede contar.

Siembra por Vertido:

La muestra diluida se mezcla con agar fundido y se vierte en una placa de Petri. Las colonias crecen tanto en la superficie como dentro del agar.

Siembra por Extensión:

Una alícuota de la muestra diluida se extiende sobre la superficie de un agar solidificado. Las colonias crecen solo en la superficie.

Método del Número Más Probable

Es un método estadístico que se utiliza para estimar la concentración de microorganismos en muestras líquidas, especialmente cuando la carga microbiana es baja o los microorganismos están dispersos, haciendo inviable el recuento en placa. Se basa en la inoculación de diluciones seriadas de la muestra en múltiples tubos con caldo de cultivo. El número de tubos positivos

(con crecimiento microbiano) en cada dilución se utiliza para calcular el NMP a partir de tablas estadísticas. Comúnmente empleado para el análisis de coliformes y *E. coli* en agua y algunos alimentos.

Examen Microscópico y Tinciones

Tinción Gram:

Una de las tinciones diferenciales más importantes. Clasifica las bacterias en Gram positivas (color violeta) y Gram negativas (color rosa/rojo) basándose en las propiedades de su pared celular. También revela la morfología (cocos, bacilos, espirilos) y la disposición de las células.

Tinción de Ziehl-Neelsen

Utilizada para la identificación de bacterias ácido-alcohol resistentes como las micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis*)

Tinciones simples:

Utilizan un solo colorante para observar la forma y el tamaño general de los microorganismos.

Pruebas Bioquímicas

Se basan en la capacidad de los microorganismos para producir enzimas específicas o metabolizar ciertos sustratos, lo que resulta en cambios de color, producción de gases, o cambios de pH. Estas reacciones son características de diferentes especies o géneros bacterianos y permiten su identificación a nivel taxonómico.

MÉTODOS RÁPIDOS Y BIOQUÍMICOS DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Pruebas bioquímicas

La exposición de los microorganismos a diferentes sustratos o indicadores que cambian de color o producen un producto detectable si el microorganismo posee la enzima o la vía metabólica necesaria.

Principalmente son utilizados los kits comerciales de sistemas miniaturizados y automatizados. Los más destacables en la actualidad son los sistemas API (Analytical Profile Index), Biolog o Vitek, que son paneles de pocillos o microtubos que contienen una variedad de sustratos bioquímicos deshidratados.

Una vez inoculados con microorganismos, los pozos incuban y, mediante cambios de color o turbidez, se genera un perfil numérico que se compara con bases de datos para identificar la especie bacteriana con precisión.

Métodos inmunológicos

Estos métodos aprovechan la capacidad de los anticuerpos para unirse de forma específica a antígenos (proteínas o estructuras moleculares únicas) presentes en los microorganismos.

Destacan dos principales:

1) Enzimo-inmunoanálisis (ELISA)

Este es uno de los métodos inmunológicos más versátiles y ampliamente utilizados. Se basa en el uso de anticuerpos marcados con enzimas que, al reaccionar con un sustrato, producen un cambio de color detectable.

Desempeñan un papel crucial en la producción de alimentos al proporcionar una detección rápida y precisa de alérgenos y micotoxinas, así como también la detección de patógenos como *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*.

2) Pruebas de aglutinación

Cuando los anticuerpos se unen a antígenos en células microbianas, provocan la formación de agregados visibles. Este principio se aplica en pruebas para identificar serotipos de bacterias, siendo la prueba de aglutinación de látex la más común en la industria alimentaria.

Kits rápidos (Lateral Flow Immunoassays)

Son las típicas "tiras reactivas", donde la muestra migra a través de una tira que contiene anticuerpos inmovilizados. Si el antígeno está presente, se une a los anticuerpos y genera una línea visible.

Otros métodos de detección rápida

Existen otras técnicas que monitorean la actividad microbiana de forma acelerada, a menudo en tiempo real.

- **Detección por impedancia y conductimetría**
Los microorganismos producen iones al crecer y metabolizar nutrientes, lo que altera la conductividad eléctrica del medio de cultivo. Sistemas automatizados monitorean estos cambios, permitiendo detectar y cuantificar el crecimiento microbiano más rápidamente que los métodos tradicionales de cultivo.
- **Turbidimetría y detección óptica**
A medida que los microorganismos crecen en un medio líquido, la turbidez aumenta. Equipos ópticos pueden medir este aumento continuamente, correlacionando la velocidad de turbidez con la concentración inicial de microorganismos, lo que permite estimar la carga microbiana o detectar el crecimiento.
- **Bioluminiscencia (ATP)**
Esta técnica detecta el Adenosín Trifosfato (ATP), la molécula de energía en todas las células vivas. Utiliza la enzima luciferasa, que, al interactuar con ATP, emite luz. La luz producida es proporcional a la cantidad de ATP, lo que indica el nivel de biomasa microbiana o residuos orgánicos.

MÉTODOS MOLECULARES AVANZADOS

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Variantes

La PCR es una técnica que permite la amplificación específica de fragmentos de ADN, lo que facilita la detección de microorganismos incluso en bajas concentraciones

Secuenciación de ADN

Permite analizar genomas completos o regiones específicas, facilitando la identificación precisa de especies, el estudio de la diversidad microbiana y la detección de genes de resistencia.

Hibridación de Sondas y FISH

La hibridación de sondas de ADN o ARN permite la detección de secuencias específica en muestras biológicas.

Espectrometría de Masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas MALDI-TOF identifica microorganismos mediante el análisis de su perfil proteico. Es una herramienta rápida y precisa, ampliamente utilizada en laboratorios clínicos para la identificación bacteriana y fúngica.

Aplicaciones de los métodos moleculares avanzados

- Diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas. Vigilancia y control de brotes epidemiológicos.
- Detección de genes de resistencia antimicrobiana.
- Estudios de diversidad y dinámica microbiana en ambientes clínicos y ambientales

PRÁCTICA

MÉTODO DE CONTEO DIRECTO E INDIRECTO DE MICROORGANISMOS

I.-OBJETIVO

- Realizar el conteo directo e indirecto de microorganismos de piel y músculo de pescado que se expende en los mercados de la ciudad de Chachapoyas.

II.- FUNDAMENTO TEÓRICO

III.-MUESTRA, MEDIOS DE CULTIVO, MATERIALES Y EQUIPOS

Muestras:

- 10 g. de piel de pescado
- 10 g. músculo de pescado

Medios de Cultivo:

- Agar PCA o Agar nutritivo

Materiales:

- Plumón marcador
- 16 tubos de ensayo 13x100mm., con 9ml. de agua destilada estéril
- 2 gradillas
- 2 vasos de precipitación de 250ml (estéril)
- 8 placas petri (vacías) estériles
- 10 pipetas de 1ml. estériles
- 3 mecheros de alcohol

Equipos:

- Incubadora a 37°C

IV.-PROCEDIMIENTO:

Utilizar piel y músculo de pescado y realizar diluciones hasta 10^{-8} . Sembrar por la técnica “siembra por incorporación” en agar PCA o gar nutritivo las diluciones 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} . Incubar a 37°C por 24h a 48h. Realizar el recuento microbiano.

Utilizar la piel y músculo de pescado y realizar diluciones 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} . Sembrar en caldo BRILA. Incubar a 37°C por 24h a 48h. Realizar el recuento utilizando la tabla del número más probable.

V.-RESULTADOS

VI.-CONCLUSIONES

VII.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SIEMBRA POR INCORPORACIÓN

Esta técnica tiene la ventaja de permitir el cálculo del número de bacterias presentes en la muestra, si se trabaja con exactitud.

Se realizan diluciones seriadas de la muestra y se coloca en placas petri estériles, por separado, el mismo volumen en cada una. Luego se vierte el medio de cultivo fundido y a una temperatura aproximada de 45°C.

El contenido se homogeneiza por rotación suave, se dejan enfriar las placas hasta que se solidifique el medio y posteriormente se incuban a la temperatura adecuada (siempre en posición invertida).

*La rotación de las placas permite que los microorganismos se distribuyan homogéneamente en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar.

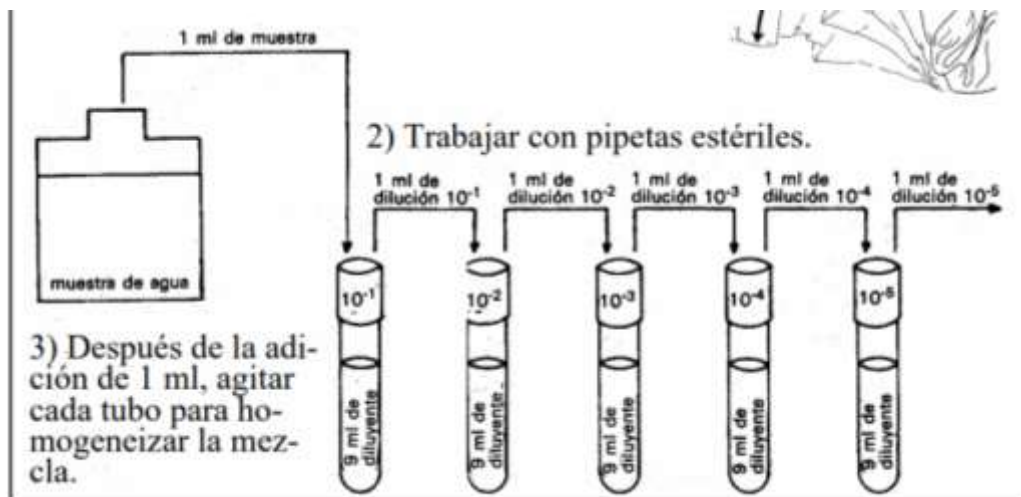


TECNICA DE SIEMBRA POR EL NÚMERO MÁS PROBABLE

La técnica de Número más probable o también llamada técnica de dilución en tubo, proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente en donde los límites de confianza (Bajo y Alto) son valores que no se suman ni restan al resultado, solamente son un dato de Calidad.

El método del número más probable (NMP) se aplica para recuento de coliformes, coliformes fecales y de cepas gasógenas (aerógenas) de *Escherichia coli*.

El método requiere la realización de una serie de diluciones en serie de la muestra de cultivo, en un medio líquido adecuado para el crecimiento de dicho organismo de un volumen diez veces mayor. Luego, se incuban las muestras de esos tubos y, pasado un tiempo, se examinan los tubos.



La lectura se realiza en la tabla del Número Más Probable teniendo en cuenta los tubos gas positivo (presencia de gas en las campanas Durham)



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

El aislamiento e identificación de microorganismos permiten estudiar con detalle organismos presentes en mezclas complejas, obteniendo cultivos puros para un análisis preciso.

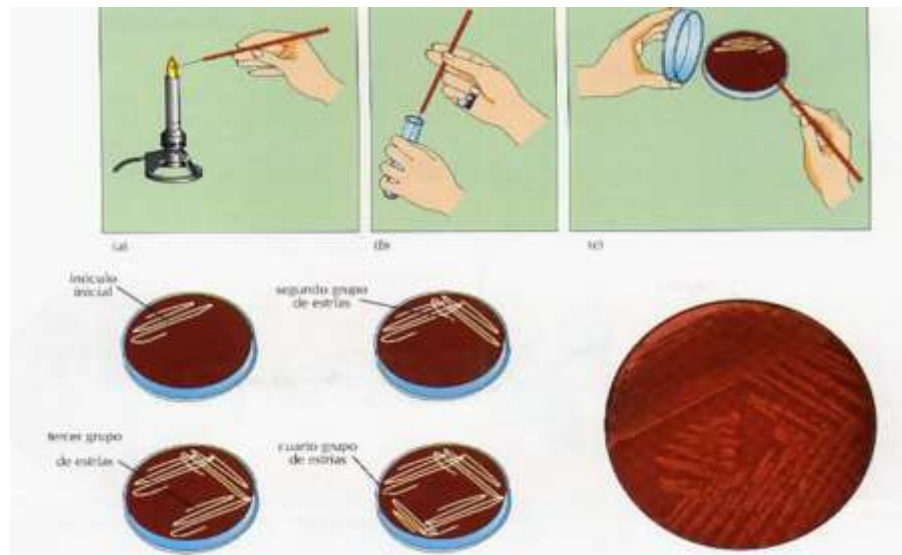
La identificación se basa en pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, como la fermentación de azúcares y la producción de enzimas, que diferencian especies bacterianas.

Además, las técnicas inmunológicas, como los ensayos serológicos y la inmunofluorescencia, identifican microorganismos mediante la interacción específica entre antígenos y anticuerpos.

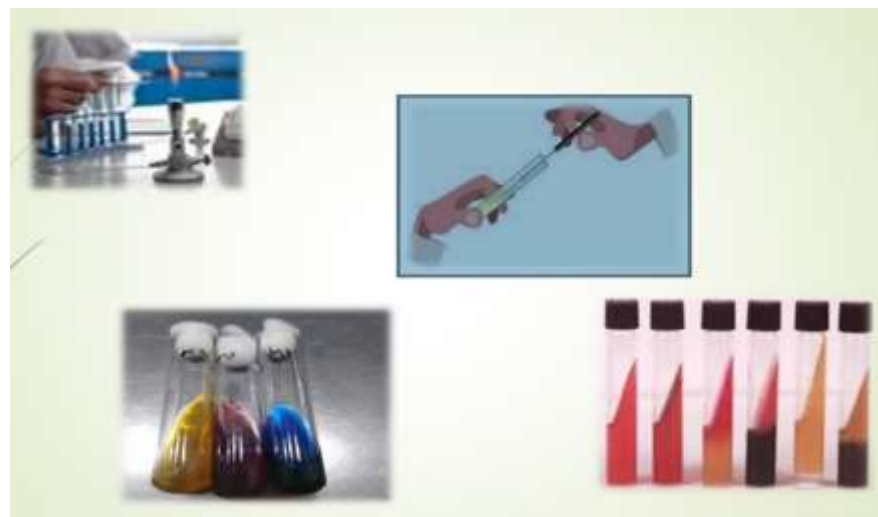
Finalmente, los métodos genéticos, como el uso de sondas de ADN y la PCR, permiten una identificación rápida y precisa a nivel molecular, aunque requieren equipamiento especializado.

TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

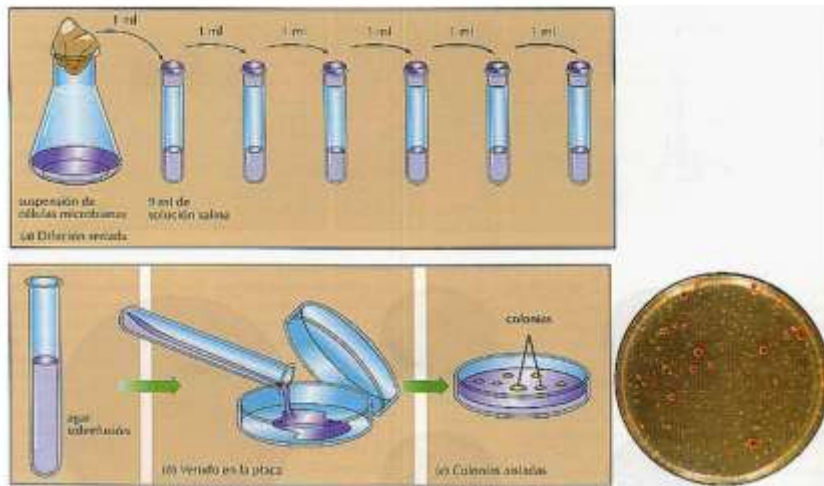
SIEMBRA POR ESTRÍA



SIEMBRA POR PUNTURA



SIEMBRA POR INCORPORACIÓN



SIEMBRA POR DISEMINACIÓN



TÉCNICAS BIOQUÍMICAS, INMUNOLÓGICAS, INMOVILIZACIÓN Y GENÉTICAS

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

Las pruebas bioquímicas son esenciales en microbiología para identificar microorganismos después de su aislamiento en cultivos. Este proceso permite separar especies y obtener colonias puras para análisis detallados.

Su función principal es detectar actividades metabólicas específicas, la presencia de enzimas o la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos.

Pruebas Enzimáticas y de Fermentación

- Fermentación de Azúcares: Detecta la capacidad de fermentar carbohidratos (como glucosa o lactosa) mediante cambios de color en medios con azúcares específicos e indicadores de pH.
- Hidrólisis del Hipurato: Identifica bacterias como *Campylobacter jejuni* por su capacidad de hidrolizar hipurato sódico, usando reveladores específicos.
- β -galactosidase: Evalúa la producción de esta enzima, crucial para fermentar lactosa, utilizando sustratos cromogénicos (como ONPG) que cambian de color.

Enzimas Clave para la Identificación Bacteriana

Aminopeptidasa (PYR): Detección de pirrolidonil peptidasa, útil para identificar *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus* spp., y diferenciar *Staphylococcus lugdunensis* de otros estafilococos coagulasa negativa.

LAP (Leucina Aminopeptidasa: Detecta la enzima leucina amino peptidasa, para identificar cocos gram negativos, catalasa negativa, y diferenciar géneros como *Aerococcus* y *Leuconostoc* de *Streptococcus* y *Enterococcus*.

Indol (IDOL): Determina la capacidad de producir indol a partir de triptófano. Un anillo rojo con caldo triptófano y reactivo de Kovacs indica un resultado positivo.

Pruebas Enzimáticas y de Fermentación

Catalasa: Enzima presente en la mayoría de microorganismos con citocromos, utilizada para separar *Micrococcaceae* (positiva) de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. (negativa).

Oxidasa: Determina la presencia de enzimas oxidasas, crucial para la identificación de ciertos grupos bacterianos.

Ureasa: Determina la capacidad de un organismo para desdoblar la urea en amoníaco. Útil para diferenciar *Moraxella* spp., *Helicobacter pylori* y *Brucella* spp., y para identificar *Cryptococcus* spp.

Reducción de Nitratos, Hidrólisis de Gelatina, Almidón y Caseína: Utilizan medios específicos y reactivos de detección (sulfanilamida, ácido α -naftilamina, polvo de zinc, solución de yodo) para observar la actividad enzimática.

TÉCNICAS INMUNOLÓGICAS

Las técnicas inmunológicas son herramientas para la detección rápida y precisa de microorganismos, tanto patógenos como benéficos, en alimentos y otros productos agroindustriales. Estas técnicas se basan en la interacción específica entre antígenos y anticuerpos, permitiendo identificar y cuantificar microorganismos de interés.

Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA):

Es una técnica ampliamente utilizada para detectar patógenos en alimentos y muestras ambientales. Permite la detección de antígenos microbianos mediante la unión de anticuerpos específicos y la posterior señalización con enzimas.

Determinación de Ag por ELISA

La modalidad más frecuente del método ELISA para la determinación de Ags es el modelo ELISA "Sandwich" directo. En este modelo, el Ac específico para el Ag de interés, se encuentra absorbido en un soporte sólido (placa de Petri), sobre el que se añadirá la muestra biológica. En el caso de que en dicha muestra se encuentre el Ag, quedará capturado en la placa y será puesto en evidencia tras la adición de otro Ac específico conjugado con la enzima. Por último, se añade el sustrato, sustrato incoloro, que por acción de la enzima, dará un producto coloreado que producirá un color observable a simple vista y cuantificable mediante un espectrofotómetro.

Determinación de Acs por ELISA

Para la determinación de Acs específicos para un determinado Ag se utiliza normalmente la modalidad de ELISA indirecto en donde el Ag de interés se encuentra absorbido en la placa de ELISA. Se pueden utilizar como antígenos, proteínas virales o bacterianas e incluso virus completos, pero cada día es más frecuente absorber exclusivamente las proteínas de interés inmunológico.

Inmunofluorescencia:

Se utiliza para visualizar la presencia de microorganismos específicos en muestras mediante la unión de anticuerpos fluorescentes. La inmunofluorescencia directa utiliza anticuerpos marcados con fluorocromos, mientras que la indirecta utiliza un segundo anticuerpo que se une al primero, amplificando la señal.

- **Inmunofluorescencia Directa (IFD):**
Utiliza un solo anticuerpo ligado a un fluorocromo que reconoce y se une directamente a la molécula diana. Es más rápida, con menos etapas, y menos susceptible a interferencias, pero puede ser menos sensible.
- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):**
Usa dos anticuerpos; uno primario que reconoce la molécula diana y uno secundario marcado con fluorocromo que reconoce al primario. Es más complejo, con más pasos, pero más sensible y flexible por su capacidad de amplificación.

Aglutinación:

Las reacciones de aglutinación ocurren cuando un antígeno (Ag) y un anticuerpo (Ac) se unen para formar agregados visibles, como grumos. Generalmente se usan en cantidades iguales de ambos reactivos. La diferencia principal con la precipitación es que, en esta última, el antígeno es soluble, mientras que en la aglutinación el antígeno es particulado, aunque también pueden usarse antígenos solubles adheridos a partículas como látex.

Estas reacciones son fáciles, rápidas y no necesitan equipo especializado, y tienen mayor sensibilidad que las de precipitación. Sin embargo, son menos sensibles que técnicas más avanzadas como ELISA o inmunofluorescencia y pueden ser afectadas por factores físicos y químicos.

- Aglutinación por método del látex

Está basado en la prueba de aglutinación. Los anticuerpos son adheridos a partículas de látex. Al enfrentarse el látex sensibilizado con el Ag específico se produce la agregación entre estas esferas y los antígenos. Este método ha sido usado principalmente en bacteriología y en virología.

Western Blot (Inmunotransferencia):

Western blot es una técnica de laboratorio utilizada para detectar una proteína específica en una muestra de sangre o tejido. El método implica el uso de electroforesis en gel para separar las proteínas de la muestra. Las proteínas separadas se transfieren del gel a la superficie de una membrana. La membrana se expone a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio. La unión del anticuerpo se detecta usando un marcador radiactivo o químico. Un Western Blot se utiliza a veces para diagnosticar enfermedades.

TECNICAS DE INMUNO INMOVILIZACION

Las técnicas de inmuno-inmovilización es un método que utiliza anticuerpos inmovilizados para detectar y/o purificar antígenos específicos que implica la fijación de anticuerpos a una fase sólida, como placas, membranas o microesferas, para luego ser utilizados en interacciones con antígenos.

MÉTODOS

- Adsorción pasiva: Este método de inmovilización del anticuerpo por adsorción pasiva es la comúnmente utilizada en los inmunoensayos de uso más extendido como los ELISAs. Este método destaca por su simplicidad y bajo costo.
- Inmovilización Covalente: La inmovilización covalente ofrece una unión más fuerte, ya que la unión más fuerte que existe en la naturaleza es el enlace covalente, proporcionando uniones estables y duraderas.
- Inmovilización Orientada mediante Proteínas Mediadoras: Existen técnicas orientadas que emplean proteínas mediadoras, como la proteína A o G, que permiten una unión orientada del anticuerpo al unirse específicamente a la región constante (Fc) del mismo, de forma que la región variable de unión al antígeno (Fab) queda accesible para la unión antígeno-anticuerpo

TÉCNICAS GENÉTICAS

Las técnicas genéticas en microbiología son herramientas fundamentales que permiten estudiar la diversidad, evolución, fisiología, patogenicidad y aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos.

Estas técnicas han revolucionado el campo de la microbiología, ofreciendo una comprensión profunda de la información hereditaria de las bacterias, arqueas, hongos y protozoos.

Algunas de las técnicas genéticas más importantes son:

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y sus variantes:

PCR convencional: Permite amplificar de forma exponencial una secuencia específica de ADN a partir de una muestra. Es ampliamente utilizada para la detección cualitativa de microorganismos patógenos.

RT-PCR (PCR con Transcriptasa Inversa): Se utiliza para amplificar secuencias de ARN, como las de algunos virus, convirtiéndolas primero en ADN complementario (ADNc).

PCR en tiempo real (qPCR o RT-qPCR): Permite cuantificar la cantidad inicial de ADN o ARN en una muestra, detectando la acumulación de producto amplificado en tiempo real mediante fluorocromos. Es crucial para el diagnóstico y seguimiento de infecciones.

PCR digital (dPCR): Una técnica más reciente que proporciona una cuantificación absoluta de ácidos nucleicos, dividiendo la muestra en miles de reacciones individuales.

PCR multiplex: Permite amplificar simultáneamente múltiples secuencias de ADN en una sola reacción, útil para detectar varios patógenos a la vez o para identificar diferentes genes de resistencia.

Secuenciación del Genoma:

Secuenciación Sanger: Fue la primera técnica de secuenciación a gran escala y sigue siendo útil para secuencias cortas y confirmaciones.

Secuenciación de Nueva Generación (NGS) o Secuenciación Masiva en Paralelo (MPS): Ha transformado la microbiología, permitiendo secuenciar genomas completos de microorganismos a una velocidad y costo sin precedentes. Esto tiene aplicaciones en:

- **Identificación de especies:** Determinación precisa de la identidad de un microorganismo.
- **Tipificación molecular:** Diferenciación de cepas dentro de una misma especie para estudios epidemiológicos.
- **Estudio de la resistencia a antibióticos:** Identificación de genes de resistencia y mutaciones asociadas.
- **Vigilancia epidemiológica:** Seguimiento de la dispersión de patógenos y brotes.

- Metagenómica: Análisis del ADN de comunidades microbianas directamente de una muestra ambiental o clínica, sin necesidad de cultivo.

Hibridación de Ácidos Nucleicos:

Southern Blot: Detecta secuencias específicas de ADN en una muestra.

Northern Blot: Similar al Southern Blot, pero detecta secuencias de ARN.

Microarrays o microarreglos de ADN: Permiten analizar simultáneamente la expresión de miles de genes o la presencia de múltiples secuencias de ADN en una sola plataforma. Se utilizan para la detección de patógenos, el estudio de perfiles de expresión génica y la identificación de factores de virulencia.

Hibridación in situ con fluorescencia (FISH): Utiliza sondas fluorescentes para detectar secuencias específicas de ADN o ARN directamente en células intactas, permitiendo la visualización de microorganismos o genes dentro de una muestra.

CONCLUSIÓN

- El aislamiento e identificación de microorganismos es esencial para conocer su naturaleza, función y posible impacto. Estas técnicas permiten detectarlos y clasificarlos con precisión, siendo fundamentales en áreas como la salud, la industria y la investigación científica.
- Las técnicas bioquímicas son fundamentales para identificar microorganismos patógenos tras su aislamiento en medios de cultivo, detectando actividades metabólicas y enzimáticas específicas. Estas incluyen pruebas de fermentación de azúcares, hidrólisis de compuestos y detección de enzimas como catalasa o β -galactosidasa, usando sustratos y reactivos específicos. Su aplicación permite diferenciar especies y garantizar la seguridad alimentaria.
- Las técnicas inmunológicas son herramientas fundamentales en la biología y la medicina para detectar, identificar y cuantificar antígenos y anticuerpos con alta especificidad y sensibilidad. Desde métodos simples como la aglutinación, que ofrecen rapidez y facilidad, hasta técnicas avanzadas como ELISA e inmunofluorescencia, que proporcionan una mayor sensibilidad y precisión, estas metodologías permiten un amplio rango de aplicaciones clínicas, diagnósticas e investigativas.
- La elección de una técnica adecuada depende de la naturaleza del análisis, la sensibilidad requerida y los recursos disponibles, pero en conjunto, estas técnicas han revolucionado la detección de patógenos, la evaluación de respuestas inmunitarias y el desarrollo de tratamientos, confirmando su importancia en la ciencia y la salud.
- Las técnicas genéticas han transformado radicalmente el campo de la microbiología, evolucionando de ser herramientas experimentales a convertirse en pilares fundamentales para la investigación, el diagnóstico y la aplicación biotecnológica. Su impacto es vasto y multifacético, permitiéndonos no solo identificar y clasificar

microorganismos con una precisión sin precedentes, sino también desentrañar sus mecanismos más íntimos de funcionamiento, patogenicidad y adaptación.

- Las técnicas de inmuno inmovilización son herramientas de vital importancia en la biotecnología y la inmunología, ya que nos permiten la fijación estable y específica de anticuerpos para aplicaciones analíticas y purificadoras. Entre los diversos métodos, la adsorción pasiva, la inmovilización covalente y la inmovilización orientada mediante proteínas mediadoras ofrecen alternativas adaptables según la aplicación requerida.

PRÁCTICA

TÉCNICAS BIOQUÍMICAS, INMUNOLÓGICAS, INMUNOMOVILIZACIÓN Y GENÉTICAS

I.-OBJETIVO

Realizar técnicas bioquímicas para identificación de microorganismos utilizando colonias microbianas aisladas de muestras de alimentos.

II.-FUNDAMENTO TEÓRICO

III.-PROCEDIMIENTO

Elija una colonia microbiana y realice las siguientes pruebas bioquímicas:

- Pruebas TSI, LIA, Citrato
- Prueba de catalasa
- Prueba oxidasa
- Prueba de Indol
- Prueba Voges Proskauer

IV.-RESULTADOS

V.-CONCLUSIONES

VI.-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Técnicas Bioquímicas para Identificación de Microorganismos

Estas técnicas se basan en el perfil metabólico de los microorganismos, aprovechando sus capacidades para fermentar azúcares, producir enzimas, degradar compuestos, entre otros.

1. Pruebas Bioquímicas Clásicas (Manual o Automatizado)

Pruebas individuales comunes:

Prueba	Detecta	Resultado positivo
Catalasa	Enzima catalasa (convierte H_2O_2 en $H_2O + O_2$)	Burbujeo
Oxidasa	Enzima citocromo c oxidasa	Color púrpura
Indol	Producción de indol a partir de triptófano	Capa roja con reactivo de Kovacs
Rojo de metilo (MR)	Producción de ácido mixto en fermentación	Cambio a rojo intenso
VP (Voges-Proskauer)	Producción de acetoina	Color rojo tras reactivo
Citrato	Uso de citrato como única fuente de carbono	Medio cambia a azul
Ureasa	Hidrólisis de urea → amoníaco	Color rosa intenso
TSI (Triple Sugar Iron)	Fermentación de glucosa, lactosa/sacarosa, producción de H_2S	Colores y precipitados
LIA (Lysine Iron Agar)	Descarboxilación y desaminación de lisina	Cambio de color, H_2S
Fermentación de azúcares	Capacidad de fermentar diferentes azúcares	Ácido/gas (cambio de color, burbujas)

2. Sistemas Automatizados (Paneles Múltiples)

Estos sistemas permiten una identificación rápida y automatizada, basándose en perfiles bioquímicos:

- API (Analytical Profile Index) – BioMérieux
 - Paneles de microtubos con diferentes sustratos.
 - Se comparan resultados con base de datos.
- VITEK 2 – BioMérieux
 - Identificación automatizada y pruebas de sensibilidad.
- MicroScan – Beckman Coulter
- BD Phoenix™ – Becton Dickinson

3. Medios Selectivos y Diferenciales (semi-bioquímicos)

Aunque no son “pruebas bioquímicas” en sí, ayudan en la identificación por reacciones visibles:

- MacConkey: distingue fermentadores de lactosa (color rosado) en enterobacterias.
- Agar EMB: *E. coli* produce colonias con brillo metálico.
- Agar XLD: para *Salmonella* y *Shigella*.
- Agar MSA (Mannitol Salt Agar): para *Staphylococcus* spp., diferencia *S. aureus* (fermenta manitol, medio amarillo).

4. Identificación Basada en Enzimas o Substratos Específicos

- Pruebas con aminoácidos: descarboxilación o desaminación.
- Pruebas de deshidrogenasas, proteasas, lipasas.
- Uso de sustratos cromogénicos para leer resultados fácilmente.

Ejemplo: Identificación de *Escherichia coli*

Prueba	Resultado
Lactosa (MacConkey)	+ (colonias rosadas)
Indol	+
Citrato	-
Rojo de metilo	+
VP	-
Ureasa	-
TSI	Ácido/ácido, gas, sin H ₂ S

Técnicas moleculares o espectrométricas modernas

Aunque no son puramente bioquímicas, hoy en día se usan como apoyo:

- MALDI-TOF MS (espectrometría de masas de ionización por láser) – identificación rápida por perfiles de proteínas.
- PCR y secuenciación genética – para identificación precisa.

Técnicas Inmunológicas para Identificación de Microorganismos

Se basan en la **reacción antígeno-anticuerpo**, que es **altamente específica**. Estas técnicas permiten detectar:

- Microorganismos completos (bacterias, virus, hongos, parásitos)
- Antígenos microbianos (componentes de la pared celular, toxinas, cápsulas, etc.)
- Anticuerpos generados por el huésped frente al microorganismo

1. Aglutinación

Tipos:

- **Agglutinación directa:** el anticuerpo se une al antígeno en la superficie del microorganismo → formación de agregados visibles.
- **Agglutinación pasiva (indirecta):** el antígeno o anticuerpo está unido a partículas (látex, eritrocitos).

Ejemplos:

- **Prueba de Widal:** detección de anticuerpos contra *Salmonella typhi*.
- **Agglutinación en látex:** detección rápida de *Streptococcus pneumoniae*, *Cryptococcus neoformans*, etc.

2. Inmunofluorescencia (IF)

- Usa **anticuerpos marcados con fluorocromos** (como fluoresceína).
- Puede ser:
 - **Directa**: el anticuerpo marcado se une directamente al antígeno del patógeno.
 - **Indirecta**: un anticuerpo secundario marcado se une al primario.

Ejemplos:

- Detección de *Chlamydia trachomatis*, *Legionella pneumophila* o virus respiratorios en muestras clínicas.
- Visualización mediante microscopio de fluorescencia.

3. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

- Detección cuantitativa de **antígenos microbianos o anticuerpos** específicos en suero o fluidos.

Tipos comunes:

- **ELISA directa o indirecta** (detección de antígenos o anticuerpos)
- **Sandwich ELISA** (altamente sensible)

Ejemplos:

- VIH, hepatitis B y C, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*.

4. Western Blot

- Separación de proteínas microbianas por electroforesis → transferencia a membrana → detección con anticuerpos.
- Es una técnica **confirmatoria**.

Ejemplo:

- Confirmación de VIH y enfermedad de Lyme.

5. Inmunocromatografía (Pruebas Rápidas)

- Basadas en flujo lateral (tipo “test de embarazo”).
- Simples, rápidas y no requieren equipamiento especializado.

Ejemplos:

- Pruebas rápidas para SARS-CoV-2, Influenza, VIH, *Streptococcus pyogenes*, dengue, malaria.

6. Inmunodifusión e Inmunoelectroforesis

- Detección de anticuerpos o antígenos en gel de agar.
- Menos utilizadas actualmente por ser menos sensibles y más lentas.

Ventaja	Limitación
Alta especificidad y sensibilidad	Pueden requerir equipo especializado
Resultados rápidos (minutos a horas)	Algunas pruebas no distinguen infección activa/pasada
Útiles incluso si el microorganismo no crece en cultivo	Requieren antígenos/anticuerpos bien caracterizados

Técnicas de Inmovilización para Identificación de Microorganismos

El término “**inmovilización**” puede referirse a distintos contextos, por lo que vamos a aclarar primero a qué te podrías estar refiriendo.

Hay dos posibles enfoques principales:

1. Inmovilización inmunológica (prueba de inmovilización de anticuerpos):
 - Usada para identificar microorganismos móviles (especialmente protozoos y bacterias móviles) mediante la inhibición de su motilidad por anticuerpos específicos.
2. Inmovilización física (encapsulamiento o fijación de microorganismos o enzimas):
 - Técnica más común en biotecnología o biosensores, pero también útil en ciertos sistemas de diagnóstico microbiano.

1. Prueba de Inmovilización por Anticuerpos (contexto inmunológico)

- Se mezclan microorganismos **móviles** (como *Treponema pallidum*, *Leptospira*, protozoos) con **suero que contiene anticuerpos específicos**.
- Si el suero contiene los **anticuerpos adecuados**, estos se **unen a los flagelos o a la superficie** del microorganismo y **bloquean su movimiento**.

Aplicaciones:

- Diagnóstico de:
 - **Sífilis** (prueba de inmovilización del *T. pallidum* o TPI)
 - **Leptospirosis**
 - Algunas infecciones por protozoos

Interpretación:

- **Inmovilización = reacción positiva**, indica presencia de anticuerpos específicos → infección actual o pasada.

2. Técnicas de Inmovilización Física de Microorganismos

Más empleadas en:

- **Biosensores microbianos**
- **Detección automatizada**
- **Fermentación y biocatálisis**

Métodos de inmovilización:

Método	Descripción	Aplicación posible
Encapsulamiento en gel (p. ej. alginato de calcio)	Microorganismos quedan atrapados en una matriz porosa	Puede usarse en biosensores o sistemas de detección
Adsorción en superficies sólidas	Adhesión física a materiales (vidrio, polímeros, carbón activado)	Estabilidad de biopelículas o chips microbianos
Entrampamiento en membranas	Uso de membranas semipermeables	Bioteología, biocaptura
Enlace covalente	Unión química a un soporte	Alta estabilidad, menor viabilidad microbiana

No es una técnica directa de identificación, pero puede integrarse en sistemas de biosensores que detectan compuestos producidos por microorganismos inmovilizados **o la** interacción con sustratos específicos.

Conclusión

Técnica	Tipo	Uso en identificación
Inmovilización por anticuerpos	Inmunológica	Sí (detecta anticuerpos específicos frente a microorganismos móviles)
Inmovilización física (biotecnología)	Biofísica	Indirecto (detección de metabolitos o actividad microbiana en sensores)

Técnicas Genéticas para Identificación de Microorganismos

Las técnicas genéticas (o moleculares) han revolucionado la identificación de microorganismos por su alta sensibilidad, especificidad y rapidez, especialmente cuando los métodos tradicionales (como cultivos) son lentos o poco concluyentes.

Se basan en la detección, amplificación o secuenciación del material genético (ADN/ARN) de bacterias, virus, hongos o parásitos.

1. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Amplifica regiones específicas de ADN microbiano (como genes 16S rRNA en bacterias).

Variantes:

Tipo de PCR	Aplicación
Convencional	Identificación general
PCR en tiempo real (qPCR)	Cuantificación del ADN (carga viral, por ejemplo)
PCR múltiple	Detecta varios patógenos a la vez
RT-PCR	Conversión de ARN a ADNc (usado para virus de ARN como SARS-CoV-2)

Ejemplos:

- Identificación de *Mycobacterium tuberculosis*
- Virus del papiloma humano (VPH)
- *Salmonella*, *Listeria*, *E. coli* enterohemorrágica

2. Secuenciación del ADN

a) Secuenciación del gen 16S rRNA (bacterias) / 18S rRNA (hongos y eucariotas)

- Amplía y analiza genes altamente conservados pero con regiones variables.
- **Altamente precisa** para clasificación hasta género o especie.

b) Secuenciación masiva (NGS – Next Generation Sequencing)

- Permite identificar **todas las especies presentes** en una muestra (microbioma).
- Muy útil en muestras clínicas, ambientales o sin cultivo.

c) Metagenómica

- Secuenciación directa de todo el ADN microbiano de una muestra.
- Identificación de especies incluso **no cultivables**.

3. Hibridación de Ácidos Nucleicos

Técnicas:

- **FISH (Fluorescence In Situ Hybridization):** Usa sondas fluorescentes que se unen a secuencias específicas de ARN/ADN en microorganismos → se observa bajo microscopio.
- **Microarrays de ADN:** Chip con miles de sondas de ADN que detectan múltiples genes microbianos al mismo tiempo.

4. Electroforesis de Fragmentos de Restricción (RFLP, PFGE)

- **RFLP:** Compara patrones de corte de ADN por enzimas de restricción.
- **PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis):** Separación de fragmentos grandes → útil en estudios epidemiológicos (brotes).

5. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)

- Técnica de amplificación genética **más rápida y simple que la PCR.**
- No requiere termociclador.
- Usada en kits portátiles para Zika, COVID-19, *Salmonella*, etc.

Comparación Resumida

Técnica	Aplicación	Ventajas	Limitaciones
PCR / qPCR	Amplificación y detección de ADN	Muy sensible y rápida	Requiere primers específicos
Secuenciación (16S, NGS)	Identificación general y completa	Muy precisa, detecta no cultivables	Costosa, requiere análisis bioinformático
FISH	Identificación directa en tejido/células	Visual y específica	Requiere microscopía especializada
Microarrays	Detección masiva de genes	Multiplexado	Costo y complejidad
LAMP	Diagnóstico rápido in situ	No requiere termociclador	Menor versatilidad que PCR

PRUEBA DE LA CATALASA

La prueba de la catalasa detecta la presencia de la enzima **catalasa**, que descompone el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en **agua (H_2O)** y **oxígeno (O_2)**. La **Catalasa** está presente en muchas bacterias aerobias y facultativas.

Materiales necesarios:

- Cultivo bacteriano (24 h, preferiblemente en agar sin sangre)
- Peróxido de hidrógeno al **3%**
- Portaobjetos limpio o tubo de ensayo
- Asa bacteriológica o palillo de madera estéril
- Gasa o papel absorbente (opcional, para seguridad)

Método 1: Sobre portaobjetos (rápido)

1. Coloca una gota de **H_2O_2 al 3%** en un portaobjetos limpio.
2. Usa una **asa o palillo de madera** para tomar una colonia del cultivo (NO usar palillos metálicos → falsos positivos).
3. Mezcla la colonia con la gota de H_2O_2 .
4. Observa inmediatamente.

Método 2: En tubo de ensayo (menos común)

1. Coloca 1-2 mL de H_2O_2 en un tubo.
2. Añade la muestra bacteriana con un asa estéril.
3. Observa formación de burbujas.

Interpretación de resultados

Resultado	Observación	Interpretación
Positivo	Formación inmediata de burbujas (O_2)	La bacteria produce catalasa
Negativo	No se forman burbujas	La bacteria no produce catalasa

Ejemplos

Microorganismo	Resultado
Staphylococcus spp.	<input checked="" type="checkbox"/> Positivo
Streptococcus spp.	<input checked="" type="checkbox"/> Negativo
Bacillus spp.	<input checked="" type="checkbox"/> Positivo
Clostridium spp.	<input checked="" type="checkbox"/> Negativo (aunque variable)

Precauciones

- NO usar cultivos de **agar sangre** → los eritrocitos contienen catalasa → falso positivo.
- Usa solo peróxido recién preparado (H_2O_2 pierde potencia con el tiempo).
- Ten cuidado con las salpicaduras de H_2O_2 (puede irritar piel/ojos).

PRUEBA DE LA OXIDASA

La prueba de la oxidasa es una prueba bioquímica rápida y útil para identificar bacterias que producen la enzima citocromo c oxidasa, la cual participa en la cadena respiratoria de transporte de electrones.

La prueba de la oxidasa detecta la presencia de la enzima citocromo c oxidasa, que oxida un reactivo específico (generalmente tetrametil-p-fenilendiamina), provocando un cambio de color.

Materiales necesarios

- Cultivo bacteriano fresco (18–24 h)
- Reactivo de oxidasa (disco comercial o solución recién preparada): Tetrametil-p-fenilendiamina (al 1%)
- Palillo de madera estéril o asa plástica (no metálica)
- Papel filtro o disco impregnado con reactivo (opcional)
- Guantes y gafas de seguridad

Procedimientos

1. Método del disco oxidasa (más común y seguro):

1. Toma un **disco comercial oxidasa** (ya impregnado con el reactivo).
2. Con un palillo de madera estéril, toma una pequeña muestra del cultivo bacteriano.
3. Frota la muestra sobre el disco.
4. Observa el **cambio de color dentro de los primeros 10 segundos**.

2. Método del papel filtro:

1. Coloca un trozo de **papel filtro** sobre una placa o superficie estéril.
2. Añade una o dos gotas del **reactivo oxidasa fresco (1% tetrametil-p-fenilendiamina)** al papel.
3. Usa un palillo para transferir una colonia bacteriana al área con reactivo.
4. Observa el color en **10–30 segundos**.

Interpretación de resultados

Resultado	Observación	Interpretación
Positivo	Cambio a violeta o púrpura oscuro en ≤ 10 segundos	La bacteria produce citocromo c oxidasa
Negativo	No hay cambio o aparece después de 30 segundos	La bacteria no produce la enzima

Ejemplos

Microorganismo	Resultado oxidasa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	☑ Positivo
<i>Neisseria spp.</i>	☑ Positivo
<i>Vibrio cholerae</i>	☑ Positivo
<i>Escherichia coli</i>	☒ Negativo
<i>Salmonella spp.</i>	☒ Negativo
<i>Shigella spp.</i>	☒ Negativo

Precauciones importantes

- El reactivo se **oxida rápidamente al aire**, debe prepararse fresco y mantenerse protegido de la luz.
- **NO usar asas metálicas calientes** (pueden dar falsos positivos).
- El resultado debe leerse **dentro de los primeros 10–30 segundos**.
- No usar cultivos viejos (pueden perder actividad enzimática).

PRUEBA DE INDOL

La prueba de indol es una prueba bioquímica clásica usada para identificar bacterias capaces de degradar el aminoácido triptófano mediante la enzima triptofanasa, produciendo indol como producto.

Es especialmente útil para distinguir entre miembros de la familia Enterobacteriaceae, como *Escherichia coli* (indol +) y *Enterobacter spp.* (indol -).

La prueba indol detecta la presencia de indol en el medio, producido por la acción de la triptofanasa **sobre** triptófano.

Materiales necesarios

- Caldo de triptófano (u otro medio con triptófano, como SIM)
- Cultivo bacteriano puro (incubado 24–48 h a 35–37 °C)
- Reactivo de Kovacs (o Ehrlich, según el método)
- Tubos de ensayo
- Asa bacteriológica estéril
- Guantes, gafas de protección

Procedimiento

1. Siembra la bacteria en un tubo con caldo triptófano o medio SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad).
2. Incuba a 35–37 °C durante 24 a 48 horas.
3. Añade cuidadosamente 5 gotas de reactivo de Kovacs al tubo sin agitar.
4. Espera unos segundos y observa la formación de color en la capa superior.

Interpretación de resultados

Resultado	Observación	Interpretación
Positivo	Capa superior rojo cereza o rosado	La bacteria produce indol
Negativo	No hay cambio, o capa amarilla	No hay producción de indol

Ejemplos

Microorganismo	Resultado
<i>Escherichia coli</i>	☑ Positivo
<i>Proteus vulgaris</i>	☑ Positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	☒ Negativo
<i>Enterobacter cloacae</i>	☒ Negativo

Microorganismo	Resultado
<i>Salmonella spp.</i>	✗ Negativo
<i>Shigella spp.</i>	Variable (+/-)

Precauciones

- El reactivo de Kovacs es tóxico e inflamable → usar en campana o con ventilación.
- No agitar el tubo después de añadir el reactivo.
- Usar cultivos de 24–48 h, no más viejos (pueden dar falsos negativos).
- No usar medios que contengan azúcares o colorantes que interfieran con la observación.

PRUEBA ROJO DE METILO

La prueba del Rojo de Metilo (MR) es una de las pruebas bioquímicas del grupo IMViC (Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer, Citrato), muy útil para la identificación y diferenciación de enterobacterias, especialmente entre *Escherichia coli* y *Enterobacter spp.*

La prueba Rojo de Metilo detecta la capacidad de algunos microorganismos para realizar fermentación mixta, produciendo grandes cantidades de ácidos estables (ácido láctico, fórmico, acético, succínico), que bajan el pH del medio por debajo de 4.4.

El indicador rojo de metilo cambia de color según el pH:

- **Rojo** a pH ácido (< 4.4)
- **Amarillo** a pH básico (> 6.0)

Materiales

- Medio de MR-VP (glucosa en peptona-buffer)
- Cultivo bacteriano puro
- Reactivo rojo de metilo (al 0.04% en etanol)
- Tubos de ensayo
- Asa bacteriológica estéril
- Agitador (opcional)
- Guantes, gafas de protección

Procedimiento

1. Inocular un tubo con medio MR-VP con la bacteria en estudio.
2. Incubar a 35–37 °C durante 48 horas (mínimo 24 h).
3. Tras incubación, añadir 5 gotas de rojo de metilo directamente al tubo.
4. Agitar ligeramente si es necesario.
5. Observar el cambio de color en los siguientes 5 minutos.

Interpretación

Resultado	Observación	Interpretación
☑ Positivo	El medio se vuelve rojo intenso	Fermentación mixta → producción de ácidos estables
☒ Negativo	Medio permanece amarillo o anaranjado	Producción de ácidos neutros (pH más alto)

Ejemplos

Microorganismo	Resultado MR
<i>Escherichia coli</i>	☑ Positivo
<i>Salmonella spp.</i>	☑ Positivo
<i>Proteus spp.</i>	☑ Positivo
<i>Enterobacter cloacae</i>	☒ Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	☒ Negativo

Precauciones

- El rojo de metilo puede manchar, usar guantes y gafas.
- No interpretar colores intermedios (naranja) como positivos; repetir prueba o extender incubación.
- No confundir esta prueba con la Voges-Proskauer (VP) que se hace en el mismo medio, pero mide producción de acetoinas.

PRUEBA VOGES PROSKAUER (VP)

La prueba de Voges-Proskauer (VP) es otra de las pruebas bioquímicas del grupo IMViC (Indol, Rojo de Metilo, VP, Citrato), utilizada para diferenciar bacterias enterobacterias según el tipo de fermentación que realizan.

La prueba VP detecta la capacidad de algunos microorganismos para fermentar glucosa mediante la vía butilenglicólica, produciendo ácido acético y acetoinas (especialmente acetilmetilcarbinol, también llamada acetoin), que es un producto neutro.

El reactivo VP oxida la acetoin a diacetilo, que en presencia de guanidina del medio produce un color rosado/rojizo.

Materiales

- Medio **MR-VP** (el mismo que para la prueba del Rojo de Metilo)
- Cultivo bacteriano (24–48 h a 35–37 °C)
- **Reactivos de VP:**
 - **Reactivo A:** α -naftol al 5% en etanol
 - **Reactivo B:** KOH al 40% (hidróxido de potasio)
- Tubos de ensayo
- Asa bacteriológica estéril
- Agitador o vortex
- Guantes y gafas de protección

Procedimiento

1. Inocular el medio **MR-VP** con la bacteria a estudiar.
2. Incubar a **35–37 °C por 24–48 horas**.
3. Después de la incubación, **tomar 1 mL** del cultivo e introducirlo en un tubo limpio (puedes usar el mismo si es necesario).
4. Añadir:
 - **15 gotas de reactivo A (α -naftol)**
 - **5 gotas de reactivo B (KOH)**
5. Agitar vigorosamente durante 30 segundos (uso de vortex recomendado).
6. Dejar reposar el tubo en posición vertical.
7. Observar el color durante **15 a 60 minutos**.

Interpretación

Resultado	Observación	Interpretación
<input checked="" type="checkbox"/> Positivo	Desarrollo de un color rosado o rojo cereza en la capa superior	El microorganismo produce acetoin (fermentación butilenglicólica)
<input type="checkbox"/> Negativo	El medio permanece amarillo o cobre	No se produce acetoin; no usa esa vía de fermentación

Ejemplos

Microorganismo	Resultado VP
<i>Enterobacter cloacae</i>	☑ Positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	☑ Positivo
<i>Escherichia coli</i>	☒ Negativo
<i>Proteus vulgaris</i>	☒ Negativo
<i>Salmonella spp.</i>	☒ Negativo

Precauciones

- La reacción puede tardar hasta 1 hora, pero no debe leerse antes de 15 minutos.
- El orden de adición de reactivos es importante: primero α -naftol, luego KOH.
- Agitar bien tras añadir los reactivos: el oxígeno favorece la formación de diacetilo.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS

I.-OBJETIVO

- Realizar la interpretación de los resultados de diferentes pruebas de laboratorio.

II.-Interprete y analice los siguientes recuentos bacterianos:

En una muestra de jugo después de realizar un análisis microbiano se encontró el crecimiento de 147 colonias en toda la placa eso significa que:

Se utilizó como medio de cultivo:

.....

La técnica de siembra fue:

.....

Por mililitro hay (recuento):

.....

Respecto al alimento se puede decir que:

.....

.....

.....

.....

.....

En una muestra de leche después de realizar un análisis microbiano se encontró el crecimiento de 117 colonias en toda la placa eso significa que:

Se utilizó como medio de cultivo:

.....

La técnica de siembra fue:

.....

Por mililitro hay (recuento):

.....

Respecto al alimento se puede decir que:

.....

.....

.....

.....

.....

III.- Interprete y analice las siguientes pruebas bioquímicas:

Una muestra de queso se sembró en agar Mac Conkey y se crecieron colonias transparentes, éstas se sembraron en agar TSI, LIA y Citrato. En agar TSI se observa el tubo rojo en la parte inclinada y amarillo en la base. En agar LIA se ve todo el tubo color violeta y en el centro del tubo una mancha negra. El tubo con agar citrato de observa de color azul. Eso significa que:

Las colonias en agar Mac Conkey (con respecto a la lactosa) son:

La lectura en TSI es:

La Lectura en Agar LIA es:

La Lectura en agar citrato es:

La especie o genero del microorganismo es:

Respecto al alimento se puede decir que:

.....

.....

.....

.....

Una muestra de verduras se sembró en agar Mac Conkey y se crecieron colonias rosadas, éstas se sembraron en agar TSI, LIA y Citrato. En agar TSI se observa el tubo amarillo con burbujas de gas. En agar LIA se ve todo el tubo color violeta. El tubo con agar citrato de observa de color verde. Eso significa que:

Las colonias en agar Mac Conkey (con respecto a la lactosa) son:

La lectura en TSI es:

La lectura en Agar LIA es:

La lectura en agar citrato es:

La especie o genero del microorganismo es:

Respecto al alimento se puede decir que:

.....

.....

.....

.....

ANEXOS

INHIBIDORES DEL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS

Cuando cultivamos hongos (levaduras o mohos), especialmente en medios como agar Sabouraud, es común agregar inhibidores para evitar el crecimiento de bacterias, en especial Gram negativas, y facilitar el aislamiento de hongos. Aquí te explico los principales inhibidores usados:

Inhibidores de bacterias (especialmente Gram negativas) en cultivo de hongos

1. Cloranfenicol

- Tipo: Antibiótico de amplio espectro.
- Acción: Inhibe la síntesis proteica bacteriana (eficaz contra Gram positivos y negativos).
- Concentración típica: 0.05 g/L (50 mg/L).
- Uso: Muy común en medios como Sabouraud + Cloranfenicol (SDA-C).
- Ventaja: No inhibe el crecimiento fúngico.

2. Gentamicina

- Tipo: Aminoglucósido.
- Acción: Inhibe bacterias Gram negativas.
- Concentración típica: 5–40 µg/mL (dependiendo del fabricante).
- Uso: Puede usarse en combinación con cloranfenicol para inhibir una gama más amplia de bacterias.

3. Cicloheximida (uso selectivo)

- Tipo: Antifúngico selectivo.
- Acción: Inhibe hongos saprófitos (ambientales), pero NO los patógenos dimórficos o levaduras.
- Uso: En medios como SDA + Cloranfenicol + Cicloheximida (también llamado Mycosel).
- Advertencia: No usar si se sospecha un hongo patógeno como *Histoplasma*, *Cryptococcus*, etc., ya que podría inhibirlos.

4. Estreptomina

- Tipo: Aminoglucósido.
- Acción: Actúa contra bacterias Gram negativas (y algunas Gram positivas).
- Uso: Alternativa menos común que gentamicina hoy en día.

Resumen de medios selectivos comunes para hongos:

Medio	Componentes inhibidores	Usos
SDA-C	Sabouraud + Cloranfenicol	Inhibe bacterias, permite crecer a la mayoría de hongos
Mycosel / Mycobiotic Agar	Sabouraud + Cloranfenicol + Cicloheximida	+ Aísla dermatofitos, inhibe hongos saprófitos y bacterias
SDA-GC	Sabouraud + Gentamicina + Cloranfenicol	+ Inhibe bacterias Gram positivas y negativas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M. R., & Moss, M. O. (2007). *Food Microbiology* (3rd ed.). Royal Society of Chemistry.
- Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., & Hill, C. (2019). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (5th ed.). ASM Press.
- Forsythe, S. J. (2020). *The Microbiology of Safe Food* (3rd ed.). Wiley-Blackwell.
- Frazier, W. C., & Westhoff, D. C. (1993). *Microbiología de los Alimentos* (5.ª ed.). McGraw-Hill.
- ICMSF (1980–2005). *Microorganismos en los alimentos* (vols. 1 a 8). Acribia.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Microbiología Moderna de los Alimentos* (7.ª ed.). Acribia.
- Ray, B., & Bhunia, A. (2014). *Microbiología de los alimentos: Un enfoque de laboratorio*. Acribia.