

Manual de Microbiología

Guías prácticas de laboratorio



Luz Stella Ramírez Aristizábal
Luisa Fernanda Ospina Ocampo
Ángela María Arango Londoño

Luz Stella Ramírez Aristizábal,
(Manizales, Caldas, Colombia, 1966).

Doctora en Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide M. Sc. en Microbiología de la Universidad Javeriana, Licenciada en Educación, Biología y Química de la Universidad de Caldas, Profesora titular adscrito a la Facultad de Tecnología.

Ha publicado artículos en revistas especializadas nacionales e internacionales de su especialidad.

Pertenece al grupo de investigación en Polifenoles.

luramire@utp.edu.co

Luisa Fernanda Ospina Ocampo,
(Pereira, Risaralda, Colombia, 1988).

Magister en Ciencias Química, Universidad Tecnológica de Pereira. Profesional en Química Industrial, Universidad Tecnológica de Pereira. Profesor auxiliar adscrito a la facultad de Tecnología.

Ha publicado artículos en revistas especializadas nacionales e internacionales de su especialidad

Pertenece al grupo de investigación en Polifenoles.

lufeospina@utp.edu.co

Ángela María Arango Londoño,
(Pereira, Risaralda, Colombia, 1996).

Microbióloga, Universidad Libre Seccional Pereira. Profesor catedrático auxiliar adscrito a la facultad de Tecnología. Ha publicado artículos en revistas especializadas nacionales de su especialidad.

Pertenece al grupo de investigación de Polifenoles.

angela.arango@utp.edu.co

Manual de Microbiología

Guías prácticas de laboratorio

Luz Stella Ramírez Aristizábal
Luisa Fernanda Ospina Ocampo
Ángela María Arango Londoño



Facultad de Tecnologías
Colección Textos Académicos
2022

Ramírez Aristizábal, Luz Stella
Manual de microbiología : Guías prácticas de laboratorio / Luz
Stella Ramírez Aristizábal, Luisa Fernanda Ospina Ocampo y
Ángela María Arango Londoño. – Pereira : Universidad Tecnológica
de Pereira, 2022.

139 páginas. – (Colección Textos académicos).

e-ISBN: 978-958-722-791-8

1. Laboratorios de microbiología 2. Microorganismos 3. Técnicas
microbiológicas 4. Análisis microbiológico 5. Microbiología –
Aprendizaje.

CDD. 579.078

Manual de Microbiología Guías prácticas de laboratorio

© Luz Stella Ramírez Aristizábal
© Luisa Fernanda Ospina Ocampo
© Ángela María Arango Londoño
© Universidad Tecnológica de Pereira

eISBN: 978-958-722-791-8

Imagen de cubierta: Suministradas por las autoras.

Universidad Tecnológica de Pereira
Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión
Editorial Universidad Tecnológica de Pereira
Pereira, Colombia

Coordinador editorial:

Luis Miguel Vargas Valencia
luismvargas@utp.edu.co
Teléfono 313 7381
Edificio 9, Biblioteca Central “Jorge Roa Martínez”
Cra. 27 No. 10-02 Los Álamos, Pereira, Colombia
www.utp.edu.co

Montaje y producción:
María Alejandra Henao Jiménez
Universidad Tecnológica de Pereira
Pereira

Reservados todos los derechos

Contenido

| | |
|--|----|
| Introducción | 7 |
| Prólogo | 9 |
| CAPÍTULO UNO | |
| Normas generales del laboratorio de microbiología | 13 |
| 1.1. Resultados de aprendizaje..... | 13 |
| 1.2. Fundamentación teórica | 13 |
| 1.3. Actividad interactiva | 14 |
| 1.4. Actividad práctica | 14 |
| CAPÍTULO DOS | |
| Capítulo dos. Microscopia básica | 17 |
| 2.1. Resultados de aprendizaje..... | 17 |
| 2.2. Fundamentación teórica | 17 |
| 2.3. Procedimiento para el manejo del microscopio óptico | 21 |
| 2.4. Actividad interactiva | 22 |
| 2.5. Actividad práctica | 22 |
| CAPÍTULO TRES | |
| Capítulo tres. Técnicas de siembra, tinción e identificación bacterianas y fúngicas | 27 |
| 3.1. Siembras microbiológicas..... | 27 |
| 3.1.1. Resultados de aprendizaje..... | 27 |
| 3.1.2. Fundamentación teórica | 27 |
| 3.1.3. Técnicas de siembra | 29 |
| 3.2. Tinciones microbiológicas | 34 |
| 3.2.1. Resultados de aprendizaje..... | 34 |
| 3.2.2. Fundamentación teórica | 34 |
| 3.2.3. Técnicas de tinción..... | 35 |
| 3.3. Morfologías bacterianas en cultivo | 38 |
| 3.4. Morfologías microbianas microscópicas | 38 |
| 3.5. Actividad interactiva | 40 |
| 3.6. Actividad práctica | 40 |
| CAPÍTULO CUARTO | |
| Capítulo cuatro. Distribución de microorganismos en el ambiente | 45 |
| 4.1. Resultados de aprendizaje..... | 45 |
| 4.2. Fundamentación teórica | 45 |
| 4.3. Análisis de microorganismos mesófilos en diversos ambientes, superficies y muestras | 47 |
| 4.3.1. Microorganismos mesófilos del aire | 47 |
| 4.3.2. Microorganismos mesófilos de tejidos vivos o mucosas | 47 |
| 4.3.3. Microorganismos mesófilos de superficies | 48 |
| 4.3.4. Microorganismos mesófilos en muestras de alimentos..... | 49 |
| 4.3.5. Microorganismos psicrófilos en muestras de alimentos | 52 |
| 4.3.6. Microorganismos termodúricos en muestras de alimentos..... | 53 |
| 4.3.7. Análisis de resultados..... | 54 |
| 4.4. Actividad interactiva | 54 |
| 4.5. Actividad práctica | 55 |

CAPÍTULO CINCO

| | |
|---|----|
| Capítulo cinco. control de poblaciones microbianas por agentes químicos | 59 |
| 5.1. Resultados de aprendizaje..... | 59 |
| 5.2. Fundamentación teórica | 59 |
| 5.2.1. Agentes esterilizantes físicos | 59 |
| 5.2.2. Agentes esterilizantes químicos | 62 |
| 5.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes y antisépticos | 65 |
| 5.3. Evaluación de actividad antimicrobiana por siembra en profundidad..... | 65 |
| 5.3.1. Procedimientos previos | 65 |
| 5.3.2. Procedimientos..... | 68 |
| 5.3.3. Análisis de resultados..... | 70 |
| 5.4. Procedimiento para antibiograma (agentes químicos)..... | 70 |
| 5.4.1. Control de crecimiento..... | 71 |
| 5.4.2. Procedimiento | 71 |
| 5.4.3. Análisis de resultados..... | 73 |
| 5.5. Actividad interactiva | 73 |
| 5.6. Actividad práctica | 73 |

CAPÍTULO SEIS

| | |
|---|----|
| Capítulo seis. Obtención de hongos filamentosos y levaduras a partir del suelo | 77 |
| 6.1. Resultados de aprendizaje..... | 77 |
| 6.2. Fundamentación teórica | 77 |
| 6.3. Dilución de suelo en placas..... | 84 |
| 6.3.1. Muestra de suelo | 84 |
| 6.3.2. Aislamiento de hongos del suelo mediante siembra en superficie | 85 |
| 6.4. Análisis de resultados..... | 87 |
| 6.4.1. Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC) | 87 |
| 6.4.2. Descripción de características morfológicas macroscópicas de las colonias fúngicas | 88 |
| 6.4.3. Descripción de características morfológicas microscópicas de las colonias fúngicas..... | 88 |
| 6.5. Actividad interactiva | 89 |
| 6.6. Actividad práctica | 89 |

CAPÍTULO SIETE

| | |
|---|-----|
| Capítulo siete. Análisis de coliformes en aguas mediante filtración por membrana y siembra en medio VRB y EMB | 93 |
| 7.1. Resultados de aprendizaje..... | 93 |
| 7.2. Fundamentación teórica | 93 |
| 7.3. Identificación de coliformes totales y fecales en agua mediante filtración en membrana | 96 |
| 7.3.1. Medición de la muestra (agua tratada)..... | 96 |
| 7.3.2. Procedimiento de filtración, siembra e incubación | 97 |
| 7.3.3. Lectura y cálculo de resultados..... | 99 |
| 7.4. Identificación de coliformes totales y fecales mediante siembra en superficie | 99 |
| 7.4.1. Medición de la muestra..... | 99 |
| 7.4.2. Preparación de la suspensión inicial (10^{-1})..... | 99 |
| 7.4.3. Preparación de las diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.)..... | 99 |
| 7.4.4. Inoculación e incubación | 100 |
| 7.4.5. Lectura y cálculo de resultados..... | 101 |
| 7.5. Actividad práctica | 101 |

CAPÍTULO OCHO

| | |
|--|-----|
| Capítulo ocho. Productos naturales inhibidores de crecimiento bacteriano | 105 |
| 8.1. Resultados de aprendizaje..... | 105 |
| 8.2. Fundamentación teórica | 105 |
| 8.3. Procedimiento para antibiograma (productos naturales) | 106 |
| 8.3.1. Reactivación del cultivo microbiano | 107 |
| 8.3.2. Preparación de la suspensión bacteriana..... | 107 |
| 8.3.3. Preparación del producto natural a diferentes concentraciones | 108 |
| 8.3.4. Control de crecimiento..... | 109 |
| 8.3.5. Control positivo | 109 |
| 8.3.6. Control negativo..... | 109 |
| 8.3.7. Procedimiento | 109 |
| 8.3.8. Análisis de resultados..... | 110 |
| 8.4. Actividad práctica | 111 |

CAPÍTULO NUEVE

| | |
|--|-----|
| Capítulo nueve. Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en murestras de alimentos | 115 |
| 9.1. Resultados de aprendizajes | 115 |
| 9.2. Fundamentación teórica | 115 |
| 9.3. Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante siembra en superficie | 117 |
| 9.3.1. Preparación de la suspensión inicial (10^{-1})..... | 117 |
| 9.3.2. Preparación de las diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc)..... | 118 |
| 9.3.3. Inoculación e incubación | 118 |
| 9.3.4. Lectura y cálculo de resultados..... | 119 |
| 9.4. Prueba de coagulasa (Merek Bactident® Coagulase, 2022)..... | 119 |
| 9.4. Cálculo y expresión de resultados..... | 120 |
| 9.5. Actividad práctica | 120 |

CAPÍTULO DIEZ

| | |
|--|-----|
| Capítulo diez. Fermentación láctica..... | 125 |
| 10.1. Resultados de aprendizaje..... | 125 |
| 10.2. Fundamentación teórica | 125 |
| 10.3. Elaboración de yogurt ⁴ | 128 |
| 10.3.1. Determinación de la acidez titulada de la materia prima (leche)..... | 128 |
| 10.3.2. Confirmación morfológica del cultivo iniciador..... | 129 |
| 10.3.3. Procedimiento para la elaboración de yogurt..... | 129 |
| 10.4. Actividad interactiva | 131 |
| 10.4. Actividad práctica | 131 |
| Bibliografía | 133 |

“A todos nuestros estudiantes quienes con su anhelo de aprender nos impulsan a formarnos mejor en nuestra profesión de docentes universitarios”

Introducción

El presente manual proporciona a los estudiantes de la escuela de Química de la Universidad Tecnológica de Pereira -y demás programas que lo consideren pertinente-, fundamentación teórica general y técnicas básicas de microbiología, con el fin de aplicarlas a situaciones reales, donde se integran diferentes áreas del conocimiento. Permite, además, identificar riesgos asociados a las prácticas, las medidas preventivas a tener presente, reconocer las partes del microscopio mientras se adquieren habilidades en su manejo, sembrar inóculos bacterianos y fúngicos en diferentes medios de cultivo según el objetivo de la siembra e identificar morfologías macroscópicas y microscópicas mediante tinciones adecuadas.

Una vez adquiridas las habilidades generales en manejo de microorganismos y materiales, se comprueba su presencia en muestras reales que serán evaluadas en el laboratorio, calculando la carga microbiana en ambientes, superficies, mucosas y alimentos, contrastando los resultados con la calidad microbiológica de estos. Así mismo, el estudiante estará en capacidad de determinar la actividad microbiocida y microbiostática de diferentes agentes antimicrobianos y productos naturales a través de métodos de difusión en placa.

Se abordará el estudio microbiológico de suelos, lo que permite la cuantificación de unidades formadoras de colonia de hongos y levaduras; así mismo, la identificación de estructuras morfológicas de dichos organismos. En cuanto a la evaluación de la calidad microbiológica del agua, el estudiante estará en la capacidad de determinar y cuantificar bacterias coliformes totales y fecales por diferentes métodos. Finalmente, se pondrán a prueba todos los conocimientos adquiridos durante el curso de microbiología, gracias a una práctica de laboratorio donde se elabora yogurt, evidenciando las aplicaciones industriales de los microorganismos a través de la fermentación láctica.

Debido a las restricciones de ingreso a los laboratorios y el plan de aislamiento social preventivo adoptado a nivel mundial, el desarrollo de los laboratorios prácticos se vio afectado. Esto incrementó la búsqueda de alternativas pedagógicas para garantizar el aprendizaje de los estudiantes; lo que impulsó el uso de herramientas tecnológicas como simuladores, videos, podcast, trabajos colaborativos, enlaces web, creación de contenido digital, entre otros. Es por ello, que este manual recopila parte de dichas herramientas usadas en este periodo -gracias a los recursos digitales gratuitos-, y complementa las prácticas de laboratorio con simuladores virtuales en los ejes centrales de la enseñanza y aplicación de la microbiología. Al mismo tiempo permite el desarrollo de nuevas estrategias en el proceso de enseñanza-aprendizaje de una forma significativa.

La ejecución de cada uno de estos softwares, promueve en el estudiante el uso de una segunda lengua, donde es estrictamente necesario usar las habilidades de lectura y escucha de materiales científicos en inglés, competencia que está concebida en el plan de desarrollo institucional de la Universidad Tecnológica de Pereira. Así, las actividades que se desprenden de allí, llevan al estudiante a resolver situaciones reales, siendo una solución adecuada para llevar a buen término la práctica virtual; además, ésta es una estrategia de estudio fuera del laboratorio y podrá ser usada en cualquier momento.

Prólogo

En el momento donde se hace necesario migrar a la virtualidad, surge como una oportunidad de innovación en el laboratorio la creación de un manual, no sólo de prácticas académicas, relacionadas con fundamentos generales de microbiología, sino una publicación, que implementa metodologías para la solución de casos mediante softwares o simuladores virtuales, complementando el aprendizaje basado en problemas a la vez que promueve el uso de una segunda lengua.

Cada capítulo está compuesto por la fundamentación teórica, el protocolo a seguir en el laboratorio, un resumen gráfico, preguntas relacionadas con la práctica y una actividad interactiva.

1

CAPÍTULO
UNO

Normas generales del laboratorio de microbiología

1.1. Resultados de aprendizaje

- Redacta las medidas preventivas a tener en cuenta durante la ejecución de las prácticas de microbiología, a través de una matriz de peligros.
- Identifica las medidas de bioseguridad a tener en cuenta en un laboratorio de microbiología a través de un recorrido virtual por medio de un simulador.

1.2. Fundamentación teórica

La microbiología es la ciencia que estudia los microorganismos, seres microscópicos que no son visibles al ojo humano; y que, por tanto, deben ser observados con un equipo llamado microscopio. Dentro de los microorganismos estudiados por esta ciencia se pueden encontrar: bacterias, hongos, virus, parásitos, etc. Algunos aspectos tenidos en cuenta para su estudio son su estructura, metabolismo, diversidad, ecología, genética, entre otros. La persona que se encarga del estudio de los microorganismos es llamada “Microbiólogo/a”, y usualmente desarrolla sus labores en el laboratorio de Microbiología (Sattley & Madigan, 2015).

El laboratorio de microbiología es un espacio donde se pueden llevar a cabo actividades que tienen como finalidad el estudio de microorganismos desde diferentes enfoques como el industrial, ambiental, clínico o biotecnológico entre otros. Por esta razón, es importante tener en cuenta los posibles riesgos que pueden derivar de la manipulación de los microorganismos, para que así sean controlados durante las labores en el laboratorio. Las pautas de seguridad del laboratorio son un conjunto de medidas de tipo preventivo, pensadas para proteger la integridad de quienes allí trabajen.

A continuación, se describen algunas normas generales¹ que deben seguirse en un laboratorio de microbiología:

1. Antes de iniciar con las labores, ubique las salidas de emergencia, extintores, duchas de seguridad y botiquín de primeros auxilios.
2. No corra dentro del laboratorio.
3. Desinfecte sus manos antes y después de salir del laboratorio.
4. Siempre utilice bata de laboratorio, guantes, gafas, tapabocas y gorro.
5. Utilice ropa adecuada. No es permitido tener zapatos abiertos, faldas, vestidos, pantalones abiertos.
6. En caso de tener cabello largo, recójalo para evitar accidentes.
7. Bajo ninguna circunstancia consuma alimentos dentro del laboratorio.
8. Esterilice los equipos y materiales que vaya a utilizar en sus labores.
9. En caso de no utilizar los mecheros, apáguelos.
10. No deje material contaminado sobre los mesones.
11. Cuando requiera esterilizar objetos en el mechero, hágalo con extremo cuidado.
12. Realice el descarte de material biológico de manera apropiada.
13. No es permitido retirar material biológico del laboratorio (medios de cultivo, cepas, etc.), recuerde que todos los microorganismos son patógenos potenciales.
14. Lea la guía de laboratorio asignada, antes de iniciar con la práctica de laboratorio.
15. En caso de tener alguna duda, consulte antes de proceder.
16. En caso de accidente, repórtelo a su docente, monitor/a, jefe de laboratorio, etc.

¹ Basado en el Manual de Laboratorio de Microbiología de (Sahin, 2006)

1.3. Actividad interactiva

A continuación, encontrará un simulador de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

<https://www.ncbionetwork.org/iet/labsafety/>

Fuente: (Introduction to Lab Safety, 2018)

1.4. Actividad práctica

Con base en la fundamentación teórica y el simulador de esta práctica de laboratorio, desarrolle la siguiente actividad propuesta:

- Complete la Tabla 1.1. para identificar los riesgos presentes en el laboratorio de microbiología.

Tabla 1.1. Riesgos en el laboratorio de microbiología.

| Factor de riesgo | Identificación del riesgo | Consecuencia | Medida preventiva |
|--|---|--|--|
| 1. Material de vidrio | <ul style="list-style-type: none"> - Golpes/cortes con objetos o herramientas | <ul style="list-style-type: none"> - Heridas por rotura del material, debido a fragilidad mecánica | <ul style="list-style-type: none"> - Examinar el estado de las piezas - Desechar material agrietado - No calentar el vidrio directamente a la llama |
| 2. Agitador mecánico con calentamiento | <ul style="list-style-type: none"> - Contacto eléctrico - Exposición a sustancias nocivas | <ul style="list-style-type: none"> - Electrocuación por choque eléctrico - Lesiones por contacto y quemaduras químicas por contacto con disolución agitada | <ul style="list-style-type: none"> - Seguir las instrucciones del fabricante. - Usar guantes, bata y lentes |
| 3. | | | |
| 4. | | | |
| 5. | | | |

2

**CAPÍTULO
DOS**

Capítulo dos. Microscopia básica

2.1. Resultados de aprendizaje

- Reconoce las partes y manejo adecuado del microscopio óptico a través de la visualización de diferentes tipos de muestras.
- Reporta mediante fotografías las muestras observadas en el microscopio óptico, y los enfoques logrados mediante el simulador virtual.

2.2. Fundamentación teórica

En el año 2500 AC, como ya existía el vidrio, se utilizaban cuentas de cristal de roca pulida, con el fin de aumentar el tamaño de los objetos vistos a través de ellos. En el siglo XVI se plantea el término “lentes”, debido a que los cristales se parecían a las “lentejas”; y en este mismo periodo de tiempo Leonardo da Vinci formulaba las ventajas del uso de los cristales para visualizar pequeños objetos (Traviezo Valles, 2020), atribuyéndosele uno de los primeros microscopios.

Posteriormente, se fabricaron microscopios para comprobar la calidad y textura de las telas (industria textil) (Olmos Pulido et al., 2018), pero fue hasta 1590, donde los hermanos Hans y Zacarías Jansen crearon el primer microscopio (Figura 2.1.), constaba de dos tubos concéntricos deslizantes y una lente en cada extremo; en el cual se observaban los objetos 10 veces (10X) más grandes del tamaño real (Ford, 2002).



Figura 2.1. Primer microscopio.

Fuente: (AQUÍ Medios de Comunicación, 2021)

En el año 1609, Galileo Galilei fabricó su primer microscopio compuesto; dicho microscopio combinaba un lente cóncavo con uno convexo, permitiendo un aumento de 30X. Luego; en el año 1619, el señor Cornelius Debbel construye su primer microscopio compuesto con dos lentes convexas y solo hasta el año 1625, se asigna el nombre “microscopio” al raro equipo que se utilizaba para aumentar los objetos, nombre atribuido por Giovanni Faber (Traviezo Valles, 2020).

Robert Hooke perfecciona el microscopio entre el año 1663 y 1665; el cual le permitió observar y describir 57 elementos, entre corchos, semillas, plumas, cabellos, hojas e insectos. Asimismo, observó la “célula”, nombre asignado por las habitaciones pequeñas de los monasterios. Hooke vio dicha célula en secciones de corcho (Figura 2.2.) formados por cámaras rectangulares que se llenaban de aire (Goñi López, 2015; Robertson, 2015).

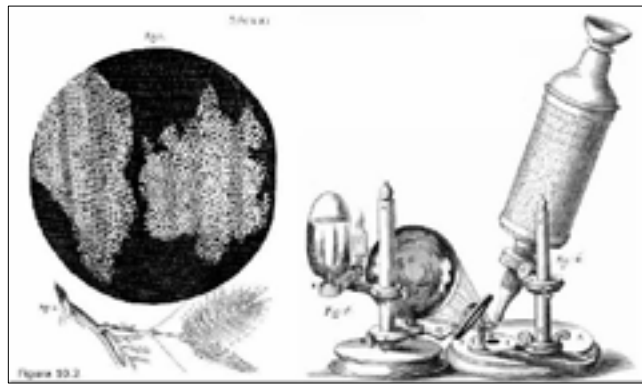


Figura 2.2. Sección de corcho.

Fuente: (Goñi López, 2015)

Anton Van Leeuwenhoek, basado en el microscopio de Hooke, elaboró un microscopio simple (1676) (Figura 2.3.); constaba de un solo lente, el cual era pulido (1 mm de espesor), permitiendo un incremento de hasta 270 X, sin alterar la resolución de los objetos; allí pudo observar plantas, cabellos y una gota de agua estancada, observando animálculos (bacterias y protozoarios). Leeuwenhoek, es considerado pionero de la microbiología, protozoología, parasitología y bacteriología del mundo (Travieso Valles, 2020).



Figura 2.3. Microscopio simple de Anton Van Leeuwenhoek.

Fuente: (Robertson, 2015)

Entre los años 1730 y 1850 se perfeccionaron los microscopios compuestos, evitando la aberración cromática (objetos vistos con anillos de colores) y la esférica (la luz que incide al eje óptico, es conducida por un foco diferente). La aberración cromática fue solucionada por Chester Moore Hall (1730) y la esférica por Jackson Lister (1850) (Travieso Valles, 2020).

Estos microscopios constaban de una columna principal con controles de enfoque, una plataforma para las muestras u objetos, un brazo transversal para componentes ópticos, un espejo bilateral y un lente condensador, el cual conducía la luz a través de las muestras (Figura 2.4.) (Ford, 2002).



Figura 2.4. Microscopio compuesto.

Fuente: (Antiguo Microscopio Compuesto, n.d.)

En 1900, se habló del microscopio moderno (35 cm), este microscopio incluye características de microscopios actuales. En estos se incorporó el sistema revolver, permite cambiar los objetivos y rotarlos, alineándolos con el ocular (Figura 2.5.) (Olmos Pulido et al., 2018).



Figura 2.5. Microscopio moderno.

Fuente: (Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología, 2022)

El microscopio óptico ha sido de gran ayuda, desde 1660 hasta la actualidad, ya que permite observar imágenes imperceptibles a simple vista, accediendo a un incremento de 1000 veces más en la magnificación de la muestra observada y a su vez, sin afectar la resolución y definición de la misma (Lafranconi, 2001).

Entre los microscopios ópticos, se encuentran los compuestos y el simple; siendo el primero el más utilizado, debido a que permite un aumento entre 1500 y 2000 y tiene una resolución de $0,2 \mu\text{m}$ (Sam-Yellowe, 2021).

El microscopio se divide en los siguientes componentes (Figura 2.6.):

1. **Mecánico:** es el conjunto de piezas encargadas de soportar y desplazar los componentes del microscopio; entre ellos están: base, brazo, revólver, tubo, platina, tornillo micrométrico, tornillo macrométrico.
2. **Iluminación:** son las piezas encargadas de iluminar la muestra para que la imagen pueda ampliarse en el sistema óptico como foco, lámpara.
3. **Óptico:** aumenta las imágenes proporcionadas por los objetos, aquí se encuentran objetivo, ocular, diafragma y condensador.

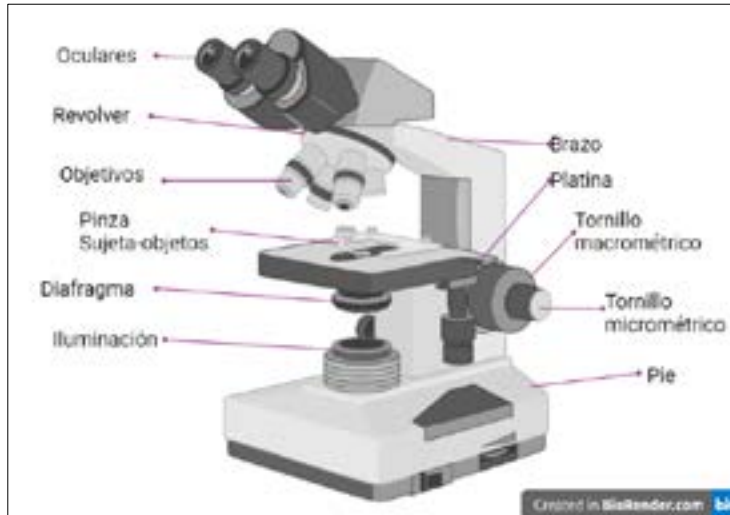


Figura 2.6. Partes de un microscopio óptico.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Según (Sam-Yellowe, 2021) las partes del microscopio podrían definirse de la siguiente manera:

Base o pie: soporte metálico y sólido donde se apoyan y sostienen otros componentes del microscopio.

Brazo: permite el agarre y traslado del microscopio. Está unido al tubo, platina y revolver.

Platina: superficie plana horizontal, posee una perforación central. En ella se apoya el portaobjetos; el cual es sostenido mediante pinzas.

Tubo: cilindro metálico, conectado por un lado con los oculares u ocular y por el otro lado con el revolver.

Revolver: componente que gira alrededor de un eje con la finalidad de que los objetivos que sostiene coincidan con la perforación central de la platina.

Tornillos macrométrico y micrométrico: están situados en la parte inferior del brazo. Ambos tornillos permiten el desplazamiento de la platina hacia arriba o hacia abajo (macrométrico) con la finalidad de acercar o alejar la muestra y conseguir un enfoque óptico (micrométrico) de la imagen.

Condensador + diafragma: función principal concentrar y regular los rayos luminosos que provienen de la fuente luminosa. El diafragma se encarga de regular la entrada de luz, con el fin de concentrar la mayor cantidad de rayos luminosos en el plano donde está situada la muestra a observar.

Foco: dirige los rayos de luz hacia el condensador.

Objetivos: son los elementos más importantes en la formación de la imagen microscópica, estos sistemas de lentes establecen la calidad de la imagen en cuanto a su nitidez y calidad para captar los detalles de esta. Van a tener aumentos de 4x (pequeño aumento), 10x (mediano aumento), 40x (gran aumento), 100x (inmersión).

Ocular: lleva este nombre debido a que la imagen final se observa través de él acercando el ojo a la lente. Se encarga de formar una segunda imagen a partir de la imagen primaria que forma el objetivo. La imagen es de mayor tamaño, virtual y derecho.

El funcionamiento del microscopio óptico (Figura 2.7.) se basa en la propiedad de ciertos materiales para cambiar la dirección de los rayos de la luz. A través de la combinación de lentes capaces de converger o divergir rayos de luz se obtiene una imagen aumentada de la muestra. Dichos lentes se encuentran ubicados en el objetivo y otros en el ocular; los primeros generan una imagen real incrementada de la muestra; seguido, esta imagen real se amplía mediante los lentes del ocular mostrando una imagen virtual mucho más grande al objeto real. La luz juega un papel importante en el microscopio, debido a que por medio del condensador se focaliza hacia la muestra y la desvía de forma correcta para permitir el aumento del objeto (Di Gianfrancesco, 2017).

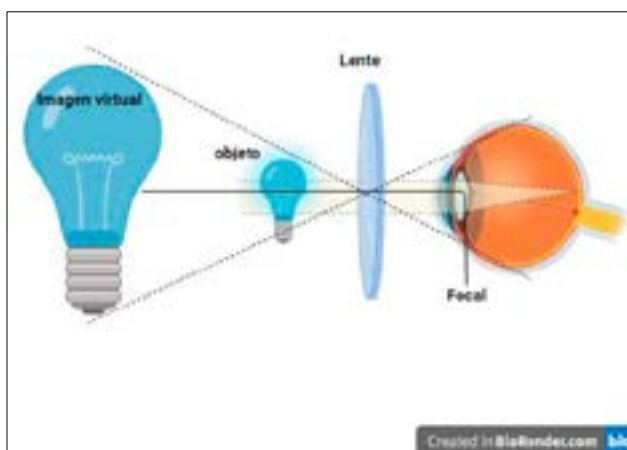


Figura 2.7. Funcionamiento del microscopio.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Para mayor información respecto a otras técnicas de microscopía, consulte el siguiente enlace:
<https://asm.org/Articles/2022/June/Suddenly-I-See-How-Microscopes-Made-Microbiology-P>

2.3. Procedimiento para el manejo del microscopio óptico

1. Retire el microscopio del lugar de almacenamiento, tómelo del brazo y la base.
2. Al momento de ponerlo en una superficie plana, hágalo suavemente.
3. Conecte el cable del microscopio a una fuente de poder y enciéndalo.
4. Ponga el objetivo en el menor aumento y haga que coincida con la abertura de la platina. Mire a través de él, ajuste el diafragma hasta que la luz atraviese la abertura y así permitir que el campo visual quede iluminado de manera homogénea.

5. Si no observa de manera correcta, limpie cuidadosamente el objetivo o el ocular con un pedazo de papel lente. No use otro material.
6. Comience la observación con el objetivo de menor aumento (4x).
7. Al momento de realizar el enfoque:
 - Acerque al máximo la lente del objetivo a la muestra, girando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la muestra pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
 - Mire, ahora sí, a través de los oculares, separe lentamente el objetivo de la muestra con el macrométrico y, cuando esta se observe, gire el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
8. Al momento de cambiar de objetivo, debe de tener casi enfocada la muestra, con el fin de girar un poco el micrométrico y obtener una mejor imagen. Si al momento de girar el micrométrico pierde por completo la muestra. Debe repetir el paso anterior.
9. Empleo del objetivo de inmersión (100x):
 - a. Baje totalmente la platina.
 - b. Suba completamente el condensador para ver el círculo de luz; la cual indica la zona donde se visualizará y donde se pondrá el aceite.
 - c. Gire el revólver hacia el objetivo de inmersión, dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.
 - d. Coloque una pequeña gota de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
 - e. Termine de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
 - f. Enfoque con el micrométrico.
 - g. Una vez haya puesto el aceite de inmersión sobre la muestra, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y enfocar en 4x.
 - h. Una vez finalizada la observación de la muestra, baje la platina y coloque el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento, ya puede retirar la muestra. No se debe retirar la muestra con el objetivo de inmersión en posición de observación.
 - i. Limpie el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica.
10. Debe comprobar que el objetivo 40x está perfectamente limpio.
11. Una vez concluido el uso del microscopio; apague el equipo, desenchufe y guarde nuevamente.

2.4. Actividad interactiva

A continuación, encontrará un simulador de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

<http://www.ncbionetwork.org/iet/microscope/>



Fuente: (BioNetwork, 2018)

2.5. Actividad práctica

Con base en la fundamentación teórica y el simulador de esta práctica de laboratorio, desarrolle la siguiente actividad propuesta:

- a. Seleccione del catálogo disponible en el simulador, una laminilla de cada tipo de muestra, realice el enfoque correspondiente a 4x, 10x, 40x y 100x y coloque la imagen en la casilla correspondiente para completar la (Tabla 2.1.)

Tabla 2.1. Observaciones en el simulador de microscopía óptica.

| Catálogo | Lamina | 4x | 100x |
|----------------------------|---------|---|---|
| Laminilla de muestra | Letra e |  |  |
| Laminilla de planta | | | |
| Laminilla de animales | | | |
| Laminilla de bacterias | | | |
| Laminilla de tejido humano | | | |

3

**CAPÍTULO
TRES**

Capítulo tres. Técnicas de siembra, tinción e identificación bacterianas y fúngicas

3.1. Siembras microbiológicas

3.1.1. Resultados de aprendizaje

- Siembra inóculos bacterianos y fúngicos en diferentes medios de cultivo, a través de técnicas adecuadas, para evidenciar el crecimiento de dichos microorganismos.
- Identifica el tipo de medio de cultivo y técnica de siembra microbiológica a usar según la muestra a analizar.

3.1.2. Fundamentación teórica

El término siembra es asociado a la acción de transferir un microorganismo determinado de un ambiente a otro, usualmente un medio de cultivo, y representa la técnica más usada en el laboratorio de microbiología, cuya principal finalidad es favorecer la multiplicación o reproducción microbiana bajo condiciones de laboratorio controladas (Ramírez Aristizábal, n.d.). Las muestras empleadas para llevar a cabo una siembra microbiológica pueden ser de origen biológico como orina, secreciones, etc.; además pueden servir para realizar un análisis de control de calidad en cosméticos, alimentos, aguas, medicamentos. También pueden proceder de muestras ambientales como agua, suelo, etc., o de un cultivo microbiano que se haya sembrado con anterioridad, siendo denominado subcultivo, repique o resiembra (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021).

Para llevar a cabo labores con microorganismos, es esencial contar con un cultivo axénico (puro), pues de esta manera podemos asegurar resultados confiables en los diferentes análisis de laboratorio. Por esta razón, la técnica o método de siembra debe ser elegido teniendo en cuenta factores tales como la muestra a analizar, el tipo de microorganismo que se desea reproducir, y el estudio que se desea llevar a cabo con dicho microorganismo. Por ejemplo, si se desea obtener determinada cantidad de inóculo bacteriano en medio de cultivo sólido, es necesario realizar una siembra masiva en superficie. Si por el contrario es requerido una gran población bacteriana, sería idónea una siembra en medio de cultivo líquido. O si se trata de purificar (obtener un solo tipo de cultivo bacteriano, en ausencia de otras especies, también conocido como aislamiento) un cultivo mixto (cultivo que se compone de diversas especies microbianas), es indispensable llevar a cabo una siembra por agotamiento en superficie. Una vez se finaliza con la siembra, los cultivos deben ser llevados a incubación a una temperatura adecuada, para que los microorganismos se reproduzcan normalmente en el tiempo adecuado (Fernández Olmos et al., 2010).

Otro factor esencial es el medio de cultivo donde se van a transferir los microorganismos, pues este debe poseer todos los elementos necesarios para permitir la multiplicación de las células microbianas, satisfaciendo sus requerimientos nutricionales. Así, se entiende que la variación de dichos elementos puede acelerar o disminuir el crecimiento o recuperación de los microorganismos; y es importante tener en cuenta que algunas necesidades varían según el tipo de microorganismo, siendo necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021).

Algunos de los nutrientes básicos que deben incluirse en la formulación de los medios de cultivo son:

- **Una fuente de carbono:** Esencial para que las células puedan realizar la síntesis de sus macromoléculas estructurales, y puedan llevar a cabo todas sus funciones biológicas.
- **Una fuente de nitrógeno:** Esencial para que la célula pueda producir mediante su metabolismo macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos.

- **Elementos no metálicos:** Son algunos iones no metálicos como el azufre y el fósforo, para la formación de ácidos nucleicos, enzimas y proteínas.
- **Elementos metálicos** (Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, Fe): Son también conocidos como micronutrientes, oligoelementos o elementos traza; estos participan como cofactores de enzimas y estabilizantes de complejos enzimáticos.
- **Vitaminas:** Pueden ser adicionadas al medio de cultivo o biosintetizadas por los microorganismos durante su crecimiento en el medio.
- **Agua:** La humedad del medio es un factor fundamental para inducir el crecimiento; así, su carencia puede llevar a la muerte del microorganismo. Por otro lado, una variación leve en el pH puede tener acción inhibitoria sobre las células; por lo tanto, antes de iniciar el cultivo de un microorganismo determinado, se debe conocer o determinar el pH óptimo de cultivo. Finalmente, la transparencia del medio, permite evidenciar morfológica y físicamente su crecimiento en medios de cultivo adecuados (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021).

Estos medios de cultivo sintéticos y deshidratados tienen diferentes presentaciones comerciales, las más comunes pueden ser en polvo o granulados. Siendo necesario únicamente resuspender la cantidad de medio (gramos) indicada por la casa comercial por litro de agua, para así tener un medio de cultivo apto para sembrar. Además de las presentaciones, también pueden ser clasificados según su estado físico final; así los medios sólidos poseen 1.5 a 2.0 % de agar – agar, los medios semisólidos poseen 0.5 % de agar – agar y los medios líquidos no contienen agar – agar. Por otro lado, según su propósito pueden ser (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021):

- **Medios enriquecidos:** como su nombre lo indica, son medios suplementados con sustancias nutritivas complementarias para el crecimiento de microorganismos exigentes. Estas sustancias pueden ser sangre, suero, extractos de tejidos de animales o plantas, entre otros.
- **Medios selectivos:** las sustancias que son adicionadas a estos medios inhiben el desarrollo de un grupo de microorganismos en específico, sin afectar el desarrollo de los grupos de interés. Por ejemplo, el medio de cultivo Violeta cristal-Rojo neutro-Bilis-Lactosa (VRB) es selectivo para coliformes presentes en muestras de alimentos o agua, lo que quiere decir que tiene adición de sustancias que impiden el crecimiento de microbiota Gram positiva presente en las muestras a analizar.
- **Medios diferenciales:** contienen reactivos químicos que permiten diferenciar determinados tipos de crecimiento bacteriano después de la incubación (observación de hemólisis, coloraciones de las colonias y otras reacciones indicadoras). Por ejemplo, el medio de cultivo Eosina y Azul de Metileno (EMB), permite el aislamiento selectivo y diferencial de bacterias Gram negativas de la familia Enterobacteriaceae. Los indicadores eosina y azul de metileno permiten la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, lo que se evidencia en el color de las colonias que se logran desarrollar. Además, ejercen un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas.
- **Medios para identificación:** determinan el tipo de crecimiento producido por los microorganismos, así como, la capacidad para producir cambios químicos.
- **Medios de transporte:** son ideales cuando una muestra no puede ser procesada inmediatamente después de que se obtiene, pues permiten mantener viables los microorganismos presentes, evitando su multiplicación y muerte hasta que puedan ser analizados en el laboratorio.

Una vez se ha decidido el medio de cultivo a utilizar, se selecciona y lleva a cabo el método de siembra. Para esto, es importante contar con implementos como mechero (alcohol o de Bunsen) cabina de flujo laminar, el espacio adecuado en condiciones asépticas y el asa bacteriológica (asa de redondel o argolla), o micológica (asa recta o punta). Las asas son un instrumento básico para sembrar; constan de un mango de 20 cm de longitud cuyo extremo lleva adosado un filamento de platino o nicrom que puede terminar en argolla o punta; tienen la propiedad de alcanzar rápidamente temperaturas altas cuando son expuestas a la llama de un mechero, y pueden enfriarse de nuevo en pocos segundos, lo que permite rapidez en las

operaciones. El asa microbiológica también puede ser plástica, en este caso es de único uso, y debe ser desechada después de realizar la siembra (Dirección de Bromatología de Neuquén, 2021). Finalmente, se puede iniciar adecuadamente el proceso de cultivar o subcultivar muestras o aislamientos previamente obtenidos.

Nota: Toda siembra debe adaptarse a los siguientes principios generales (Ramírez Aristizábal, n.d.):

- Practicarla en un medio de cultivo favorable y previamente esterilizado.
- Emplear instrumentos asépticos.
- No contaminar ni destruir el inóculo.
- Esterilizar los instrumentos empleados antes y después de cada operación.

Las siembras deben llevarse a cabo siempre dentro del radio de un mechero Bunsen (30 cm), o en el ambiente dentro de una cabina de flujo laminar, esto debido a que el aire tiene carga microbiana contaminante que puede afectar los resultados de la siembra. Así, la corriente ascendente del aire que va por la llama, o la corriente de aire del flujo laminar impide que se arrastre polvo u otras partículas, evitando la contaminación del medio de cultivo. El asa metálica con la cual se vaya a realizar la siembra debe ser flameada adecuadamente y enfriada antes de tocar el inóculo (porción de muestra a sembrar), o el medio de cultivo. De igual manera, todo el material que se vaya a utilizar, debe estar completamente estéril (Ramírez Aristizábal, n.d.).

Para mayor información respecto a otras técnicas de siembra microbiológicas, consulte el siguiente enlace: <https://www.youtube.com/watch?v=IDVOiCiJtMI>

3.1.3. Técnicas de siembra

3.1.3.1. Siembra masiva para bacterias

La finalidad de esta técnica es aumentar el número de microorganismos del cual se parte, sobre la superficie de un agar (Brooks et al., 2013).

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado, tome 100 μ L o 0.1 mL del inóculo bacteriano líquido que sea suministrado por el docente encargado.
2. Cuidadosamente, deposite el inóculo bacteriano líquido en la parte central del medio de cultivo sólido que tenga a su disposición.
3. Empleando un asa de Digrafsky, distribuya el inóculo de manera homogénea en la superficie del medio de cultivo, realizando forma de espiral, hasta que se haya absorbido por completo la muestra (Figura 3.1.).
4. Lleve el medio de cultivo inoculado a incubación, a temperatura adecuada para el microorganismo que acaba de sembrar.

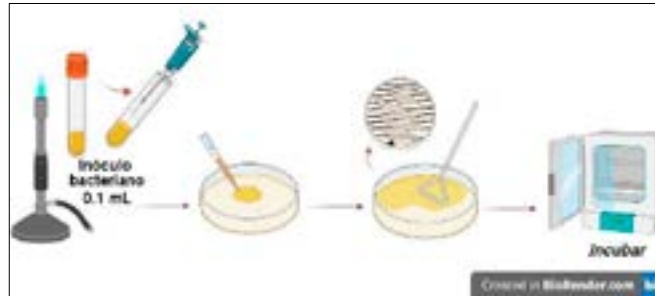


Figura 3.1. Siembra masiva en superficie para bacterias.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Esta técnica también puede ser llevada a cabo con un hisopo estéril (Figura 3.2.), en cuyo caso, el hisopo debe estar impregnado con el inóculo bacteriano, y posteriormente es necesario realizar estrías por toda la superficie de la placa en distintas direcciones y finalmente por el borde; de esta manera se garantiza que los microorganismos crezcan sobre toda la superficie del medio de cultivo. Por último, lleve a incubación a temperatura adecuada.

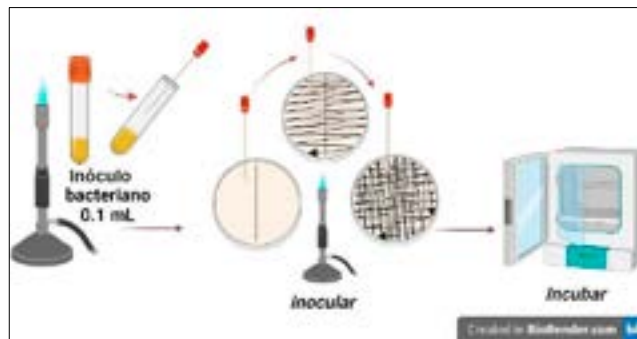


Figura 3.2. Siembra masiva con hisopo estéril.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.1.3.2. Siembra por agotamiento para bacterias

La finalidad de esta técnica es obtener colonias separadas a partir de un inóculo determinado (Brooks et al., 2013; Panec & Katz, 2016).

1. Empleando un asa metálica de redondel previamente esterilizada en el mechero, tome una pequeña porción del inóculo bacteriano sólido que sea suministrado por el docente encargado.
2. Con precaución, distribuya uniformemente el inóculo en el primer cuadrante del medio de cultivo, realizando líneas o estrías definidas y separadas entre sí.
3. Retire el asa metálica del medio de cultivo, y esterilicela en el mechero.
4. Partiendo del primer cuadrante, y asegurándose que está arrastrando carga microbiana, realice líneas o estrías uniformes en el segundo cuadrante del medio de cultivo.
5. Retire el asa metálica del medio de cultivo, y esterilicela en el mechero.
6. Partiendo del segundo cuadrante, y asegurándose que está arrastrando carga microbiana, realice líneas o estrías uniformes en el tercer cuadrante del medio de cultivo.
7. Retire el asa metálica del medio de cultivo, y esterilicela en el mechero.

- Partiendo del tercer cuadrante, y asegurándose que está arrastrando carga microbiana, realice líneas o estrías uniformes en el cuarto cuadrante del medio de cultivo.
- Finalmente, y sin retirar el asa metálica del medio de cultivo, realice una “S” partiendo desde el centro del cuarto cuadrante hasta el centro del medio de cultivo, teniendo cuidado de no tocar los cuadrantes realizados previamente (Figura 3.3.).
- Retire el asa metálica del medio de cultivo, y esterilícela en el mechero.
- Lleve el medio de cultivo inoculado a incubación, a temperatura adecuada para el microorganismo que acaba de sembrar.

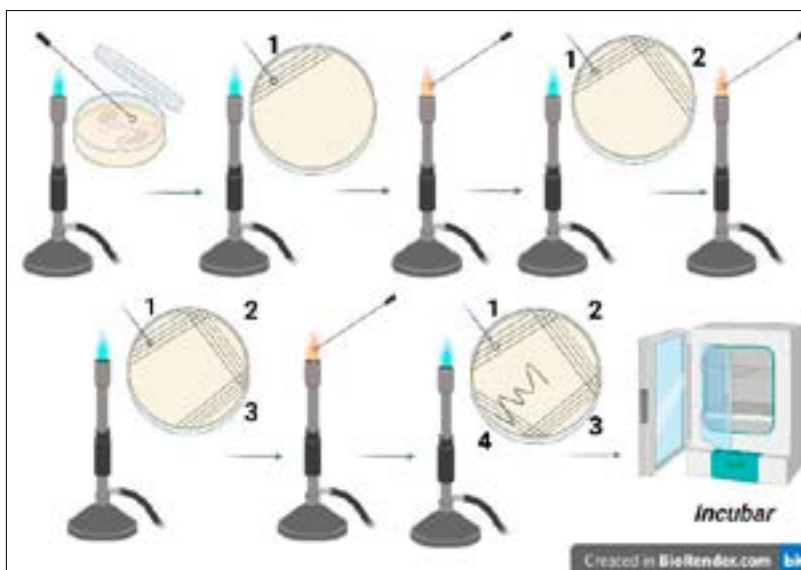


Figura 3.3. Siembra por agotamiento en superficie.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.1.3.3. Siembra por cuadrantes en superficie para bacterias

La finalidad de esta técnica es diluir el inóculo a medida que se realizan estrías en la superficie del agar (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021).

- Inicialmente es necesario que divida la base de la caja de Petri con ayuda de un marcador, de tal manera que se observen 4 cuadrantes de tamaño similar.
- Empleando un asa metálica de redondel previamente esterilizada en el mechero, tome una pequeña porción del inóculo bacteriano que sea suministrado por el docente encargado.
- Con precaución, distribuya uniformemente el inóculo en el primer cuadrante del medio de cultivo, realizando líneas o estrías definidas y separadas entre sí (Figura 3.4.).
- Sin retirar el asa metálica del agar para flamear o tomar inóculo nuevamente, realice estrías definidas y separadas entre sí, en el segundo cuadrante.
- Repita el paso anterior en los dos cuadrantes restantes (cuadrantes 3 y 4).
- Retire el asa metálica del medio de cultivo, y esterilícela en el mechero.
- Lleve el medio de cultivo inoculado a incubación, a temperatura adecuada para el microorganismo que acaba de sembrar.

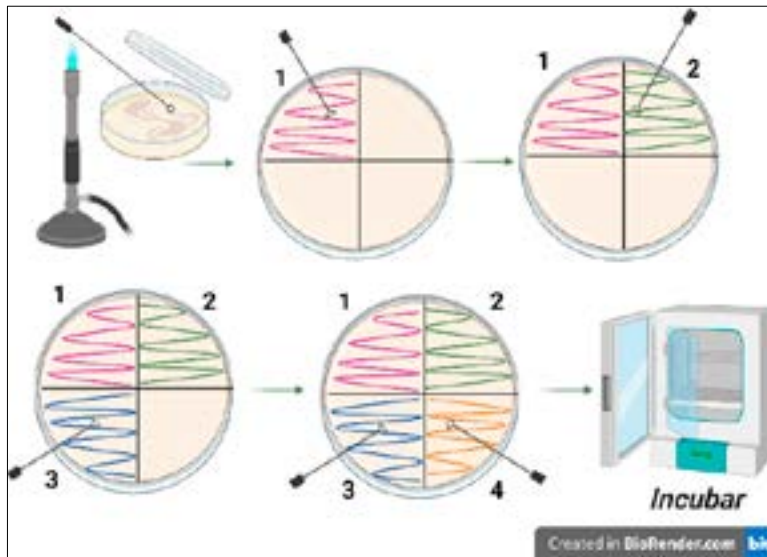


Figura 3.4. Siembra por cuadrantes en superficie.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.1.3.4. Siembra en profundidad para bacterias

Esta técnica se utiliza generalmente para el recuento de colonias bacterianas; sin embargo, puede ser empleada con otros propósitos -por ejemplo- sembrar microorganismos con requerimientos de oxígeno diferentes para desarrollarse apropiadamente (Brooks et al., 2013).

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado, tome 1000 μL o 1 mL del inóculo bacteriano líquido que sea suministrado por el docente encargado.
2. Cuidadosamente, deposite el inóculo bacteriano líquido en la parte central de la caja de Petri, que no tiene medio de cultivo en ella.
3. Añada el medio de cultivo fundido (15-20 mL) y enfriado 44-47 $^{\circ}\text{C}$ sobre caja de Petri que contiene una cantidad determinada de la muestra líquida, y tape la caja.
4. Con precaución, realice movimientos controlados a la caja de Petri (en forma de infinito), sobre una superficie plana, como una cabina de flujo laminar. Es importante homogenizar de forma adecuada el medio de cultivo y el inóculo, para que de esta manera se puedan evidenciar unidades formadoras de colonia (UFC) en el agar (Figura 3.5.).
5. Deje solidificar el medio de cultivo (15 minutos aproximadamente).
6. Lleve el medio de cultivo inoculado a incubación, a temperatura adecuada para el microorganismo que acaba de sembrar.

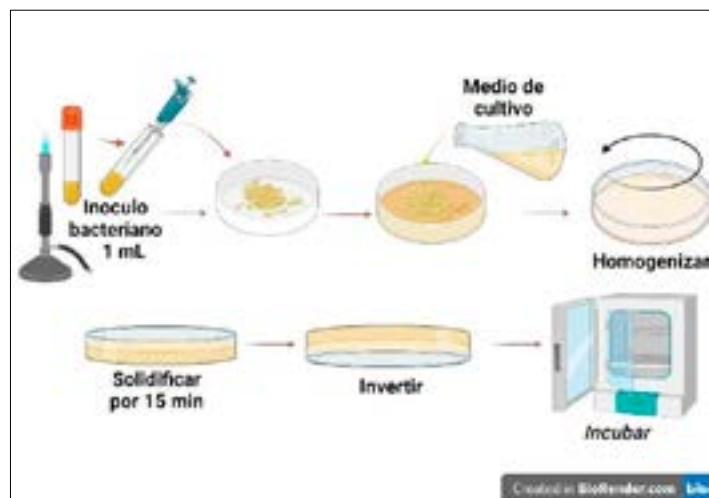


Figura 3.5. Siembra en profundidad para bacterias.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.1.3.5. Siembra en medio líquido para bacterias

La finalidad de esta técnica es transferir un inóculo sólido o líquido a un medio de cultivo líquido, así se obtiene una mayor población microbiana (Bhumbla, 2018).

Puede usar el asa metálica de redondel, o en algunos casos, micropipetas o hisopos estériles.

1. Tome una porción del inóculo bacteriano que le sea suministrado, el cual puede ser sólido o líquido.
2. Con precaución, transfiera dicho inóculo al medio de cultivo líquido que tenga a disposición. Es importante no tocar las paredes del tubo de ensayo, para evitar contaminaciones indeseadas (Figura 3.6).
3. Cierre el tubo de ensayo, y homogenice por inversión la muestra y el medio de cultivo.
4. Lleve el medio de cultivo inoculado a incubación, a temperatura adecuada para el microorganismo que acaba de sembrar.

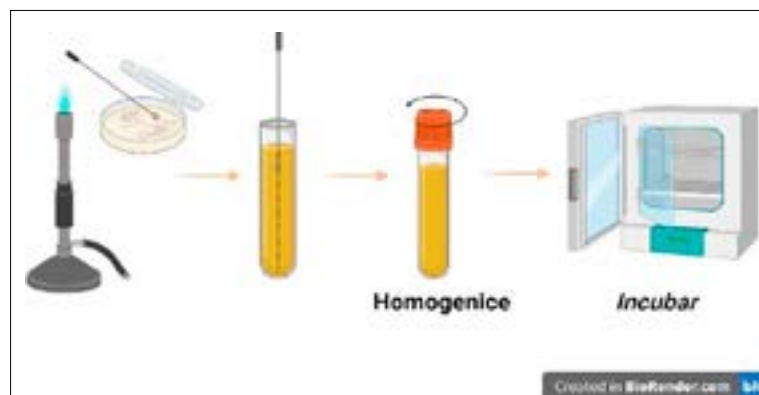


Figura 3.6. Siembra en medio líquido para bacterias.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.1.3.6. Siembra fúngica en superficie

La finalidad de esta técnica es conseguir el desarrollo del micelio del hongo de interés, en la superficie del medio de cultivo.

1. Empleando un asa metálica de redondel previamente flameada, tome un fragmento de medio de cultivo de aproximadamente 2 mm de lado, en cuya superficie se observe micelio del hongo que le haya sido asignado por el docente encargado.
2. Ubique la muestra que acaba de tomar sobre la superficie y en el centro de un medio de cultivo adecuado para permitir el desarrollo fúngico, de tal manera, que el micelio del hongo quede en contacto con la superficie del medio (Figura 3.7.).

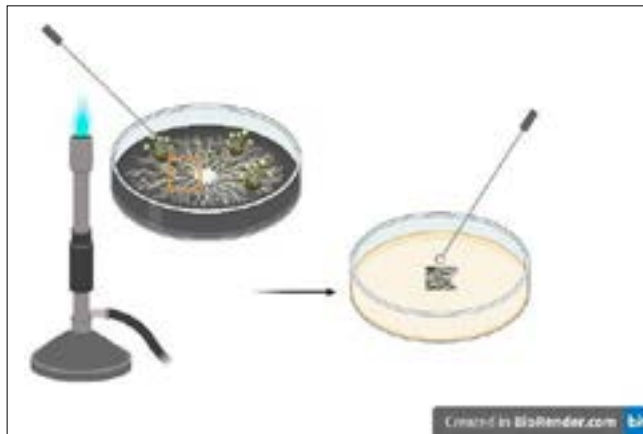


Figura 3.7. Siembra fúngica en superficie.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

Una vez haya transcurrido el tiempo de incubación, se debe continuar con el paso definitivo para la identificación de los microorganismos que se han logrado aislar, el cual es la observación e interpretación de los cultivos primarios. Esta observación se basa en la identificación de cada tipo de colonia, grado de pureza, coloración con azul de lactofenol y los cambios en el medio de cultivo que rodea la colonia (Cuervo Mulet, 2010; Sanz Cervera, 2011).

3.2. Tinciones microbiológicas

3.2.1. Resultados de aprendizaje

- Selecciona la tinción microbiológica adecuada acorde a la muestra a analizar.
- Reconoce morfologías microbianas mediante diferentes tinciones microbiológicas.
- Interpreta los resultados obtenidos en la simulación virtual a través de la resolución de un cuestionario.

3.2.2. Fundamentación teórica

Todos los compuestos orgánicos absorben luz en la región ultravioleta del espectro electromagnético. Sin embargo, esta fracción no es visible para nosotros, por tanto, aparece a nuestros ojos de forma incolora o blanca; esto mismo sucede con los microorganismos, pues por lo general son transparentes y ello dificulta el estudio de sus características morfológicas. Lo anterior representa un problema para lograr su identificación, así que fue necesario desarrollar técnicas de tinción en microscopía óptica y electrónica, y

técnicas de aislamiento y caracterización bioquímica de los componentes celulares. Por ejemplo, una de las tinciones bacterianas más famosas y utilizadas en el campo de la microbiología es la coloración de Gram, ideada por Hans Cristian Gram en 1844. Esta coloración permite la diferenciación de los microorganismos en dos grupos: Gram positivos y Gram negativos. Las diversas técnicas de tinción tienen como base los colorantes que se utilizan en su ejecución; dichos colorantes tienen ciertas finalidades como teñir los microorganismos y sus estructuras (cápsulas, flagelos, esporas, orgánulos), ayudar en su clasificación en grupos según la forma en que absorben dichos colorantes, e incluso pueden ser adicionados a los medios de cultivos con el fin de inhibir el crecimiento de un grupo determinado de microorganismos. Si hablamos de bacterias, sus núcleos se tiñen mejor con colorantes básicos, pues tiene su material genético distribuido por toda la célula, mientras que el citoplasma obtiene una mejor coloración si se usan colorantes ácidos. Un dato interesante es que, por su constitución, las bacterias tienen una carga negativa y al observarlas en las preparaciones en fresco se ven en continuo movimiento ya que se rechazan unas a otras (movimiento browniano) (Ramírez Aristizábal, n.d.).

Nota: Para que esta reacción ocurra es necesario que las bacterias que se van a colorear tengan su pared celular íntegra, para esto se deben utilizar cultivos jóvenes.

Por otra parte, para la identificación de hongos con fines de estudios taxonómicos es necesario observar las estructuras fúngicas de forma nítida y con alto contraste; para esto se utilizan diversos compuestos químicos que permitan la tinción diferencial entre las paredes y citoplasma de las células fúngicas. Entre los compuestos más usados se pueden destacar el fenol y el ácido láctico en combinación con azul de algodón o fucsina ácida, entre otros (Golani, n.d.).

A continuación, se describen algunas técnicas de tinción microbiológicas e información relacionada con las características morfológicas de microorganismos en cultivo, que serán de utilidad para esta práctica de laboratorio.

3.2.3. Técnicas de tinción

3.2.3.1. Tinción de Gram para bacterias

Antes de realizar la tinción diferencial en bacterias, es necesario llevar a cabo la fijación de la muestra al portaobjetos, para que, de esta manera, no sea arrastrada por los reactivos que se emplean en la tinción.

La fijación de la muestra se consigue así:

1. Con un frasco lavador, ponga una gota pequeña de agua destilada en el centro de un portaobjetos.
2. Con un asa metálica de redondel previamente esterilizada en el mechero, tome una porción mínima del inóculo bacteriano sólido que sea suministrado por el docente encargado (Figura 3.8.).
3. Mezcle cuidadosamente el inóculo con la gota de agua, de forma que la muestra quede bien distribuida por la superficie del portaobjetos.
4. Tome el portaobjetos por un extremo y ubíquelo sobre la llama del mechero a una distancia aproximada de 10 cm de esta.
5. Mueva el portaobjetos en forma de vaivén hasta que la gota de agua se seque por completo, o se vuelva opaca.

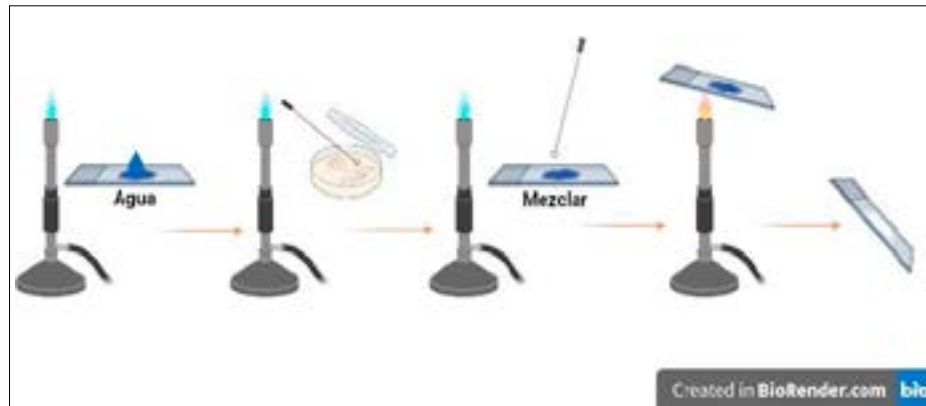


Figura 3.8. Fijación de la muestra bacteriana al portaobjetos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

A continuación, se describe el proceso para llevar a cabo la tinción de Gram:

1. Sobre la muestra que acaba de fijar, ponga una cantidad adecuada del reactivo cristal violeta y deje actuar por 1 minuto.
2. Lave el portaobjetos con abundante agua de grifo, procurando que esta no caiga directamente sobre la muestra.
3. Dando golpes suaves al portaobjetos, retire el exceso de agua.
4. Ponga sobre la muestra una cantidad adecuada del reactivo lugol y deje actuar por 1 minuto.
5. Repita los pasos 2 y 3.
6. Ponga sobre la muestra una cantidad adecuada de la mezcla alcohol: acetona (50:50) y deje actuar por 30 segundos.
7. Repita los pasos 2 y 3.
8. Ponga sobre la muestra una cantidad adecuada del reactivo safranina o fucsina y deje actuar por 1 minuto.
9. Repita los pasos 2 y 3 (Figura 3.9.).
10. Deje secar el portaobjetos a temperatura ambiente, en una incubadora, o directamente sobre la llama del mechero a una distancia aproximada de 10 cm de esta.
11. Observe en el microscopio.

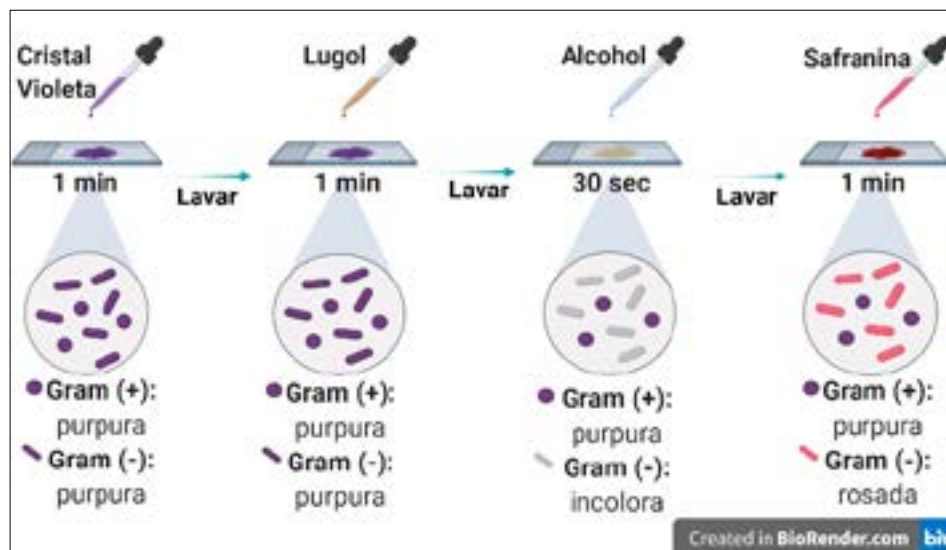


Figura 3.9. Tinción de Gram en bacterias.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

3.2.3.2. Tinción con azul de metileno o azul de lactofenol para hongos

1. Ponga una gota pequeña de azul de metileno o azul de lactofenol en el centro de un portaobjetos.
2. Con un asa metálica de punta, tome una porción del micelio del hongo que le haya asignado el docente encargado.
3. Ubique el micelio sobre la gota de colorante, y empleando dos asas metálicas de punta (una con cada mano), abra el micelio tanto como le sea posible, de manera que sus estructuras se desenreden por completo (Figura 3.10.).
4. Sobre este montaje, deje caer cuidadosamente un cubreobjetos, y limpie el exceso de colorante que quede en la superficie del portaobjetos.
5. Observe en el microscopio.



Figura 3.10. Tinción fúngica.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

3.3. Morfologías bacterianas en cultivo

La morfología de las colonias es un parámetro importante en el proceso de identificación bacteriana, siendo estas características comunes entre cada género bacteriano. Sobre los medios de cultivo, los microorganismos presentan ciertas diferencias en la apariencia macroscópica de su crecimiento, las cuales son denominadas características morfoculturales, y son la base para la separación de estos en grupos taxonómicos. Sin embargo, la morfología puede alterarse por el tiempo de incubación, composición del medio de cultivo (excesiva desecación o humedad), etc. Algunas de las características morfoculturales son: el borde y la elevación de la colonia, la consistencia y la textura de la masa celular [va desde la colonia seca que, tocada con un asa se desplaza en la superficie del medio, hasta las colonias viscosas que se pegan al asa y se separan de la colonia formando un hilo (generalmente son bacterias con cápsulas gruesas)] y también la pigmentación de la colonia. Por lo tanto, antes de realizar la descripción morfológica microscópica de un microorganismo, es preciso describir su morfología en cultivo (Figura 3.11.) (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021)



Figura 3.11. Características morfoculturales de colonias bacterianas.

Fuente:(Parada Piug, n.d.)

3.4. Morfologías microbianas microscópicas

Para el estudio de cualquier microorganismo cultivable, es necesario conocer y reconocer la morfología microscópica y macroscópica a partir de su crecimiento en medios de cultivo. Bajo condiciones estables, las bacterias exhiben formas microscópicas definidas, las cuales son proporcionadas por la rigidez de la pared celular. Es fundamental realizar una correcta observación de sus características morfológicas, dado que, dicha forma se convierte en una de las claves principales para la identificación inicial de géneros bacterianos. Adicional a esto, son requeridos otro tipo de marcadores, como los bioquímicos, serológicos y moleculares, para poder concluir al respecto de un género y una especie. Las formas más comunes que se pueden encontrar en bacterias son esférica, cilíndrica y espiral. Las células esféricas, se denominan cocos y suelen ser redondeadas, aunque pueden presentar formas ovoides o elípticas (Figura 3.12.) (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021).

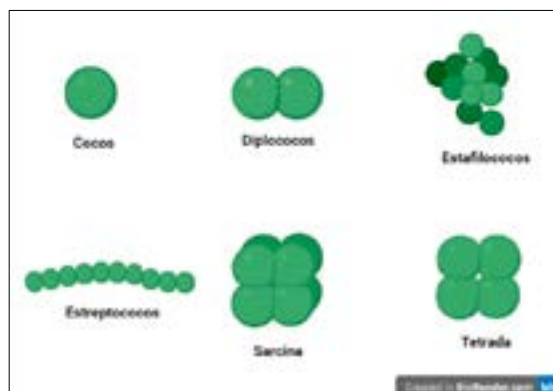


Figura 3.12. Arreglos de cocos bacterianos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

A las de forma cilíndrica se les denomina bacilos; los extremos de estas células suelen ser redondeados, rectos, en forma de huso o cuerno (Figura 3.13.). A las de forma espiral o helicoidal, se les denomina espirilos y se caracterizan por su forma de sacacorchos. Existe una morfología intermedia entre los cocos y los bacilos, denominada cocobacilos; muchos de ellos parásitos del hombre y de los animales (Dirección de Bromatología de Neuquen, 2021)

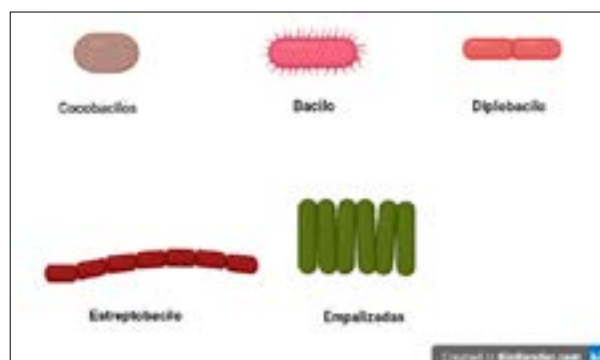


Figura 3.13. Arreglos de bacilos bacterianos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

Por otro lado, los hongos microscópicos, también llamados hongos filamentosos, poseen morfologías diversas que permiten su identificación. Estos hongos están constituidos por micelio, que a su vez está compuesto por largos filamentos que se denominan “Hifas” (Figura 3.14.). Así, para lograr una aproximación a la identificación fúngica, es necesario observar estas estructuras en el microscopio, y realizar una descripción de estas (Kuhar et al., 2013).

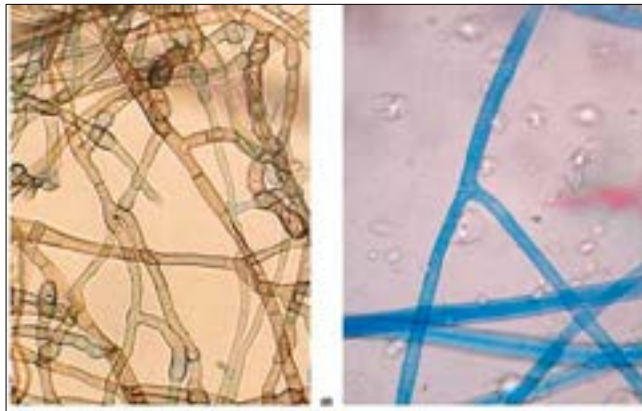


Figura 3.14. Tipos de hifas fúngicas.

Fuente: (Bonifaz Trujillo, 2015)

3.5. Actividad interactiva

A continuación, encontrará cuatro simuladores de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

| |
|---|
| <p>https://learn.chm.msu.edu/vibl/vibl/StreakPlate/streak_plate_HTML5Canvas.html</p> <p>Fuente: (Michigan State University, 2010)</p> |
| <p>https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:ad1c85ff-0c38-4e62-83c9-8de52f175e73/items/lx-pb:ad1c85ff-0c38-4e62-83c9-8de52f175e73:lx_simulation:e58619e2</p> <p>Fuente(Michigan State University, 2010)</p> |
| <p>https://www.labxchange.org/library/pathway/lx-pathway:ad1c85ff-0c38-4e62-83c9-8de52f175e73/items/lx-pb:ad1c85ff-0c38-4e62-83c9-8de52f175e73:lx_simulation:ff60c1f5</p> <p>Fuente: (LabXchange, 2022)</p> |
| <p>https://learn.chm.msu.edu/vibl/vibl/GramStain/gram_stain_HTML5Canvas.html</p> <p>Fuente: (Arvidson et al., n.d.)</p> |

3.6. Actividad práctica

Con base en la fundamentación teórica y a los simuladores de esta práctica de laboratorio, desarrolle la siguiente actividad propuesta.

- Resuelva las siguientes preguntas:
 - a. Indique cuál es el propósito de realizar una siembra bacteriana.
 - b. ¿Es posible realizar una prueba bioquímica antes de aislar y purificar un cultivo? Explique su respuesta.
 - c. ¿En cuál de los 4 cuadrantes donde realiza la siembra encontrará más colonias aisladas?
 - d. Tome pantallazos de la siembra realizada e indique si su placa es adecuada para continuar con una tinción de Gram indicando la colonia que tomaría para dicho fin.
 - e. Indique el mecanismo de acción de los diferentes colorantes que hacen parte del proceso de tinción de Gram.

- f. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de Gram?
- g. ¿Qué recomendaciones daría al momento de realizar una tinción de Gram?
- h. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de azul de metileno o de lactofenol?
- i. Describa las morfologías macroscópicas y microscópicas de los cultivos fúngicos obtenidos.

4

**CAPÍTULO
CUARTO**

Capítulo cuatro. Distribución de microorganismos en el ambiente

4.1. Resultados de aprendizaje

- Comprueba la presencia de microorganismos mesófilos en ambientes, mucosas, superficies y alimentos, a través de siembras en superficie y profundidad.
- Calcula la carga de microorganismos mesófilos y termodúricos en alimentos, mediante la aplicación de diluciones decimales y siembra en profundidad, según los parámetros de la norma ISO 7218:2007

4.2. Fundamentación teórica

Los microorganismos se pueden encontrar en diversos ambientes naturales, como por ejemplo en hielo, tierra, aceite, gasolina, agua, aire, alimentos, tracto intestinal, piel, entre otros. De hecho, pocos lugares en la naturaleza están libres de ellos. A pesar de esto, para evidenciar dicha presencia es necesario propiciar su crecimiento y desarrollo en medios de cultivo que sean estériles, para que de esta manera pasen de ser invisibles al ojo humano, a poder visualizar sus colonias en la superficie o profundidad de dichos medios de cultivo. El laboratorio, como otros ambientes, está poblado de microorganismos suspendidos en el aire, o llevados por el polvo a las superficies; y esto representa un problema para quienes analizan muestras en el laboratorio, puesto que deben evitar la contaminación de los materiales con los cuales trabajan, tales como medios de cultivo, soluciones y equipos (Ramírez Aristizábal, n.d.).

Como se mencionó anteriormente, es incontable la diversidad microbiana que se puede encontrar en el ambiente, por esta razón, es indispensable crear agrupaciones o clasificaciones que faciliten la identificación de los microorganismos. Para este fin, muchos aspectos deben ser considerados; por ejemplo, las morfologías microbianas, los ambientes de donde pueden ser aislados, su metabolismo, y por supuesto, la temperatura a la cual se desarrollan con normalidad, lo que se conoce como **temperatura de crecimiento** (dicha temperatura influye en la tasa o velocidad de crecimiento de una población microbiana, en el metabolismo interno de las células, en la duración de la fase de latencia, en la composición química y enzimática, entre otros). El rango de temperatura en que crecen los microorganismos es amplio, entre - 5 y +80 °C; sin embargo, en promedio el crecimiento de cualquier microorganismo raramente sobrepasa los 35 – 37 °C. La velocidad de crecimiento de los microorganismos puede ser interpretada en función de la temperatura a la cual estos se desarrollan. El límite superior de temperatura para el crecimiento biológico está determinado por la termolabilidad de las proteínas celulares, y el inferior, por el punto de congelación del agua, que es de varios grados bajo cero cuando contiene disueltas, cantidades considerables de solutos. Lo anterior es conocido como “temperaturas cardinales” (Erkmen, 2021; Ramírez Aristizábal, n.d.).

Es interesante aclarar que los microorganismos pueden sobrevivir a temperaturas mucho más bajas que la mínima requerida para el crecimiento; de hecho, pueden conservar su viabilidad durante un largo tiempo si se mantienen a baja temperatura en estado de congelación. Así, una forma excelente de conservarlas bacterias es mantenerlas a la temperatura del nitrógeno líquido entre -80 y -190 °C (Ocares & Castro F, n.d.).

Al estudiar la influencia de la temperatura en la velocidad del crecimiento microbiano se debe tener en cuenta el efecto de la temperatura sobre la velocidad de las reacciones químicas. Aproximadamente, la velocidad de la mayoría de las reacciones químicas se dobla por cada incremento de 10 °C en la temperatura. A medida que la temperatura asciende, el crecimiento microbiano acaba por detenerse como consecuencia de la desnaturalización de las proteínas celulares; por encima de la temperatura óptima, este factor adquiere rápidamente progresiva importancia, y determina una caída brusca de la velocidad de crecimiento. Así, el crecimiento se detiene cuando se destruyen las proteínas esenciales más termolábiles de la célula. Por lo tanto, el límite máximo del rango de temperatura, tolerado por cualquier especie se correlaciona bien con

la estabilidad térmica general de las proteínas de dicha especie según mediciones hechas en extractos celulares (Ramírez Aristizábal, n.d.).

Atendiendo entonces a este margen de temperatura de crecimiento, se pueden distinguir tres grupos fisiológicos principales de microorganismos: termófilos, mesófilos y psicrófilos. Las formas psicrófilas crecen mejor a temperaturas bajas, entre 0-20 °C, teniendo como temperatura óptima los 15 °C. Los organismos que conforman este grupo se pueden encontrar principalmente en ambientes como polos, el océano ártico y antártico, entre otros. Su capacidad de tolerar e incluso crecer a temperaturas tan bajas es atribuida a que sus membranas están constituidas por altos niveles de ácidos grasos insaturados, lo que permite que mantenga un estado de semifluidéz de su membrana, incluso a tan bajas temperaturas. Algunos géneros microbianos que exhiben esta característica son *Pseudomonas* y *Vibrio*. Las formas mesófilas son metabólicamente activas entre 20–45 °C, son extremadamente sensibles a cambios abruptos de temperatura, por lo que ingresan a fase de muerte cuando son llevadas sobre los 45-50 °C (Gupta & Gupta, 2021).

Las formas termófilas se desarrollan entre 45-70 °C, con un óptimo entre 55-60 °C. Los organismos de este grupo pueden encontrarse en aguas termales, cauces de agua caliente, en el proceso de degradación de materia orgánica para obtener abono, entre otros. Su capacidad para resistir temperaturas tan elevadas se basa en su estabilidad celular, pues sus membranas contienen enlaces internos hidrofóbicos reforzados por puentes de hidrógeno; además, ciertas proteínas se unen a su ADN y esto lo protege del calor extremo. En este caso, los lípidos de sus membranas son ácidos grasos saturados (usualmente ramificados y de mayor peso molecular), y esto aumenta la temperatura de fusión de dichos microorganismos, razón por la cual pueden sobrevivir a temperaturas extremas. Adicionalmente existen microorganismos termodúricos, bacterias que sobreviven, pero no son capaces de crecer a las temperaturas de pasteurización. También existen microorganismos hipertermófilos, cuya temperatura de crecimiento es mayor a 80 °C, y además, microorganismos psicrótrofos, que se desarrollan por debajo de los 25-30 °C (Gupta & Gupta, 2021).

Tabla 4.1. Temperaturas de crecimiento de microorganismos.

| Tipo de microorganismo | Temperatura mínima (°C) | Temperatura óptima (°C) | Temperatura máxima (°C) |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Psicrófilo | -5 + 5 | 12-15 | 15-20 |
| Psicrótrofo | -5 + 5 | 25-30 | 30-35 |
| Mesófilo | 5-15 | 30-45 | 35-47 |
| Termófilo | 40-45 | 55-75 | 60-90 |
| Hipertermofilos | 60 | > 70 | 130 |

Fuente: (Gupta & Gupta, 2021; Prácticas de Microbiología - Temperatura, n.d.)

La mayoría de los microorganismos son mesófilos, y se encuentran en casi todos los ambientes y muestras, pues su temperatura de desarrollo (37 °C) es la temperatura óptima para muchas de las formas de vida libre. Estos microorganismos son analizados de forma rutinaria en laboratorios de alimentos, pues ayuda a realizar una estimación del número total de bacterias presentes en una muestra, sin identificar los diferentes tipos de géneros o especies. Este análisis refleja la calidad sanitaria de los productos analizados revelando, además de las condiciones higiénicas de la materia prima, la forma como fueron manipulados los alimentos en su elaboración, teniendo como limitante que no se puede establecer la presencia de patógenos o sus toxinas. Es importante tener en cuenta que un recuento total de aerobios mesófilos bajo no indica que un alimento esté libre de patógenos o de sus toxinas; y un recuento total elevado no significa presencia de microbiota patógena (Khan & Rahman, 2021), así un recuento alto podría revelar:

- Materia prima contaminada en exceso.
- Métodos de manipulación incorrectos durante la elaboración de los productos.
- Posibilidad de que entre los aerobios mesófilos pueda haber microorganismos patógenos, dado que también suelen ser mesófilos.

- Inmediata alteración del producto: tasas superiores o iguales a 1.000.000 – 10.000.000 de bacterias por gramo de producto alimentario suelen ser inicio de descomposición.

Entonces, para que sea posible establecer la carga de microorganismos mesófilos presentes en una muestra, es necesario propiciar el crecimiento de las células bacterianas en un medio de cultivo nutritivo sólido, lo que dará origen a las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de dichas bacterias. Para que el conteo de las colonias sea posible se deben hacer diluciones decimales de la suspensión inicial de la muestra y posteriormente se deben inocular en el medio de cultivo elegido. Luego, se incuban las cajas a 37 °C por 24-48 horas y finalmente se cuenta el número de colonias formadas, siendo posible calcular la cantidad de microorganismos por gramo o por mililitro de alimento (Cabrera & Passalacqua, 2014).

En la siguiente sección se describen las metodologías que se llevarán a cabo en esta práctica de laboratorio para analizar la carga microbiana mesófila de diversos ambientes, superficies y muestras.

4.3. Análisis de microorganismos mesófilos en diversos ambientes, superficies y muestras

4.3.1. Microorganismos mesófilos del aire

1. Disponga una caja de Petri con Agar Plate Count (PCA) sobre cualquier lugar en el laboratorio u otro espacio.
2. Remueva la tapa y déjela a un lado sin invertirla.
3. Deje la caja abierta por 15 minutos (Figura 4.1.).
4. Márquela indicando que es la caja expuesta al aire.
5. Coloque la tapa sobre la caja, inviértala e incúbela por 48 horas a 37 °C.



Figura 4.1. Método de exposición a ambientes.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.2. Microorganismos mesófilos de tejidos vivos o mucosas

1. Cerca al mechero, tome un hisopo estéril y humidézcalo con agua peptona 0.1 % contenida en un tubo de ensayo (3 mL); después, frótelo sobre cualquier parte de la superficie del cuerpo o mucosa.
2. Inocule una caja de agar Plate Count realizando una estría en sentido vertical en el centro del agar, y posteriormente, realizando estrías en forma de zigzag sobre toda la superficie del medio de cultivo

(Figura 4.2.).

3. Coloque la tapa sobre la caja, inviértala e incúbela por 48 horas a 37 °C.

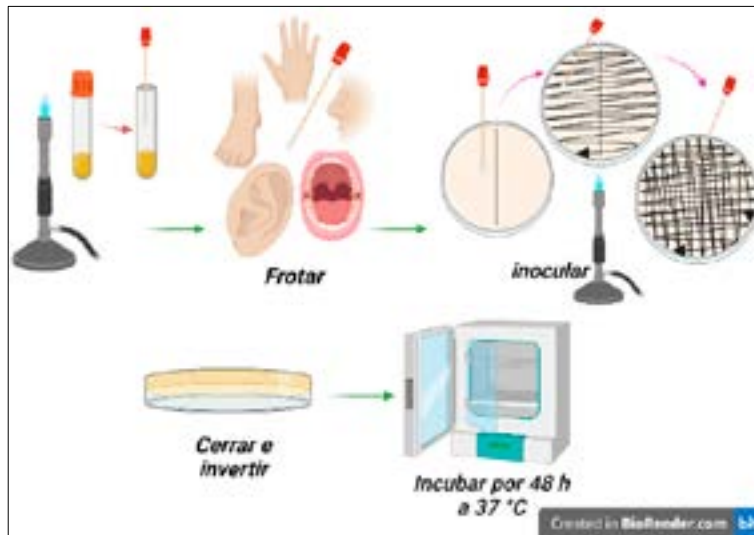


Figura 4.2. Hisopado en tejidos vivos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.3. Microorganismos mesófilos de superficies

1. Tome un hisopo estéril y humedézcalo con agua peptona 0.1 %, frótelo sobre la superficie de la mesa de trabajo o alguna superficie inerte de su interés.
2. Ponga el hisopo dentro del tubo de ensayo que tiene agua peptona 0.1 %, cierre el tubo de ensayo.
3. Cerca al mechero, inocule una caja de agar Plate Count realizando una estría en sentido vertical en el centro del agar, y posteriormente, realizando estrías en forma de zigzag sobre toda la superficie del medio de cultivo, sin romper el agar (Figura 4.3.).
4. Tape la caja, inviértala y márkela adecuadamente.
5. Incube a 37 °C por 48 horas.

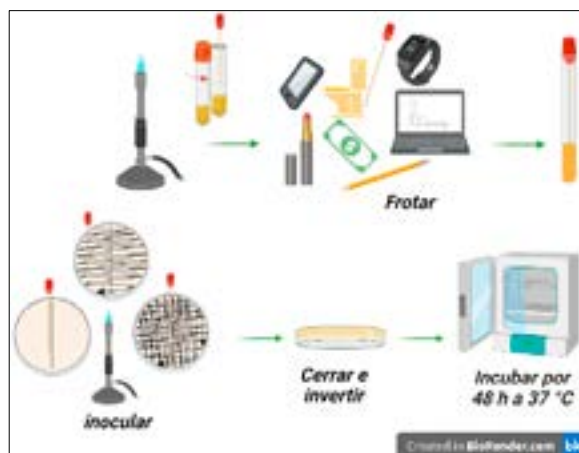


Figura 4.3. Hisopado de superficies inertes.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.4. Microorganismos mesófilos en muestras de alimentos

4.3.4.1. Recuento en placa mediante siembra en profundidad²

El recuento obtenido mediante esta siembra se considera indicador del grado de contaminación o carga microbiana de los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción, también se utiliza como indicador de la vida útil de un producto (Basak & Shetty, 2021; Cabrera & Passalacqua, 2014).

4.3.4.1.1. Preparación de la suspensión inicial (10^{-1})

1. En un recipiente estéril (bolsa de plástico o frasco) pese una masa o volumen de mínimo 10 g o 10 mL de la muestra (en caso de que se indique una cantidad diferente, modifique la masa o volumen).
2. Adicione una cantidad del diluyente (agua peptonada o solución salina fisiológica con peptona al 0.1 %) igual a 9 mL por cada gramo o mililitro de la muestra, en este caso, 90 mL (se obtiene la dilución 1/10).
3. Homogenice realizando movimientos circulares al recipiente, durante 1 a 3 minutos, dependiendo del alimento (Figura 4.4.).

Nota: es importante tener en cuenta que la temperatura a la cual se encuentre el diluyente debe ser próxima a la temperatura ambiente, para evitar un cambio demasiado brusco para los microorganismos presentes en la muestra. También, en algunos casos, puede llegar a ser necesario utilizar una mayor cantidad de diluyente, y esto debe ser tenido en cuenta para las operaciones el cálculo y expresión de resultados (productos muy viscosos o muy espesos).



Figura 4.4. Preparación de la suspensión inicial bacteriana.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

² Procedimiento según International Standard Organization (ISO 4833-1:2013 Horizontal Method for the Enumeration of Microorganisms - Part 1: Colony Count at 30 °C by the Pour Plate Technique, n.d.)

4.3.4.1.2. Preparación de las diluciones decimales (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc)

1. Con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL o una micropipeta de volumen adecuado, transfiera 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) a un tubo con 9 mL del diluyente estéril.
2. Mezcle muy bien durante 5 a 10 segundos, y así obtendrá la dilución 10^{-2} .
3. Tome 1 mL de la dilución 10^{-2} , y transféralo a un tubo con 9 mL del diluyente estéril. Mezcle adecuadamente para obtener la dilución 10^{-3} .
4. Repita el paso anterior para obtener las diluciones que sean necesarias para conseguir un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (Figura 4.5.).

Nota: para tener una óptima precisión en la realización de las diluciones, cuando tome el volumen de la suspensión inicial, no introduzca la pipeta más de 1 cm en esta. Posteriormente, en las diluciones decimales, evite el contacto entre la pipeta que contiene el inóculo y el diluyente estéril. Además, cambie de pipeta o de punta para micropipeta entre cada dilución. Adicional a esto, es importante tener en cuenta que el número de diluciones a realizar y sembrar dependerá de la naturaleza y carga microbiana estimada de la muestra a analizar.

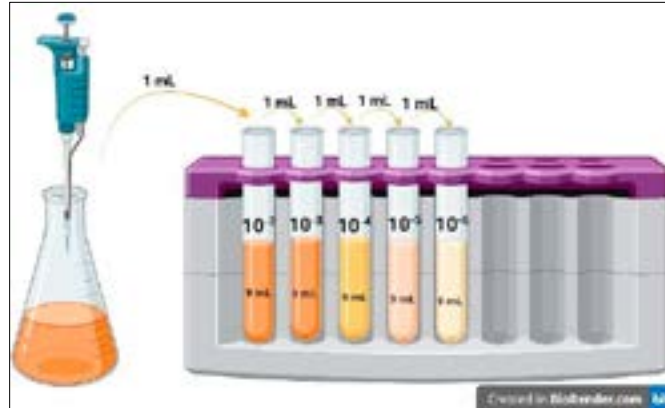


Figura 4.5. Preparación de las diluciones seriadas a partir de la suspensión inicial bacteriana.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.4.1.3. Inoculación e incubación

1. Seleccione tres diluciones decimales consecutivas, las cuales deben ser críticas para el recuento y expresión de resultados (aquellas en las que se espera obtener recuentos entre 10 y 300 colonias por placa).
2. Con ayuda de una pipeta estéril o micropipeta, transfiera 1 mL de la primera dilución seriada elegida, en dos (2) cajas de Petri estériles (1 mL en cada una de las cajas, debido a que el procedimiento se realiza por duplicado).
3. Vierta 15-20 mL de agar Plate Count (PCA) enfriado a 44°C - 47°C en cada caja de Petri, evitando verter directamente el medio sobre el inóculo.
4. Mezcle cuidadosamente el inóculo con el medio de cultivo realizando movimientos suaves a la caja de Petri (Figura 4.6.).
5. Repita los últimos tres pasos, con las dos diluciones seriadas restantes, utilizando una pipeta estéril o puntas estériles nuevas para cada dilución decimal.
6. Deje solidificar todas las cajas de Petri sobre una superficie horizontal, a temperatura ambiente.
7. Invierta las placas e incube a 30°C - 37°C por 24-48 horas.

Nota: la elección de las diluciones decimales a realizar y sembrar, dependerá de la carga estimada de microorganismos en la muestra, de tal manera que se pueda realizar el recuento de las UFC presentes en cada placa.

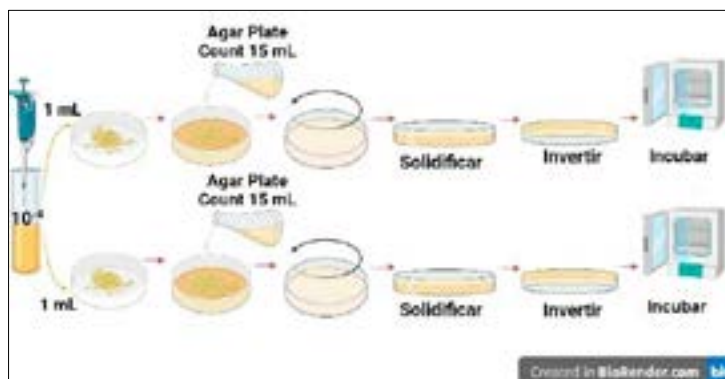


Figura 4.6. Procedimiento para realizar una siembra en profundidad por duplicado

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.4.1.4. Lectura y cálculo de resultados

Seleccione las placas correspondientes a la dilución que contenga entre 30 y 300 colonias; cuente las colonias que aparezcan en las cajas (tener en cuenta el promedio de los duplicados), este número se divide por la multiplicación de: el volumen sembrado (0.1 mL o 1 mL, si es en superficie o profundidad, respectivamente), *por* la constante 1.1 y *por* el factor de dilución elegido. Si el crecimiento de los microorganismos fue masivo, pero bien distribuido en toda la placa, esta se divide en 4 partes iguales y se realiza el conteo de una de las cuartas partes, luego, el resultado se multiplica por 4 y finalmente por el factor de dilución.

Nota: revisar la norma ISO 7218:2007 para mayor información sobre cálculo de resultados.

4.3.4.2. Recuento en placa mediante siembra en superficie³

Si bien en la siembra en superficie también se busca realizar un conteo de la carga microbiana de los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción, este método de siembra debe ser elegido en casos más específicos, como los descritos a continuación (Cabrera & Passalacqua, 2014):

- Cuando la muestra a analizar contenga microorganismos sensibles al calor, de tal forma que estos representen una proporción significativa de la microbiota total (por ejemplo, microorganismos psicrótrofos presentes en alimentos refrigerados y congelados, alimentos desecados, entre otros).
- Cuando el producto tenga presente una proporción significativa de bacterias aerobias estrictas.
- Cuando por naturaleza el producto contenga partículas pequeñas, que puedan llegar a ser confundidas con unidades formadoras de colonia (UFC) si se elige una siembra en profundidad.
- Cuando la muestra presente como característica un color intenso, que impide el reconocimiento de las unidades formadoras de colonia (UFC) si se elige una siembra en profundidad.
- Cuando es requerido distinguir entre distintos tipos de colonias presentes en la muestra, como parte de la garantía de la calidad alimentaria.

³ Procedimiento según International Standard Organization ISO 4833-2:2013

4.3.4.2.1. Preparación de la suspensión inicial y diluciones seriadas

Proceda de la misma manera que se describe en 4.3.4.1.1. y 4.3.4.1.2. **Preparación de la suspensión inicial y diluciones decimales.**

4.3.4.2.2. Inoculación e incubación

1. Seleccione tres diluciones decimales consecutivas, las cuales deben ser críticas para el recuento y expresión de resultados (aquellas en las que se espera obtener recuentos entre 10 y 300 colonias por placa).
2. Con ayuda de una pipeta estéril o micropipeta, transfiera 0.1 mL de la primera dilución seriada elegida, en la superficie de dos (2) cajas de Petri con medio de cultivo PCA (0.1 mL en cada una de las cajas).
3. Cuidadosamente, extienda el inóculo de manera uniforme, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el asa de Digralsky esterilizada (siembra masiva) (Figura 4.7.).
4. Repita los últimos dos pasos, con las dos diluciones decimales seriadas restantes, utilizando una pipeta o puntas estériles nuevas para cada dilución decimal.
5. Deje las cajas a temperatura ambiente por 15 minutos para que el inóculo sea absorbido por el agar.
6. Invierta las cajas preparadas e incube a 30 °C – 37 °C por 24-48 horas.

Nota: puede usar la misma asa para todas las diluciones de la misma muestra, comenzando con la mayor dilución y progresando en orden hacia la dilución con mayor cantidad de la muestra o menos diluida. También es válido esterilizar el asa cada vez que vaya a sembrar una dilución decimal diferente de la misma muestra.

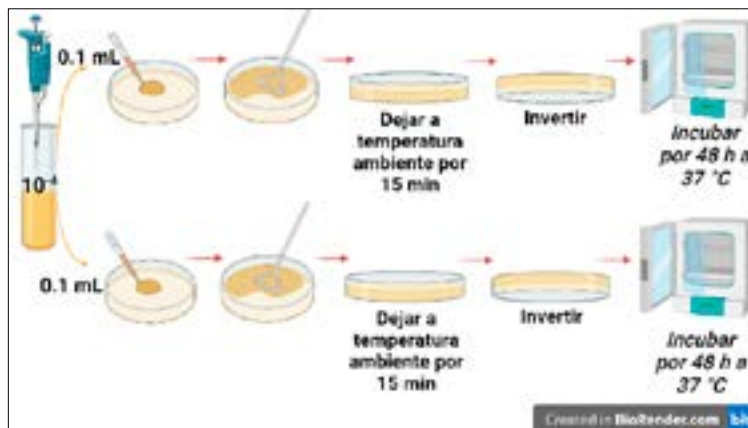


Figura 4.7. Procedimiento para realizar una siembra en superficie.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.4.2.3. Lectura y cálculo de resultados

Proceda de la misma manera que se describe en 4.3.4.1.4. **Lectura y cálculo de resultados.**

4.3.5. Microorganismos psicrófilos en muestras de alimentos

Aplica a bacterias que tienen como temperatura óptima de crecimiento 5-15 °C. En este punto se encuentran especies de *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* y *Streptococcus* (Ramírez Aristizábal, n.d.)

4.3.5.1. Procedimiento

1. Lleve a cabo la preparación de la suspensión inicial (tenga en cuenta que en este caso el alimento a analizar requiere cadena de frío para su conservación, por ejemplo, un helado), las diluciones seriadas e inoculación, como se describe en 4.3.4.1.1. y 4.3.4.1.2. **Preparación de la suspensión inicial y diluciones decimales, y 4.3.4.2.2. Inoculación** (Figura 4.8.).
2. Incube las cajas de Petri inoculadas a 7 °C, durante 8 días.

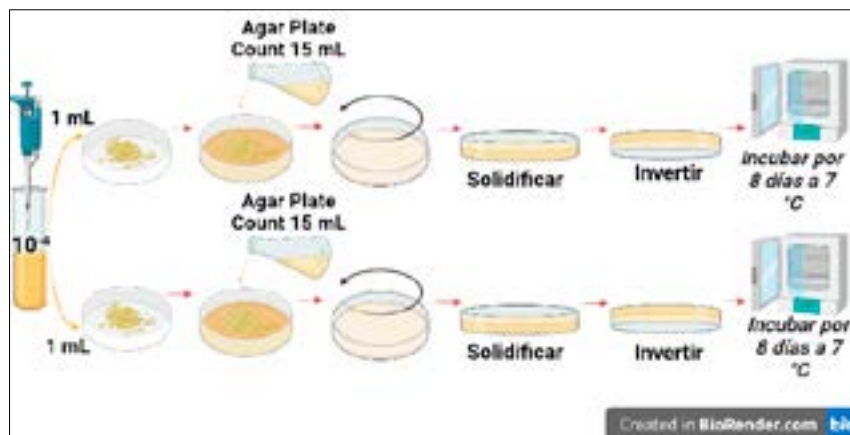


Figura 4.8. Análisis de microorganismos psicrófilos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.5.2. Lectura y cálculo de los recuentos

Proceda de la misma manera que se describe en 4.3.4.1.4. **Lectura y cálculo de resultados.**

4.3.6. Microorganismos termodúricos en muestras de alimentos

Las bacterias pertenecientes a este grupo sobreviven a temperaturas de pasteurización, e influyen en los recuentos altos en este tipo de leche. Esto implica de cierto modo, que el tiempo de destrucción térmica de estas bacterias es largo, lo que quiere decir que requieren estar expuestas por buen tiempo a una temperatura definida, para que sus formas vegetativas o esporas, sean destruidas. Algunos géneros bacterianos termodúricos son *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, entre otros. Por otro lado, las bacterias termodúricas esporuladas se dividen en dos grupos principales: *Bacillus* y *Clostridium*. Estos microorganismos pueden llegar a la leche a través de utensilios, ganado, establos sucios y plantas de pasteurización que no cumplan con las condiciones sanitarias necesarias para evitar que proliferen este grupo de bacterias. Además, pueden hallarse en enlatados, conservas, carnes frías y todos los alimentos que para su esterilización necesitan ser sometidos a altas y bajas temperaturas; como las gelatinas, concentrados y alimentos envasados a presión (Ramírez Aristizábal, n.d.).

4.3.6.1. Procedimiento

1. Lleve a cabo la preparación de la suspensión inicial como se describe en 4.3.4.1.1. **Preparación de la suspensión inicial.** Para analizar estos microorganismos, parta de una muestra de alimento que deba ser sometida a procesos de pasteurización, como la leche.
2. Homogenice la suspensión inicial (10 mL de leche + 90 mL de diluyente) y transfiera 5 mL a un tubo de ensayo con tapa rosca.
3. Coloque el tubo en un baño María a 63 °C por 30 minutos.

- Enfríe inmediatamente el tubo en una cubeta con hielo por aproximadamente 5 minutos (Figura 4.9).
4. Agite el tubo y realice diluciones seriadas hasta 10^{-3} (como se indica en el numeral **4.3.4.1.2. Diluciones decimales**)
 5. Lleve a cabo el proceso de inoculación como se describe en **4.3.4.2.2. Inoculación**.
 6. Incube las cajas de Petri inoculadas a 35-37 °C por 24 - 48 horas.
 7. Haga el recuento correspondiente como se indica en **4.3.4.1.4. Lectura y cálculo de resultados**, e informe como # de UFC termodúricas/mL de alimento.



Figura 4.9. Preparación de la suspensión inicial para analizar microorganismos termodúricos.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

4.3.7. Análisis de resultados

Una vez haya transcurrido el tiempo de incubación para cualquiera de las metodologías descritas con anterioridad, es sugerido realizar una descripción de las características morfo culturales de los microorganismos que se desarrollaron en el medio de cultivo, así como también, hacer tinciones para conocer las morfologías microscópicas de los mismos.

1. Observe el desarrollo microbiano en cada una de las cajas de Petri con Agar Plate Count.
2. Si es posible, realice un recuento de las UFC presentes en las placas.
3. Tome nota de las características individuales de las colonias desarrolladas y realice una breve clasificación o identificación, usando la siguiente información:
 - a. Color
 - b. Consistencia
 - c. Forma
 - d. Tamaño
 - e. Otras observaciones (lugar de procedencia)
4. Compare sus resultados con los de otro compañero, y relacione las conclusiones en su informe de laboratorio.
5. Realice tinción a las colonias de su interés.
6. Observe las placas en el microscopio.

4.4. Actividad interactiva

A continuación, encontrará un simulador de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

<https://virtuallabs.nmsu.edu/equip.php>

Fuente: (Virtual Labs, 2021)

4.5. Actividad práctica

Con base en la fundamentación teórica y el simulador de esta práctica de laboratorio, desarrolle la siguiente actividad propuesta.

- Responda las siguientes preguntas
- 1. ¿Qué ventajas y desventajas hay en el uso de consumibles reutilizables en las prácticas de laboratorio, cómo supliría esa desventaja?
- 2. ¿Qué diferencia hay entre las placas Petrifilm 3M y el agar tradicional para cultivo bacteriano?
- 3. ¿Para tomar la muestra de leche se usó una pipeta Pasteur, con qué otro instrumento de laboratorio podría tomar 1 mL de muestra?
- 4. Si al momento de tomar la muestra no tenemos el colector Quick Swab 3M, ¿De qué otra forma realizaría el muestreo en la superficie de los tanques de almacenamiento de leche?
- 5. ¿Qué conclusión puede inferir luego de haber hecho el recuento de *E. coli* en los tanques de almacenamiento? Indique las posibles causas de los resultados obtenidos.
- 6. ¿Cuál es la importancia de las normas técnicas en la ejecución de procedimientos en un laboratorio de análisis microbiológico?
- 7. Nombre y describa el alcance de 3 normas técnicas nacionales e internacionales aplicables para el análisis microbiológico de muestras de alimentos.

5

**CAPÍTULO
CINCO**

Capítulo cinco. control de poblaciones microbianas por agentes químicos

5.1. Resultados de aprendizaje

- Compara el efecto bactericida y bacteriostático de diferentes agentes antimicrobianos, mediante la evaluación de variables como tiempos de exposición y concentración.
- Estima la susceptibilidad de los microorganismos frente a agentes antimicrobianos a través de la medición de halos de inhibición en un antibiograma.

5.2. Fundamentación teórica

Como es bien sabido, los microorganismos son los organismos más primitivos y numerosos que colonizan la tierra, son vitales en cualquier ambiente donde se encuentren presentes como microbiota normal pues están involucrados en procesos metabólicos, ecológicos y biotecnológicos de los cuales dependemos para sobrevivir, así, están en constante interacción con humanos, plantas y animales. La importancia de los microorganismos radica, como se mencionó con anterioridad, en que intervienen en numerosos procesos fundamentales para el mantenimiento de la vida en el planeta, esto gracias a su alta eficiencia metabólica, lo que les permite adaptarse casi a cualquier ambiente o condición. Por ejemplo, participan en la descomposición de materia orgánica y ciclaje de nutrientes; sin ellos, viviríamos entre montañas de materia orgánica que se acumularía ilimitadamente. También, producen de forma natural diversos compuestos que son utilizados como antibióticos en la industria farmacéutica, como la penicilina, sintetizada por *Penicillium notatum* y *Penicillium chrysogenum*. La industria alimentaria de igual manera se beneficia de los subproductos microbianos o de los microorganismos en su forma vegetativa, como en la utilización de vitamina B12 proveniente de bacterias del género *Lactobacillus*, para su adición al yogurt, lo que mejora sus propiedades nutricionales. Como estos, existen un sinfín de posibilidades y ejemplos en la utilización de microorganismos para dar solución a problemas cotidianos (Montaño Arias et al., 2010).

Sin embargo, en algunas ocasiones los microorganismos pueden convertirse en patógenos (causan daño a la salud humana, animal o vegetal), causantes de diversas enfermedades que en algunas ocasiones tienen una elevada mortalidad. Entre las enfermedades más conocidas atribuidas a la presencia de patógenos se encuentra la lepra causada por *Mycobacterium leprae*, la peste atribuida a *Yersinia pestis*, el cólera, que tiene como agente etiológico a la bacteria *Vibrio cholerae*, o la amibiasis, causada por la amiba *Entamoeba histolytica*. Más recientemente, se pueden mencionar los millones de muertes causadas por los virus tipo SARS, como el Coronavirus (Montaño Arias et al., 2010). Por este motivo, se hizo necesario encontrar métodos que facilitarían la eliminación de dichos microorganismos, de ambientes donde no generen un beneficio o simplemente no sean deseados.

Existen diversos protocolos para controlar poblaciones microbianas indeseadas, entre estos se pueden encontrar agentes de esterilización físicos, como temperatura y radiaciones, y agentes de esterilización químicos, como desinfectantes, antisépticos y antibióticos. Dichos métodos de esterilización, pueden llegar a tener una acción microbiocida sobre los microorganismos, lo que quiere decir que son eliminadas las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas del microorganismo. O una acción microbiostática, pues su crecimiento se ve inhibido, pero no indica que son eliminados de forma definitiva (Mateos, n.d.).

5.2.1. Agentes esterilizantes físicos

Altas temperaturas

La temperatura es considerada como uno de los parámetros ambientales más importantes que condicionan directamente el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos. Cada especie exhibe una

temperatura de crecimiento óptima, donde todas sus funciones metabólicas vitales son llevadas a cabo de forma regular, pero ciertas temperaturas elevadas combinadas con un alto grado de humedad, eliminan casi todas las formas vegetativas y de resistencia de los microorganismos. La esterilización de una suspensión microbiana puede ser medida de forma práctica mediante parámetros como (Agentes Físicos, 2020):

- Tiempo térmico mortal: es el tiempo mínimo que se requiere para que mueran todos los microorganismos de una suspensión a una temperatura determinada.
- Tiempo de reducción decimal: es el tiempo requerido para que se reduzca al 10 % la densidad de la suspensión, a una temperatura determinada.
- Punto térmico mortal: es la temperatura mínima que mata a todas las bacterias en un tiempo determinado.

En este método de esterilización se puede elegir entre el calor húmedo, que se basa en la coagulación de proteínas, y calor seco, que oxida los constituyentes químicos de los microorganismos. Sin embargo, ambos tipos de calor son efectivos en la esterilización de ambientes, superficies, materiales o equipos. Sin embargo, debe tenerse claro que la acción letal del calor es una relación de temperatura y tiempo que se ve influenciada por muchas condiciones (Tabla 5.1.). Así, las esporas de *Clostridium botulinum* son destruidas en 4 a 20 minutos a 120° C en calor húmedo, mientras que se necesitan alrededor de 2 horas de exposición al calor seco para obtener los mismos resultados (Mateos, n.d.).

Tabla 5.1. Ejemplos de condiciones de inactivación total por calor húmedo.

| Microorganismos | Condiciones |
|---|----------------------|
| La mayoría de células vegetativas, de bacterias, levaduras y hongos | 80 °C, 5-10 min |
| Bacilo tuberculoso | 58 °C, 30 min |
| Bacilo tuberculoso | 59 °C, 20 min |
| Bacilo tuberculoso | 65 °C, 2 min |
| <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> | 60 °C, 60 min |
| La mayoría de esporas de bacterias patógenas | 100 °C, pocos min |
| Esporas del patógeno <i>Clostridium botulinum</i> | 100 °C, 5.5 horas |
| Esporas de <i>Clostridium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp. y saprofitos | 100 °C, muchas horas |
| Esporas de <i>Clostridium</i> y <i>Bacillus</i> saprofitos | 120 °C, 15 min |

Fuente: (Agentes Físicos, 2020)

a. Esterilización por calor húmedo

Autoclave

Este método fue introducido por Chamberland en 1884; es llevado a cabo utilizando un equipo conocido como autoclave, olla que regula la presión interna y el tiempo del proceso de esterilización. Este equipo se emplea en el laboratorio generalmente a una presión de vapor de una atmósfera por encima de la presión atmosférica, lo que corresponde a una temperatura de 120 °C. El tiempo del ciclo que realiza el equipo depende del volumen del líquido a esterilizar, así, para volúmenes pequeños (hasta unos 3 litros) se utilizan un ciclo de 20 minutos a 120 °C. Si los volúmenes son mayores debe alargarse el tiempo de tratamiento. Algunos materiales no se deben esterilizar, como sustancias que no se mezclan con el agua pues sobreviven los microorganismos contenidos en el material. Otras sustancias se alteran o son destruidas por tratamientos prolongados de calor empleándose en estos casos otros métodos de esterilización (Mateos, n.d.). Se puede emplear para la esterilización de material contaminado, medios de cultivo y líquidos termoestables (Pedrique de Aulacio et al., 2008).

Pasteurización

Es un proceso utilizado en la eliminación de microorganismos patógenos en productos lácteos, vinos, cerveza y jugos, donde la temperatura se selecciona basándose en el tiempo térmico mortal de los microorganismos patógenos presentes en la muestra. Por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*, uno de los patógenos más resistentes al calor que puede transmitirse por la leche cruda, se destruye en 15 minutos a 60 °C, pero usualmente un ciclo de pasteurización se realiza a 63 °C por 30 minutos. Una vez finalizado el proceso de pasteurización, el número de bacterias viables desciende un 97-99 %, pues los patógenos que pueda llevar la leche de forma potencial (*Brucella*, *Salmonella*, *Streptococcus*, etc) son eliminados fácilmente (Pedrique de Aulacio et al., 2008) (Agentes Físicos, 2020).

b. Esterilización por calor seco

Este tipo de esterilización recurre a mayores temperaturas, ya que, al no existir agua en el proceso, la ruptura de puentes de hidrógeno y la desnaturalización de proteínas, así como la fusión de membranas, se efectúan a mayores energías.

Horno Pasteur

Es un equipo que se usa para esterilizar material de vidrio y otros materiales sólidos que sean estables al calor. Para el material de vidrio de laboratorio se consideran suficientes dos horas de exposición a 160 °C (Mateos, n.d.).

Incineración

Esta es una práctica rutinaria en laboratorios, pues ayuda a destruir de forma rápida microorganismos presentes en materiales inertes como asas metálicas empleadas para realizar siembras en superficie. Estas asas se calientan a la llama de mecheros Bunsen, hasta el rojo vivo. La incineración también se utiliza en la eliminación de residuos hospitalarios (Mateos, n.d.)

Bajas temperaturas

El metabolismo de la mayoría de bacterias es inhibido a temperaturas por debajo de 0° C, sin contar a los microorganismos psicrófilos o psicrótrofos. Sin embargo, en general las temperaturas bajas no son utilizadas con fines de esterilización, pues más allá de afectar irreversiblemente a los microorganismos, tienen en realidad un efecto microbiostático sobre estos. Por esto, algunos factores fundamentales para que estas temperaturas sean más efectivas, son el modo en que se realice la congelación y la posterior descongelación (Mateos, n.d.) (Agentes Físicos, 2020).

Cuando estos factores son manipulados correctamente tienen como consecuencia la desnaturalización de proteínas, daños a la membrana, daño mecánico a la pared celular, todo esto provocado por los cristales de hielo que se generan por efecto de la temperatura tan baja. Entonces, el enfriamiento rápido es más lesivo que el lento, y la descongelación lenta es más letal que la rápida (Agentes Físicos, 2020).

a. Radiaciones

La radiación es interpretada como la propagación de energía por el espacio, y es utilizada para eliminar microorganismos ya que tiene efectos irreversibles sobre estos, como daños en el ADN y en sus organelas (Tabla 5.2.).

Tabla 5.2. Tipos de radiaciones que pueden tener efectos sobre los seres vivos.

| Radiación electromagnética | λ. (longitudes de onda, en nm) |
|-----------------------------------|--|
| Radiación infrarroja (IR) | 800 – 10 ⁶ |
| Radiación visible | 380 – 800 |
| Ultravioleta (UV) | 13,6 – 380 |
| Rayos X | 0,14 – 13,6 |
| Rayos γ | 0,001 – 0,14 |
| Rayos cósmicos | < 0,001 |

Fuente: (Agentes Físicos, 2020)

Radiaciones ionizantes

Las radiaciones ionizantes tienen efectos letales sobre los microorganismos, pueden ser directos, indirectos, así como mutagénicos. Los efectos letales directos se logran a altas dosis de radiación, mientras que los letales indirectos y mutagénicos se consiguen a menores dosis, teniendo como objetivo principalmente el daño o ruptura del ADN bacteriano. Algunas fuentes de radiaciones ionizantes son los equipos de rayos X, los rayos Gamma y los radioisótopos, como el ⁶⁰Co o el ¹³⁷Cs. Estas radiaciones se emplean para esterilizar materiales farmacéuticos, material quirúrgico y alimentos envasados (Agentes Físicos, 2020).

Radiaciones no ionizantes

El tipo de radiación no ionizante más común es la luz ultravioleta (UV), debido a que los ácidos nucleicos y las proteínas de los microorganismos absorben esta radiación, sufriendo modificaciones químicas. Algunas de esas modificaciones son la formación de dímeros de timina; que ocasiona lecturas erróneas del código genético, produciendo mutaciones que imposibilitan las funciones vitales de los microorganismos; por lo tanto, mueren. La longitud de onda más efectiva para matar los microorganismos es de 200-295 nm (efecto microbicida) (Pedrique de Aulacio et al., 2008).

b. Filtración

La filtración consiste en hacer pasar un líquido o un gas a través de un material poroso (como una membrana de filtración) de tamaño lo suficientemente pequeño para retener a los microorganismos. Este método es elegido cuando se trabaja con muestras líquidas termolábiles (suero de animales, soluciones de enzimas, algunas vitaminas y antibióticos), o cuando las radiaciones son perjudiciales para la muestra y por lo tanto se vuelven imprácticas para esterilizarlos (Pedrique de Aulacio et al., 2008).

Filtros de membrana

Son discos de ésteres de celulosa que están conformados por poros de un tamaño tan reducido, que evita el paso de los microorganismos que estén presentes en la muestra. Estos filtros son desechables, y pueden ser utilizados en la esterilización de líquidos, ya que concentran los microorganismos existentes en grandes volúmenes de agua (Mateos, n.d.).

5.2.2. Agentes esterilizantes químicos

Ciertas sustancias químicas influyen negativamente sobre las bacterias, teniendo efectos de tipo bactericida o bacteriostático. Algo importante es que el tiempo de exposición y la concentración del agente químico, es lo que realmente determina el tipo de efecto que tenga sobre los microorganismos (Agentes Químicos, 2020).

Los agentes esterilizantes son aquellos que causan la pérdida irreversible de la viabilidad de cualquier forma de vida microbiana. Dentro de dichos agentes esterilizantes podemos encontrar los agentes desinfectantes, también conocidos como agentes antimicrobianos, estos tienen la capacidad de eliminar los microorganismos presentes en materiales o superficies inertes, teniendo un efecto microbiocida sobre estos (pueden ser tóxicos cuando son utilizados sobre tejidos vivos). También se pueden encontrar agentes antisépticos, los cuales tienen baja toxicidad sobre tejidos vivos, y tienen como finalidad oponerse a la sepsis o putrefacción de este tipo de tejidos, teniendo un efecto microbiostático sobre los microorganismos presentes. Además; los agentes quimioterápicos o antibióticos se incluyen dentro de los agentes esterilizantes; estos pueden tener efectos microbiocidas o microbiostáticos, y son suministrados al organismo en determinadas concentraciones para que se puedan controlar por ejemplo infecciones de tipo bacteriano (Agentes Químicos, 2020).

Existen algunas condiciones que influyen directamente sobre la acción antimicrobiana de los agentes esterilizantes, algunas de ellas son: la temperatura, el tipo de microorganismo a controlar y el número de microorganismos presentes en la superficie o ambiente a desinfectar. Cuando la temperatura se eleva tiene una mayor acción frente a los microorganismos; por ejemplo, cuando a algunos agentes se les eleva la temperatura 10 °C, estos logran duplicar la tasa de muerte microbiana. El tipo de microorganismo a eliminar o controlar es igualmente decisivo en el momento de elegir un agente esterilizante. En este sentido, se debe conocer la fase en la cual se encuentre el microorganismo (las formas vegetativas son más susceptibles que las formas de resistencia (esporas o cápsulas)), y la especie blanco (el bacilo tuberculoso es altamente resistente a los desinfectantes oxidantes) (Mateos, n.d.).

La presencia de materiales extraños (materia orgánica) sobre las superficies inertes o vivas puede afectar la acción de los agentes esterilizantes, pues reducen notablemente la eficacia de los agentes químicos antimicrobianos. El pH de los agentes condiciona de igual manera su eficacia, así, los agentes aniónicos son más efectivos a pH ácidos, y los agentes catiónicos a pH básicos. Por último; pero no menos importante, la concentración del agente y el tiempo de exposición sobre los microorganismos, determinan su pérdida irreversible de viabilidad (Mateos, n.d.) (Agentes Químicos, 2020).

Desinfectantes y antisépticos

Como se mencionó anteriormente, la diferencia principal entre un agente desinfectante o antiséptico radica en la superficie sobre la cual pueda ser aplicado; ya sea inerte o viva, pues a grandes rasgos la finalidad de ambos tipos de agentes es inhibir o eliminar por completo determinada población microbiana (Bilbao, 2009).

Un agente desinfectante debe tener:

La capacidad de eliminar microorganismos y tener un amplio espectro de acción; debe ser soluble en agua u otro tipo de solventes; es importante que sea estable, pues no se puede ver alterado en condiciones de almacenamiento; debe ser homogéneo, de tal manera que los compuestos activos estén presentes cada vez que se use el desinfectante; debe poder penetrar las superficies sobre las cuales se aplique; algunos desinfectantes también poseen capacidad detergente. Las características descritas anteriormente son compartidas por los agentes antisépticos; excepto que estos no deben penetrar las superficies sobre las cuales son aplicados. Además, los antisépticos deben actuar con rapidez frente al microorganismo; debe tener una duración de acción suficiente y debe garantizar la inocuidad local; y, sobre todo, sistémica (Pedrique de Aulacio et al., 2008).

Los principales grupos de agentes químicos que son utilizados como agentes desinfectantes o antisépticos son:

1. **Compuestos fenólicos:** exhiben acción microbiocida frente a bacterias en su forma vegetativa, hongos y virus; sin embargo, no tienen acción frente a esporas bacterianas. Son ampliamente utilizados a nivel industrial, ya que actúan directamente sobre las proteínas y membranas de los microorganismos, lo que ocasiona su muerte. Algunos ejemplos son el fenol al 5 %, el hexaclorofenol y el lysol.
2. **Alcoholes:** tiene acción frente a formas vegetativas bacterianas, pero no frente a sus formas de resistencia; su eficacia es variable frente a hongos y virus. Actúan al desnaturalizar proteínas y disolver lípidos presentes en las membranas celulares. Algunos ejemplos son el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el clorobutanol 0,5 % y el alcohol bencílico 2 %. En este grupo de agentes químicos hay un buen ejemplo de que la mayor concentración de un producto, no es necesariamente la más efectiva; y además, de que el tiempo de exposición influye en la eliminación de los microorganismos. El alcohol usualmente se emplea a una concentración de 95 %, pero la mayor actividad bactericida la presenta al 70 %; donde elimina el 90 % de las bacterias de la piel si se mantiene húmeda durante dos minutos, mientras que la clásica fríega con algodón empapado en alcohol destruye como máximo un 75 % de las bacterias.
3. **Halógenos:** en este grupo está incluido el yodo; altamente efectivo como bactericida de casi cualquier especie bacteriana. Su acción se debe a la combinación del yodo molecular con proteínas celulares, y se emplea como antiséptico en solución hidroalcohólica 2 %. También se incluye en este grupo el cloro y demás compuestos clorados; eliminan la mayoría de células vegetativas bacterianas, y algunos virus y hongos. Su eficacia es atribuida a la capacidad de oxidar compuestos celulares. Una limitante de estos compuestos es que son inactivados en presencia de materia orgánica, por lo que las superficies deben estar completamente limpias cuando estos son aplicados.
4. **Compuestos cuaternarios de amonio:** tienen acción detergente; logran romper la membrana plasmática de los microorganismos pues disuelven lípidos, y pueden también desnaturalizar proteínas. En este grupo encontramos compuestos como la cetrimida y el cloruro de benzalconio (Pedrique de Aulacio et al., 2008) (Bilbao, 2009).

Quimioterápicos y antibióticos

Un agente quimioterápico se define como una sustancia química con actividad antimicrobiana; que puede ser microbiocida o microbiostática, y que interfiere directamente en la proliferación de un microorganismo cuando es suministrado a un organismo (huésped) en concentraciones tolerables para este. Los quimioterápicos deben tener toxicidad selectiva; lo que quiere decir que deben atacar el microorganismo objetivo, pero no las células del organismo huésped; no debe alterar los mecanismos de defensa natural del organismo huésped; y debe poder penetrar tejidos y células del huésped, para que así puedan entrar en contacto con el microorganismo que se desea eliminar (Rossi Devivo & Pedrique de Aulacio, 2008) (Agentes Químicos, 2020).

Estos agentes se pueden clasificar -según su mecanismo de acción- en: antibióticos que interfieren en la síntesis de la pared celular bacteriana; antibióticos que interfieren con el correcto funcionamiento de la membrana plasmática bacteriana; antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos; antibióticos que imposibilitan la síntesis proteica; y finalmente, sustancias análogas de metabolitos esenciales, conocidas como antimetabolitos (impiden que los microorganismos utilicen metabolitos exógenos o endógenos producidos por ellos mismos). A su vez, el término antibiótico hace referencia a sustancias naturales producidas por microorganismos, a productos de origen sintético y a formas químicamente modificadas de sustancias naturales, que logren matar o inhibir el desarrollo de microorganismos. En el grupo de las antimetabolitos se pueden encontrar las sulfas, trimetoprim, isoniazida, entre otros. Dentro de los antibióticos se encuentran las penicilinas, ampicilina, amoxicilina, tetraciclinas, estreptomycinas, entre otros (Rossi Devivo & Pedrique de Aulacio, 2008).

5.2.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes y antisépticos

Para establecer si un agente antimicrobiano tuvo acción letal frente a un microorganismo, es necesario llevar a cabo métodos cuantitativos de evaluación de viabilidad microbiana; como, por ejemplo, algún tipo de siembra en placa (recuento (UFC)). Lo anterior es adecuado, pues cuando un microorganismo pierde irreversiblemente la capacidad de reproducción en un medio de cultivo, es posible afirmar que ha sido eliminado por completo (Rossi Devivo & Pedrique de Aulacio, 2008).

En los siguientes ítems se describen las metodologías que se llevarán a cabo en esta práctica de laboratorio, para evaluar la actividad antimicrobiana de agentes químicos, en función de su concentración y tiempo de exposición.

5.3. Evaluación de actividad antimicrobiana por siembra en profundidad

5.3.1. Procedimientos previos

Con esta metodología se puede evaluar la concentración adecuada de los agentes químicos con capacidad antimicrobiana, y el tiempo de exposición necesario para que haya un efecto letal sobre los mismos.

5.3.1.1. Reactivación del cultivo microbiano

Para llevar a cabo esta metodología se requiere trabajar con cultivos microbianos en fase exponencial; por este motivo, es necesario reactivar las cepas de trabajo, máximo 24 horas antes de utilizarlas (Figura 5.1.).

1. Tome una porción del cultivo bacteriano que tenga disponible, e inocúlelo en un tubo de ensayo que contenga 5 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion).
 - Si parte de un cultivo sólido; tome inóculo múltiples veces, con ayuda de un asa metálica de redondel.
 - Si parte de un cultivo líquido; tome inóculo múltiples veces, con ayuda de una pipeta o micropipeta estéril.
2. Mezcle vigorosamente; de forma manual o con ayuda de un vortex.
3. Incube por 24 horas a 37 °C.

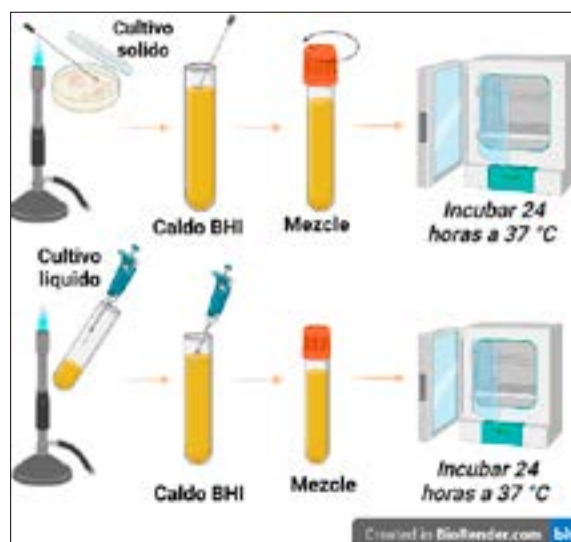


Figura 5.1. Reactivación del cultivo microbiano.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.1.2. Preparación de la suspensión bacteriana

Para realizar la suspensión bacteriana, se parte del cultivo reactivado 24 horas atrás. Dicha suspensión debe ser ajustada al patrón 0.5 de la escala de McFarland; que corresponde a una concentración de 1.5×10^8 células /mL (Figura 5.2.).

1. En un tubo de ensayo con agua destilada estéril (5 mL aproximadamente), adicione 500 μ l del cultivomicrobiano reactivado.
2. Con ayuda de un Densichek[®], mida la absorbancia de la suspensión bacteriana de trabajo; la cual debe ajustarse a 0.5 McFarland, cuyo rango aceptable de absorbancia se encuentra entre 0.44-0.56.
3. Reserve dicha suspensión para trabajar con ella posteriormente.

Nota: es necesario tener disponible agua destilada estéril y el cultivo microbiano reactivado, en caso de que se deba ajustar la suspensión bacteriana, pues puede suceder que la absorbancia no sea la indicada en el primer intento. Si la absorbancia está por encima del límite superior (0.56) adicione más cantidad de agua destilada estéril a la suspensión, hasta que se ajuste al patrón de 0.5 McFarland. Si, por el contrario, la absorbancia está por debajo del límite inferior (0.44), adicione más cantidad de cultivo microbiano, hasta que se ajuste al patrón.

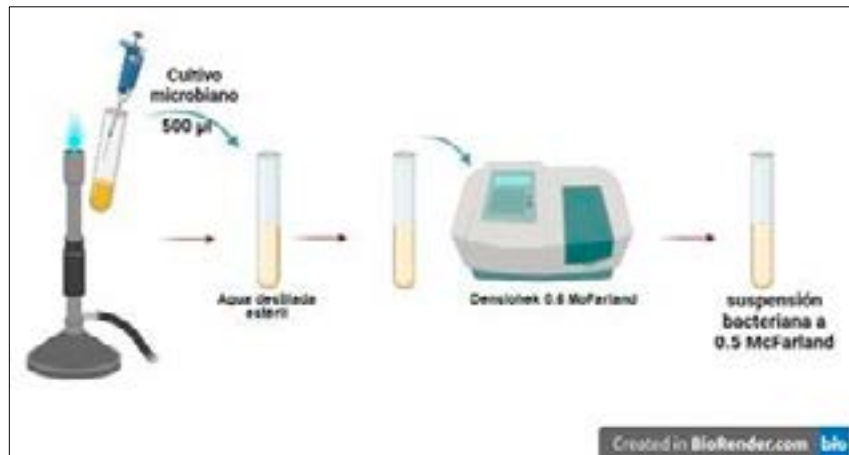


Figura 5.2. Preparación de la suspensión bacteriana.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.1.3. Preparación del agente químico a diferentes concentraciones

En este paso se preparan diferentes concentraciones del agente químico que se desee evaluar; por ejemplo, alcohol etílico o yodopovidona. Este proceso es similar a la realización de diluciones decimales seriadas para disminuir la carga microbiana de una muestra que se quiera sembrar (Figura 5.3.).

1. Tome 3 tubos de ensayo limpios; rotúlelos y ubíquelos en una gradilla, y adicione lo siguiente:
 - Tubo N°1: 10 mL del Agente Químico (AQ) de su elección (concentración comercial).
 - Tubo N°2: 9 mL de agua destilada + 1 mL del tubo N°1 (obtendrá la concentración 1/10)
 - Tubo N°3: 9 mL de agua destilada + 1 mL del tubo N°2 (obtendrá la concentración 1/100).
2. Homogenice y reserve.

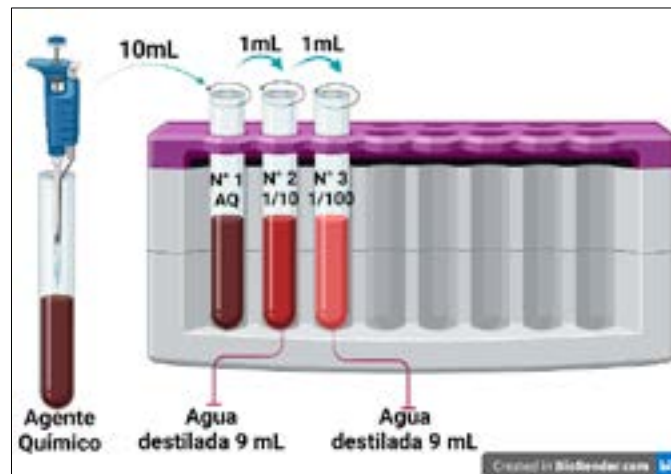


Figura 5.3. Preparación de la solución química a diferentes concentraciones.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.1.4. Preparación de las soluciones de trabajo

Las soluciones de trabajo corresponden a las diferentes concentraciones del agente químico, mezcladas con la suspensión bacteriana obtenida (0.5 McFarland) (Figura 5.4.).

1. Tome 4 tubos de ensayo limpios; rotúelos y ubíquelos en una gradilla, y adicione lo siguiente:
 - Tubo N°1 (Control positivo): 5 mL de hipoclorito 5% + 500 μ L de la suspensión bacteriana obtenida.
 - Tubo N°2: 5 mL del AQ (concentración comercial) + 500 μ L de la suspensión bacteriana obtenida.
 - Tubo N°3: 5 mL del AQ (1/10) + 500 μ L de la suspensión bacteriana obtenida.
 - Tubo N°4: 5 mL del AQ (1/100) + 500 μ L de la suspensión bacteriana obtenida.
2. Homogenice y reserve.

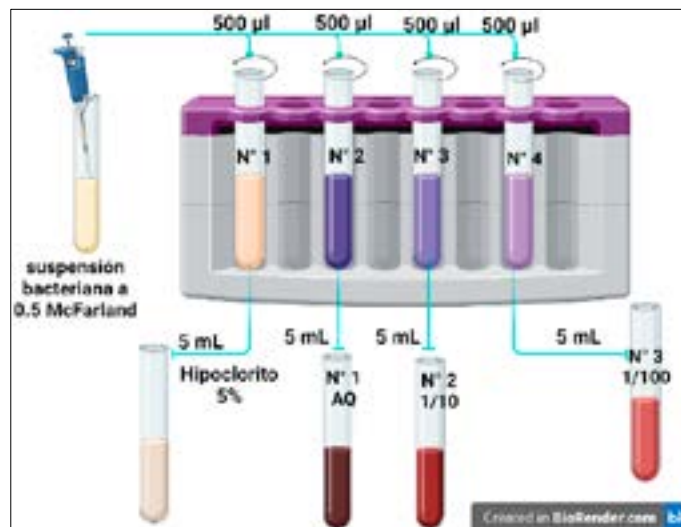


Figura 5.4. Preparación de las soluciones de trabajo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.2. Procedimientos

Una vez tenga listo lo que se describió con anterioridad, proceda de la siguiente manera:

5.3.2.1. Control de crecimiento

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 1 mL o 1000 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri vacía y adicione de 15 a 20 mL de agar nutritivo temperado a 44 – 47 °C.
3. Sobre una superficie plana, mezcle cuidadosamente el medio de cultivo y el inóculo (Figura 5.5.).

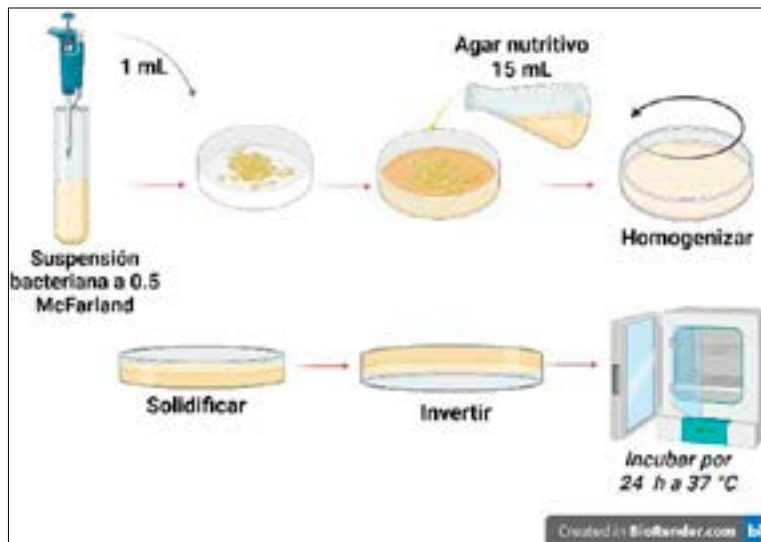


Figura 5.5. Control de crecimiento siembra en profundidad.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.2.2. Control positivo

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 1 mL o 1000 μ L de la solución de trabajo contenida en el tubo N°1 (Control positivo).
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri vacía y adicione de 15 a 20 mL de agar nutritivo temperado a 44 – 47 °C.
3. Sobre una superficie plana, mezcle cuidadosamente el medio de cultivo y el inóculo (Figura 5.6.).

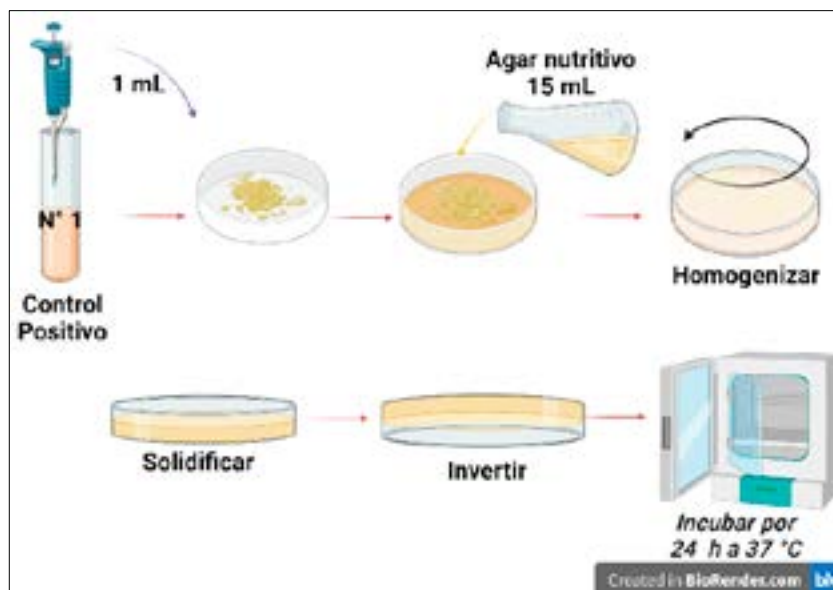


Figura 5.6. Control positivo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.3.2.3. Siembra de soluciones de trabajo (AQ + inóculo)

Desde el momento en que termine de preparar las soluciones de trabajo, cronometrice el tiempo y realice las siembras como se describe a continuación (Figura 5.7.):

5 minutos

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 1 mL o 1000 μ L de la solución de trabajo contenida en el Tubo N°2 (Concentración comercial), disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri vacía y adicione de 15 a 20 mL de agar nutritivo.
2. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 1 mL o 1000 μ L de la solución de trabajo contenida en el Tubo N°3 (Concentración 1/10), disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri vacía y adicione de 15 a 20 mL de agar nutritivo.
3. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 1 mL o 1000 μ L de la solución de trabajo contenida en el Tubo N°4 (Concentración 1/100), disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri vacía y adicione de 15 a 20 mL de agar nutritivo.
4. Sobre una superficie plana, mezcle cuidadosamente los medios de cultivo y los inóculos.

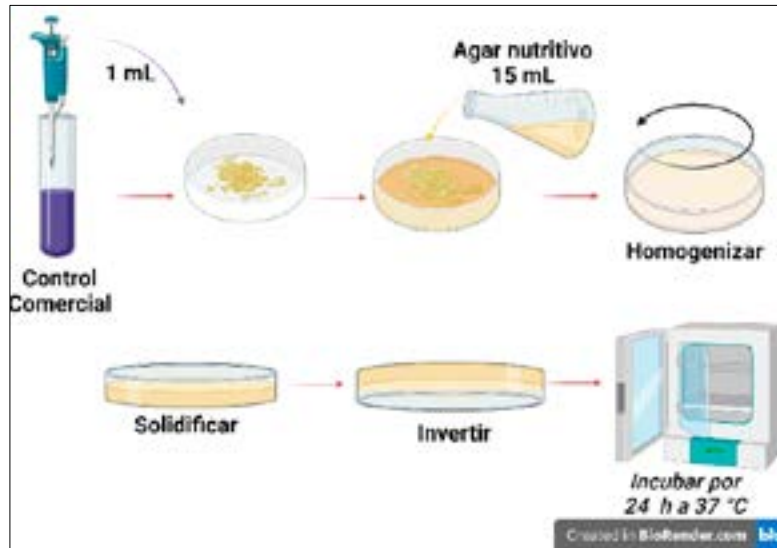


Figura 5.7. Siembra de soluciones de trabajo (AQ + inóculo).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

15 y 30 minutos

Realice exactamente lo mismo que se describió anteriormente, variando el tiempo de exposición a 15 y 30 minutos.

Nota: incube todos los medios de cultivo que sembró, a 37 °C por 24 horas.

5.3.3. Análisis de resultados

Después del periodo de incubación, observe los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo. Realice el recuento de las UFC desarrolladas y repórtelo en la (Tabla 5.3.).

Tabla 5.3. Formato para recuento de UFC.

| | | | | |
|-------------------------|------------------------------|-----------|------------|--|
| Agente Químico: | | | | |
| Cepa bacteriana: | | | | |
| Control de crecimiento: | UFC/mL | | | |
| Control positivo: | UFC/mL | | | |
| | AQ (concentración comercial) | AQ (1/10) | AQ (1/100) | |
| 5 minutos | UFC/mL | UFC/mL | UFC/mL | |
| 15 minutos | UFC/mL | UFC/mL | UFC/mL | |
| 30 minutos | UFC/mL | UFC/mL | UFC/mL | |

5.4. Procedimiento para antibiograma (agentes químicos)

Con esta metodología, se evalúa únicamente la concentración ideal de agentes químicos para que tengan un efecto inhibitorio o letal sobre determinados microorganismos. La técnica de antibiograma se efectúa en agar Mueller Hinton; especial para prueba de susceptibilidad a antibióticos o pruebas de difusión en disco (Scharlab, 2022) (Figura 5.8.).



Figura 5.8. Antibiograma en medio Mueller Hinton.

Fuente: (Cercenado & Saavedra-Lozano, 2009)

En este caso; la suspensión bacteriana y el agente químico a diferentes concentraciones, se realizan tal como se describe en los apartados **con el mismo nombre** de la metodología anterior (**Exposición a agentes químicos - Siembra en profundidad**).

5.4.1. Control de crecimiento

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 0.1 mL o 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton.
3. Con un asa de Digralsky, distribuya uniformemente el inóculo por toda la superficie del medio (Figura 5.9.).



Figura 5.9. Control de crecimiento en antibiograma.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

5.4.2. Procedimiento

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 0.1 mL o 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton.
3. Con un asa de Digralsky, distribuya uniformemente el inóculo por toda la superficie del medio.
4. Con ayuda de una pinza estéril, tome 4 sensidiscos estériles y ubíquelos como se muestra (Figura 5.10.). Asegúrese de rotular adecuadamente dichos sensidiscos por la base de la caja de Petri.

5. Empleando una micropipeta de volumen adecuado, disponga de 10-20 μL de la solución química elegida a diferentes concentraciones (Figura 5.11.), así:
- Sensidisco N°1 (Control positivo): 10-20 μL de hipoclorito 5%.
 - Sensidisco N°2: AQ (concentración comercial).
 - Sensidisco N°3: AQ (concentración 1/10).
 - Sensidisco N°4: AQ (concentración 1/100).



Figura 5.10. Procedimiento general para antibiograma (pasos 1-4).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

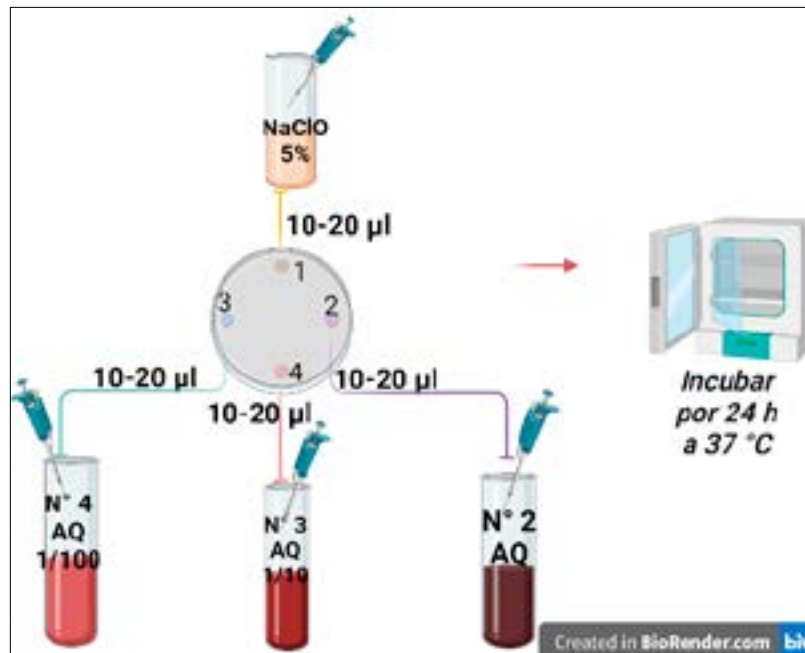


Figura 5.11. Procedimiento para antibiograma (Agentes Químicos) (paso 5).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Nota: incube los medios de cultivo que sembró, a 37 °C por 24 horas.

5.4.3. Análisis de resultados

Después del periodo de incubación, observe los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo. Realice la medición de los halos desarrollados alrededor de cada sensidisco y repórtelo en “cm” en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Formato de reporte de sensidiscos.

| | | |
|--|----------|-----------------|
| Agente químico: | | |
| Cepa bacteriana: | | |
| Control de crecimiento: | positivo | negativo |
| | | Medida del halo |
| Sensidisco N°1 (control positivo) | | cm |
| Sensidisco N°2 (concentración comercial) | | cm |
| Sensidisco N°3 (concentración 1/10) | | cm |
| Sensidisco N°4 (concentración 1/100) | | cm |

Para mayor información respecto a la interpretación de resultados de antibiograma y la determinación de resistencia o susceptibilidad de un microorganismo a un agente químico, consulte el siguiente enlace:

https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/calibration_and_validation/

5.5. Actividad interactiva

A continuación, encontrará un simulador de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

https://learn.chm.msu.edu/vibl/vibl/KirbyBauer/KirbyBauer_HTML5Canvas.html

Fuente: (Kirby-Bauer Antimicrobial Susceptibility Test, n.d.)

5.6. Actividad práctica

Como parte de su proyecto de grado, usted ha decidido evaluar el extracto acuoso de las hojas de té verde. Luego de realizar la identificación de los metabolitos secundarios pudo evidenciar la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, los cuales despertaron su interés para determinar qué tipo de actividad biológica podría atribuirles a estos compuestos. De esta forma, usted determina que las actividades a evaluar serán: antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana.

El extracto acuoso de té verde se evaluará frente a las cepas descritas en el simulador que encuentra en el enlace. De acuerdo con los resultados obtenidos en el simulador, usted deberá seleccionar por lo menos 3 antibióticos en los cuales los microorganismos evaluados tengan alguna respuesta como resistente o susceptible. Para ello deberá completar la tabla 5.5.

Tabla 5.5. Selección de antibióticos resistentes o susceptibles.

| MICROORGANISMO | ANTIABIÓTICO | RESISTENTE (R) | SUSCEPTIBLE (S) | HALO DE INHIBICIÓN (mm) |
|-------------------------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | Ciprofloxacina | No | Si | 0 |
| | Eritromicina | Si | No | |
| | Cloranfenicol | | | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

- ¿Qué información importante puede obtener luego de completar la Tabla 5.5?
- ¿Cómo la usaría en el desarrollo de su trabajo de tesis?

6

**CAPÍTULO
SEIS**

Capítulo seis. Obtención de hongos filamentosos y levaduras a partir del suelo

6.1. Resultados de aprendizaje

- Cuantifica las Unidades Formadoras de Colonia de hongos y levaduras, presentes en una muestra de suelo, a través de la siembra en superficie en Agar Rosa de Bengala.
- Identifica características morfológicas de hongos filamentosos mediante la tinción con azul de lactofenol.

6.2. Fundamentación teórica

El suelo es uno de los componentes más indispensables en el ambiente; está constituido principalmente de minerales, materia orgánica, agua, y formas biológicas que cumplen funciones vitales para el planeta (IDEAM, n.d.). Dichas formas biológicas son: bacterias; hongos; lombrices; nemátodos; hormigas; entre otros; estos participan en procesos como la descomposición de residuos, lo que se traduce en reciclaje de ciertos nutrientes. Los microorganismos -por ejemplo- logran liberar nutrientes inorgánicos al suelo, crean interacciones con las raíces de algunas plantas (micorrizas), generan asociaciones simbióticas de gran valor para los ecosistemas, etc (Barrios & Sandoval, 2018).

De la población microbiana total que puede encontrarse en el suelo, alrededor del 50 % está representada por hongos. Estos organismos desempeñan funciones como: síntesis de compuestos polifenólicos que intervienen en la formación de materia orgánica; asimilación del carbono (entre 30-50 %) presente en la materia orgánica; ser patógenos de plantas y animales; etc. Es importante entender que las condiciones del suelo pueden afectar enormemente los hongos que se desarrollen, pues las especies fúngicas son dependientes del nivel y tipo de materia orgánica de los ambientes edáficos; del pH; la humedad; temperatura; tipo de vegetación; entre otros (Barrios & Sandoval, 2018).

Algunas características ecológicas importantes de los hongos son (Mendoza & Torres, 2016):

- Logran penetrar los sustratos donde crecen debido a sus estructuras hifales.
- Logran incrementar su variabilidad genética pues algunos hongos; como los septados, forman fusiones hifales que les permite producir redes de hifas.
- Logran modificar el ambiente donde se desarrollan gracias a la producción de enzimas extracelulares.
- Son fuente de nutrientes para otros organismos de dos maneras: directa, cuando son consumidos por artrópodos pequeños; e indirecta, cuando generan productos metabólicos solubles.
- Acumulan nutrimentos en su talo.

Los hongos son organismos eucariotas quimioheterótrofos (se nutren de fuentes de carbono orgánico como materia vegetal o animal), aerobios en su mayoría; aunque algunas levaduras son anaerobias facultativas. Son organismos pluricelulares en el caso de los mohos y setas, y unicelulares en el caso de las levaduras. Algunos hongos presentan un micelio constituido por hifas (principalmente compuestas por quitina y N-acetilglucosamina), el cual tiene dos funciones primordiales: 1) absorber nutrientes (micelio vegetativo); 2) producir esporas (micelio reproductor). El micelio vegetativo; además, puede ser septado o tabicado (en hongos superiores), o cenocítico sin septos (en hongos inferiores) (Figura 6.1.). Dentro de este grupo de organismos se encuentran 3 clasificaciones que se basan en el tamaño y forma de los hongos: mohos, setas y levaduras (Hongos Microscópicos, 2021).



Figura 6.1. Tipos de micelio.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Las setas son pluricelulares y tienen un talo con dos partes. Una de las partes queda sobre el sustrato y la otra parte que queda por encima de este; presenta las hifas entrelazadas donde están las esporas sexuales del hongo. Las levaduras son unicelulares y se reproducen usualmente por gemación, en casos extraños lo hacen por bipartición. Los mohos u hongos filamentosos son pluricelulares y tienen un talo compuesto por hifas ramificadas en contacto con el exterior (Hongos Microscópicos, 2021).

Otra clasificación se da en función al tipo de reproducción fúngica. La reproducción asexual se puede dar por: a) fisión transversal, que se produce después de que las hifas se elongan, hay septos y citocinesis; b) gemación, que consiste en la formación de yemas en la célula madre; c) esporas asexuales, que se originan por mitosis, posteriormente se produce la división celular; y en condiciones ideales, estas logran germinar. Dentro de las esporas asexuales se encuentran las artrosporas, clamidosporas, esporangiosporas y conidiosporas. La reproducción sexual se da mediante esporas sexuales que se producen por la fusión de tres grupos: a) gametos unicelulares; b) cuerpos productores de gametos y c) hifas. Las especies fúngicas que exhiben este tipo de reproducción, pueden autofecundarse (homotálicas), o pueden requerir el entrecruzamiento de micelios sexualmente diferentes (heterotálicas). Además; los cigotos de estos hongos pueden transformarse en zigosporas, ascosporas o basidiosporas (Hongos Microscópicos, 2021).

La clasificación filogenética agrupa a los hongos inferiores y superiores. Los hongos inferiores se caracterizan por presentar un micelio cenocítico, e incluye Quitridiomycetos: son unicelulares, tienen movilidad escasa y son la causa de muerte de anfibios en varias zonas del mundo; Zigomicetos: son descomponedores de alimentos, destaca el género *Rhizopus*; Glomeromicetos: forman endomicorizas, ayudando a la planta a obtener minerales del suelo. Los hongos superiores tienen micelio septado que difiere entre grupos fúngicos. Aquí se pueden encontrar Ascomycetos: forman ascas, se reproducen asexualmente, son saprófitos, forman ectomicorizas y simbiosis con algas. Los ascomycetos más relevantes pertenecen a los géneros *Neurospora*, *Claviceps*, *Aspergillus* y *Penicillium*. Basidiomicetos: forman basidios en el extremo de sus hifas, y en este se encuentran las basidiosporas. Por último, se encuentran las levaduras: hongos unicelulares no filamentosos que se multiplican por gemación, en su mayoría ascomycetos, unos tantos basidiomicetos, y pocos zigomicetos. *Saccharomyces cerevisiae* pertenece al grupo de las levaduras (Figura 6.2.) (Hongos Microscópicos, 2021).

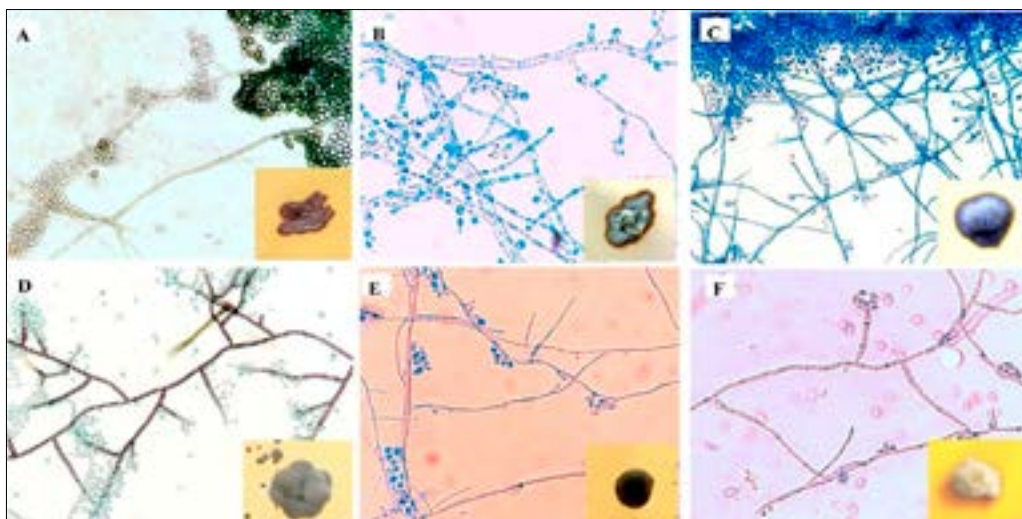


Figura 6.2. Algunas estructuras de hongos filamentosos en el microscopio: (A) *Exophiala dermatitidis*, (B) *E. mesophile*, (C) *E. jeanselmei*, (D) *E. spinifera*, (E) *E. xenobiotica*, (F) *E. mesophila*.

Fuente: (Singh et al., 2021)

Los hongos filamentosos presentan una curva de crecimiento bastante interesante constituida principalmente por tres fases. Conocer dicha curva permite controlar su crecimiento y hacer los respectivos monitoreos en condiciones de laboratorio. En la primera fase no se da un crecimiento aparente del hongo; sin embargo, las esporas fúngicas germinan y hay crecimiento, pero no es suficiente para evidenciarlo en el cultivo. La segunda fase se caracteriza porque el hongo presenta un crecimiento acelerado, exhibido gracias al desarrollo del micelio. Durante esta segunda fase el hongo utiliza los carbohidratos, nitrógeno y fosfatos disponibles; razón por la cual es importante brindar las condiciones de cultivo adecuado, como agares microbiológico ricos en dichos nutrientes (agar papa dextrosa o agar sabouraud), para que el hongo crezca con normalidad. En la tercera fase cesa el crecimiento; y puede darse una autólisis del micelio puesto que se rompe la quitina, carbohidratos y proteínas presentes en este; por consiguiente, disminuye el peso seco del micelio del hongo. Los hongos ingresan a esta última fase usualmente por la alta acumulación en el medio de metabolitos tóxicos; ácidos orgánicos y amoníaco; logrando, además, que se generen productos del metabolismo secundario esenciales para la supervivencia fúngica en condiciones extremas (Arias-Cifuentes & Piñeros-Espinosa, 2008).

Algunos hongos filamentosos presentan únicamente dos fases, pues tienen un crecimiento inicial acelerado que es seguido por una fase de cese de crecimiento. Entonces; es necesario brindar las condiciones de crecimiento ideales al hongo, para que pueda llevar a cabo sus fases de crecimiento de forma normal. Por esto; se deben controlar factores como: temperatura (óptima entre 25- 30 °C para la gran mayoría de especies fúngicas), influencia la germinación de las esporas y su reproducción; el pH (óptimo entre 4 y 6), afecta la toma de vitaminas, ácidos orgánicos y minerales del medio; la humedad y la luz (Arias-Cifuentes & Piñeros-Espinosa, 2008) (Figura 6.3.).

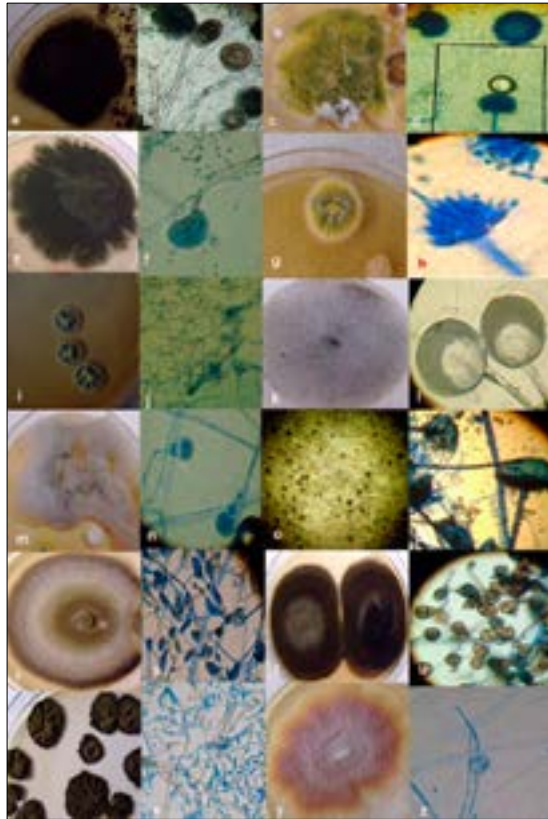


Figura 6.3. Hongos filamentosos en medios de cultivo microbiológico: a-b) *Aspergillus niger*; c-d) *Aspergillus flavus*; e-f) *Aspergillus fumigatus*; g-h) *Aspergillus glaucus*; i-j) *Penicillium* spp.; k-l) *Mucor* spp.; m-n) *Absidia corymbifera*; o-p) *Rhizopus* spp.; r-s) *Alternaria* spp.; t-u) *Ulocladium* spp.; v-x) *Cladosporium* spp.; y-z) *Fusarium oxysporum*.

Fuente: (Lorin et al., 2017)

Algunas de los géneros de hongos filamentosos más comunes en el suelo son (Arias-Cifuentes & Piñeros-Espinosa, 2008):

Aspergillus

Es un género aerobio que crece con mucha facilidad; sus colonias en cultivo son planas, blancas y algodonosas. Cuando las colonias empiezan a envejecer, se da el proceso de esporulación, donde el centro del hongo toma un color distintivo dependiendo de la especie. *A. flavus* es amarillo; *A. glaucus* es verde; *A. niger* es negro (Figura 6.4.); y *A. fumigatus* es gris. En cuanto a sus estructuras microscópicas, presentan micelio vegetativo compuesto por hifas septadas, incoloras y ramificadas; sus conidias se desarrollan como pedicelos y cabezuelas de origen en las células hifales especializadas. La producción de glucanasas convierte a este género en un foco industrial, pues estas son utilizadas en procesos de bioblanqueo, textiles, panificación, entre otros.

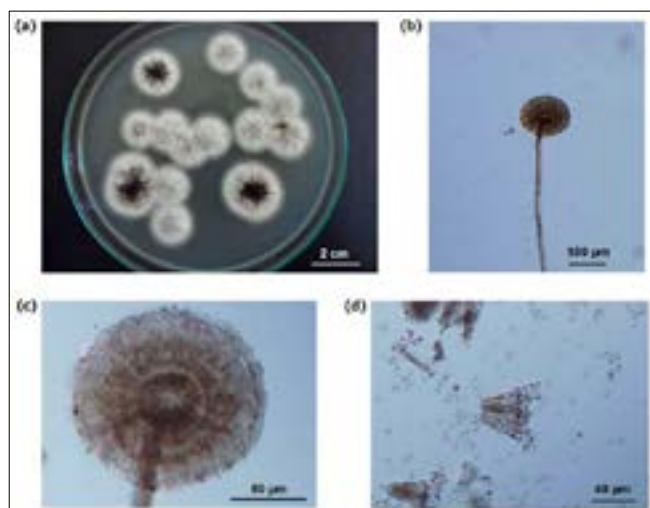


Figura 6.4. Características de *Aspergillus niger*: (a) Colonias en PDA; (b) Cabeza conidial y conidióforo; (c) Estructura conidial; (d) Esterigma y conidia.

Fuente: (Senawong et al., 2014)

Acromonium

En cultivo sólido presenta colonias de color crema o durazno claro (aunque pueden presentar variaciones blancas, rosadas e incluso gris-amarillas), que son bastante lisas debido a que el micelio es corto. En el microscopio se observan con conidióforos largos, casi del grosor de un cabello. Sus conidios son unicelulares, la forma puede ser oval, elíptica o cilíndricas; y se disponen en cabezuelas irregulares (Figura 6.5.). En industria, este género es de interés pues produce antibióticos como las cefalosporinas, con propiedades antibacterianas frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

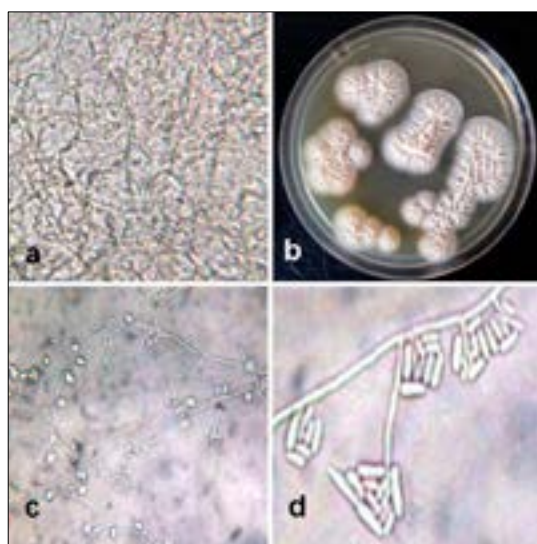


Figura 6.5. Características de *Acromonium strictum*: (a) Hifas hialinas septadas; (b) Colonias en SDA; (c-d) Hifas y conidias hialinas.

Fuente: (A. Sharma et al., 2013)

Cladosporium

Tiene colonias planas y aterciopeladas de color carmelita oscuro, que se vuelve más claro hacia la periferia del hongo. Además, su micelio presenta hifas bastante gruesas, septadas y oscuras; con conidióforos de conidios ovoides (Figura 6.6.).

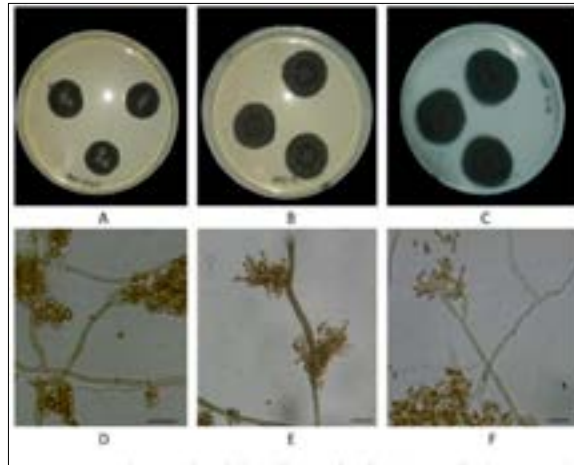


Figura 6.6. Características de *Cladosporium* en PDA: (A y D) *C. sphaerospermum*; (B y E) *C. oxysporum*; (C y F) *C. cladosporioides*.

Fuente: (Pérez-Ramírez & Sánchez-Espinosa, 2019)

Fusarium

Sus colonias son blancas con un pigmento color vino que se difunde en el medio de cultivo. Microscópicamente exhibe hifas septadas con conidióforos que presentan macroconidios, clamidosporas y microconidios agrupados en racimos (Figura 6.7.).

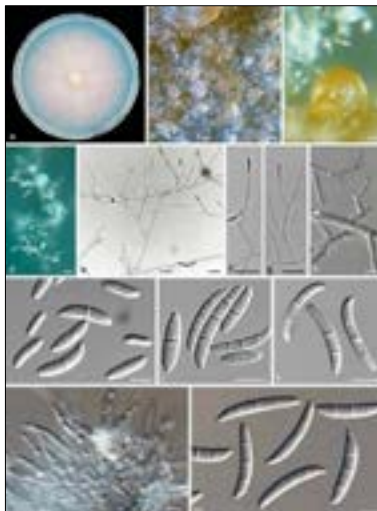


Figura 6.7. Características de *Fusarium desaboruense*: (a) Cultivo en PDA; (b-c) Esporodocio; (d-h) Conidióforos aéreos y células conidiógenas; (i-k) Conidias aéreas; (l) Conidióforo esporodocio y fiálides; (m) Conidia esporodocioal.

Fuente: (Maryani et al., 2019)

Penicillium

Este hongo tiene un crecimiento rápido; inicialmente, sus colonias son blancas y aterciopeladas, y posteriormente se cubren con las esporas que hacen que la colonia tome colores diferentes dependiendo de la especie, y tenga un color más pulverulento. Microscópicamente tiene hifas delgadas y septadas, y el verticillum ayuda en la clasificación del hongo (Figura 6.8.). Así, existen cuatro grupos: monoverticillata, asimétrica, biverticillate-simétrica y poliverticillata.



Figura 6.8. Características de *Penicillium consobrinum*: (a) Colonias en cultivo; (b-d) Textura; (e-j) Conidióforos; (k) Conidias.

Fuente: (Visagie et al., 2016)

Trichoderma

Sus colonias blancas crecen como una película sobre el medio; posteriormente, las esporas caen sobre las colonias, haciendo que tomen un color verdoso. Sus hifas son septadas, los conidióforos tienen segmentos cortos a cada lado de la hifa, y en la parte final se observan conidios redondeados (Figura 6.9.). Este género produce lactonas que son de uso industrial como saborizantes.

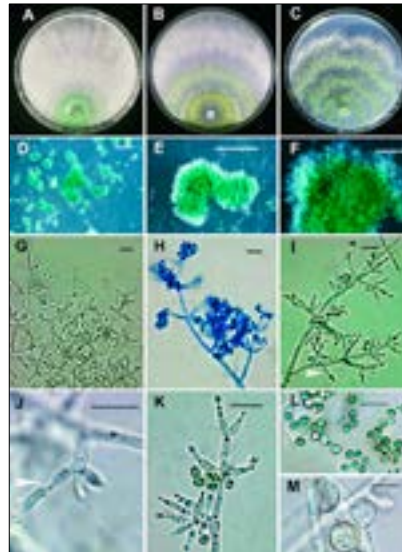


Figura 6.9. Características de *Trichoderma dorotheopsis*: (A) Crecimiento en PDA; (B) Crecimiento en CMD; (C) Crecimiento en SNA (D-F) Pustulas conidiales; (G-K) Conidióforos y fiálides; (L) Conidias; (M) Clamidosporas.

Fuente: (Athafah et al., 2020)

Las levaduras presentes en el suelo se diferencian principalmente como aquellas que generan ascosporas (grupo esporógeno) y aquellas que no las generan. Los géneros más representativos son; *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Lypomyces*, *Pichia*, *Pullularia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizoblastosporion*, *Sporobolomyces*, *Torula*, *Torulaspota*, *Torulopsis*, *Trichosporon* y *Zygosaccharomyces* (Sánchez Yáñez et al., 2007).

A continuación, se describe la metodología que se llevará a cabo en esta práctica de laboratorio para analizar las poblaciones de hongos filamentosos y levaduras, presentes en muestras de suelo.

6.3. Dilución de suelo en placas

Este método permite el fácil aislamiento de hongos presentes en un tipo de muestra determinada. Consiste en realizar una suspensión inicial, diluciones seriadas posteriores; y finalmente, siembra en superficie en un medio de cultivo adecuado.

6.3.1. Muestra de suelo

Para obtener una muestra de suelo compuesta (200 g en total), es necesario realizar un muestreo al azar, donde se recolectan submuestras (3) que posteriormente serán mezcladas entre sí (Figura 6.10.) (Valenzuela et al., 2014)

1. En una bolsa ziploc; y con ayuda de una espátula limpia, recolecte una muestra compuesta de aproximadamente 200 g (elija 3 puntos de muestreo que sean cercanos entre ellos y recolecte las submuestras).
2. Selle la bolsa ziploc y mezcle cuidadosamente para obtener la muestra compuesta.
3. Lleve la muestra al laboratorio para realizar los análisis correspondientes.

Nota: las muestras deben ser tomadas a una profundidad de 15-20 cm aproximadamente. Es importante tener en cuenta que se debe limpiar la espátula después de tomar cada una de las submuestras.



Figura 6.10. Muestra de suelo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

6.3.2. Aislamiento de hongos del suelo mediante siembra en superficie

6.3.2.1. Preparación de la suspensión inicial (10^{-1})

1. En un recipiente (bolsa de plástico o frasco) pese 10 g de la muestra de suelo.
2. Adicione la muestra a un recipiente que contenga 90 mL del diluyente estéril (50 mL de agua destilada + 30 mL suero oral + 10 mL agua peptona 0.1 %).
3. Homogenice realizando movimientos circulares al recipiente, durante 10 minutos.
4. Deje sedimentar (Figura 6.11.).



Figura 6.11. Preparación de la suspensión inicial.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

6.3.2.2. Diluciones decimales seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc)

1. Con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL o una micropipeta de volumen adecuado, transfiera 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) a un tubo con 9 mL del diluyente estéril.
2. Mezcle muy bien durante 5 a 10 segundos, y así obtendrá la dilución 10^{-2} .

3. Tome 1 mL de la dilución 10^{-2} , y transféralo a un tubo con 9 mL del diluyente estéril. Mezcle adecuadamente para obtener la dilución 10^{-3} .
4. Repita el paso anterior para obtener las diluciones que sean necesarias para conseguir un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (Figura 6.12.).

Nota: es aconsejable realizar diluciones hasta 10^{-6} , debido a la alta carga fúngica presente en el suelo.

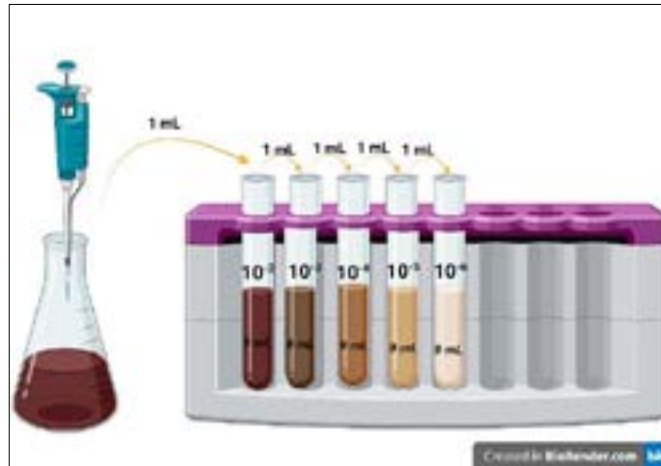


Figura 6.12. Diluciones decimales seriadas de muestras de suelo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

6.3.2.3. Inoculación e incubación

Para promover el desarrollo de colonias fúngicas, es necesario sembrar la muestra en un medio de cultivo adecuado, como lo es el agar Rosa de Bengala + Cloranfenicol. Este agar es selectivo para el aislamiento y recuento de levaduras y mohos en muestras de alimentos y otros ambientes; una vez que el Rosa de Bengala inhibe el crecimiento de bacterias y reduce el tamaño y la altura de hongos filamentosos que se desarrollen demasiado rápido. De esta forma, los mohos y levaduras de crecimiento lento, tienen la oportunidad de colonizar la superficie del medio en un tiempo adecuado. El cloranfenicol -de igual manera- inhibe el crecimiento bacteriano (Pfenning & Magalhães De Abreu, 2012; Condalab, 2019).

Nota: los mohos aparecen de color rosa.

1. Seleccione tres diluciones decimales consecutivas, las cuales deben ser críticas para el recuento y expresión de resultados (aquellas en las que se espera obtener recuentos entre 30 y 300 colonias por placa. Las diluciones 10^{-4} y 10^{-5} se consideran adecuadas para el aislamiento de hongos).
2. Con ayuda de una pipeta estéril o micropipeta, transfiera 0.1 mL de la primera dilución seriada elegida, en la superficie de dos (2) cajas de Petri con medio de cultivo Rosa de Bengala + cloranfenicol (0.1 mL en cada una de las cajas) (Figura 6.13.).
3. Cuidadosamente, extienda el inóculo de manera uniforme, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el asa de Digralsky esterilizada (siembra masiva).
4. Repita los últimos dos pasos, con las dos diluciones decimales seriadas restantes, utilizando una pipeta o puntas estériles nuevas para cada dilución decimal.
5. Incube los medios de cultivo a temperatura ambiente por 3-5 días (si es posible, disponga los medios de cultivo en un lugar oscuro).

Nota: la población fúngica desarrollada en los medios de cultivo puede no ser una representación real del microbiota total presente en las muestras de suelo. Esto se debe a que algunos hongos son capaces de producir grandes cantidades de esporas y crecer muy rápido en los medios de cultivo, pero otros hongos no logran competir con estas especies de rápido crecimiento en medios axénicos; por lo tanto, no se observan en los crecimientos, así que son subestimados por esta técnica (Pfenning & Magalhães De Abreu, 2012).

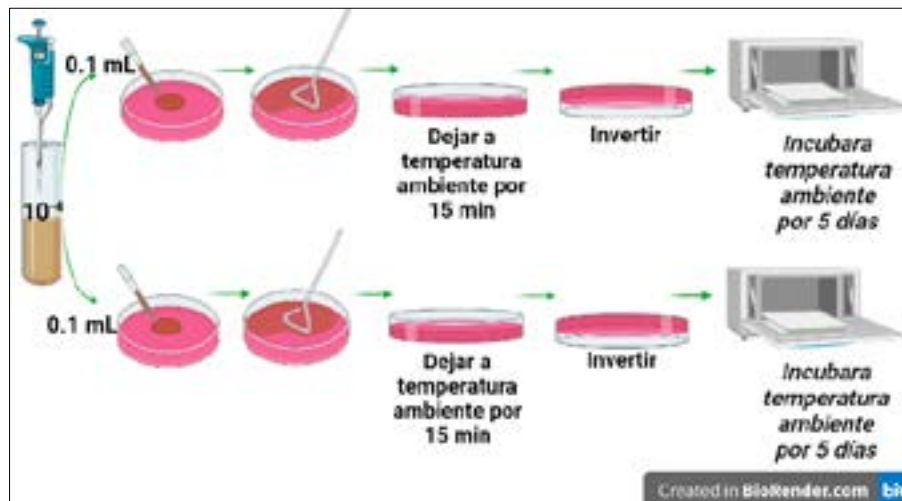


Figura 6.13. Inoculación e incubación de muestras de suelo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

6.4. Análisis de resultados

6.4.1. Recuento de unidades formadoras de colonia (UFC)

1. Después de 3-5 días de incubación, haga recuento en las placas donde se observe un crecimiento entre 30 a 300 UFC.
2. Calcule el número de Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo, teniendo en cuenta la siguiente fórmula (Fundación General de la Universidad de Salamanca, n.d.):

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Donde:

N: número de UFC x g⁻¹.

∑C: suma de todas las colonias contadas en todas las placas retenidas de dos diluciones sucesivas.

V: volumen del inóculo aplicado a cada placa, en mililitros.

n₁: número de placas retenidas de la primera dilución.

n₂: número de placas retenidas de la segunda dilución.

d: nivel de dilución correspondiente a la primera dilución retenida.

Nota: exprese los resultados como unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC x g⁻¹) (Pacasa-Quisbert et al., 2017).

6.4.2. Descripción de características morfológicas macroscópicas de las colonias fúngicas

1. Examine los crecimientos presentes en los medios de cultivo.
2. Tome nota de las características individuales de las colonias desarrolladas y realice una breve clasificación o identificación basándose en (Pacasa-Quisbert et al., 2017):
 - **Anverso de la colonia fúngica:** i) color de la superficie y contorno de la colonia, ii) textura, iii) color del pigmento exudado y iv) forma de la colonia y del margen.
 - **Reverso de la colonia fúngica:** i) color de la parte interior, media y borde de la colonia, ii) superficie interior y iii) exterior de la colonia.

Nota: apóyese en la siguiente clave para identificar los tipos de colonias fúngicas:

- **Colonias típicas de hongos filamentosos:** colonias de aspecto algodonoso de diverso tamaño y color.
- **Colonias típicas de levaduras:** colonias convexas, suelen ser brillantes y de color crema o rosa pálido.

6.4.3. Descripción de características morfológicas microscópicas de las colonias fúngicas

1. Realice tinciones a las colonias fúngicas de su interés, con azul de metileno o lactofenol (Figura 6.14.). Para esto puede utilizar dos técnicas:
 - Disección del micelio con ayuda de asas metálicas de punta.
 - Técnica de la cinta pegante: consiste en extraer fragmentos del micelio al presionar suavemente el lado pegante de una tira de cinta (aproximadamente 5 cm de longitud) sobre el micelio aéreo del hongo. Posteriormente, ponga la cinta sobre un porta objetos con una gota de azul de lactofenol, de tal manera que el micelio quede impregnado con el colorante (Pacasa-Quisbert et al., 2017).



Figura 6.14. Tinción a las colonias fúngicas con azul de metileno o lactofenol.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

2. Observe en el microscopio (Figura 6.15.)

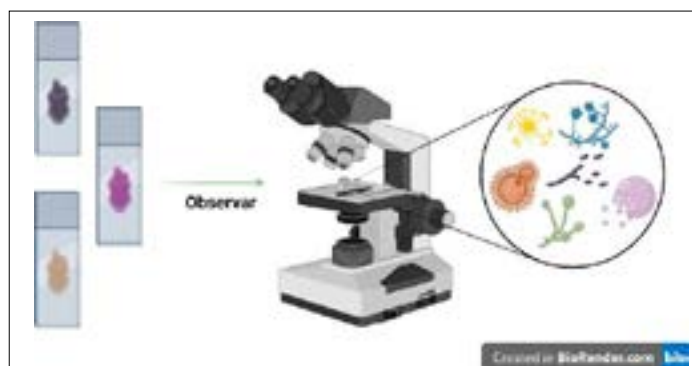


Figura 6.15. visualización de estructuras fúngicas teñidas con azul de metileno o lactofenol

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

6.5. Actividad interactiva

A continuación, encontrará un enlace, observar el video y responder las preguntas propuesta para la presente práctica de laboratorio:

<https://www.youtube.com/watch?v=7PtnPG3C5iY>

Fuente: (Fitopatología Académica, 2020)

6.6. Actividad práctica

- ¿Qué es un biocontrolador?
- Desde el punto de vista biotecnológico, ¿cuál es la importancia industrial del hongo *Trichoderma*?
- Con base en los resultados del video, plantee una idea de proyecto de investigación, que considere sencilla, y pueda desarrollarse en colaboración con cualquiera de los laboratorios de la Escuela de química, para ello deberá tener presente las aplicaciones más destacadas del hongo *Trichoderma*, identificar algún problema que viva actualmente la sociedad y que -según las características del hongo- éste o sus metabolitos puedan ayudar a solucionar.
 - Aplicaciones del hongo *Trichoderma*
 - Situación problema
 - Título de la propuesta
 - Laboratorios asociados a la propuesta.
- Teniendo en cuenta la información anterior, indique 2 hongos de interés industrial con aplicaciones biotecnológicas y menciónelas.
- De acuerdo con los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio -luego de realizar la tinción con azul de lactofenol- ingrese al siguiente enlace: <https://padlet.com/lufeospina/jnz0qi7i5y9n9rlr>; y suba 2 fotografías de los hongos teñidos y observados al microscopio en 100x, donde se logren identificar las estructuras características para después comparar con las fotografías de los demás compañeros.

Actividad complementaria

Realice una visita guiada al Jardín Botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira, en búsqueda de hongos basidiomicetes y documéntelo a través de fotografías.

7

**CAPÍTULO
SIETE**

Capítulo siete. Análisis de coliformes en aguas mediante filtración por membrana y siembra en medio VRB y EMB

7.1. Resultados de aprendizaje

- Determina la calidad microbiológica de muestras de agua mediante la identificación de coliformes totales y fecales a través de la técnica de filtración por membrana.

7.2. Fundamentación teórica

El agua es un recurso natural totalmente fundamental para la supervivencia de especies, el funcionamiento de procesos ecológicos (como el ciclo hidrológico), etc. En este sentido, es necesario que la calidad del agua a la cual se tenga acceso sea excelente, pues esta incide directamente en la salud humana. El agua potable es esencial para la vida; para que pueda denominarse como “potable”, debe cumplir con ciertos parámetros físicoquímicos y microbiológicos, que la hagan segura; pues, de hecho, el agua potable es un derecho humano según la Asamblea General de las Naciones Unidas (Fernández-Cirelli, 2012).

Para determinar si la calidad del agua es aceptable, se deben tener en cuenta algunos aspectos intrínsecos (lo que contenga el agua y la cantidad), y aspectos extrínsecos (la calidad del agua no requiere ser la misma para todos los propósitos). Los indicadores de calidad en el caso de este recurso son de tipo físico (turbidez, color, olor, temperatura, entre otros), químico (pH, oxígeno disuelto, nutrientes, materia orgánica, entre otros) y biológico (presencia de microorganismos potencialmente patógenos en el agua, y que deben estar ausentes en agua potable) (Fernández-Cirelli, 2012).

Los coliformes hacen parte de aquellos microorganismos presentes en el ambiente y heces fecales de humanos y animales homeotermos (Washington State Department of Health, 2016), son considerados indicadores de contaminación del agua y alimentos. Por esta razón, deben estar ausentes en agua para consumo, entonces se hace indispensable el control rutinario de estos microorganismos indicadores mediante diferentes pruebas de laboratorio. Dentro de los coliformes, se pueden encontrar los coliformes totales y fecales, siendo estos últimos indicadores de presencia de contaminación fecal (Fernández-Santisteban, 2017). Los coliformes totales son bacilos Gram negativos, no forman esporas, exhiben la habilidad de desarrollarse en presencia de sales biliares, y fermentan la lactosa a 37 °C (produciendo gas y ácido como productos de dicha fermentación). Este grupo incluye géneros bacterianos como *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., entre otros. Su presencia en muestras de aguas es asociada a contaminación de tipo ambiental (provenientes de suelo o vegetación) (Washington State Department of Health, 2016) (Salas-Sosa, n.d.).

Por otro lado, se encuentran los coliformes fecales, que presentan las mismas características de los coliformes totales; con una diferencia en la capacidad de fermentar la lactosa, pues estos logran hacerlo a temperaturas alrededor de 45 °C y por esto también son conocidos como coliformes termotolerantes (Salas-Sosa, n.d.) (Washington State Department of Health, 2016). En este subgrupo está incluido *Escherichia coli*, cuya presencia en muestras de agua es un indicador de contaminación fecal. A pesar de que la mayoría de cepas de *E. coli* pueden ser inofensivas, cepas como *E. coli* O157:H7 tienden a ser realmente peligrosas. Entonces, en general, los microorganismos coliformes no deben ser detectables por 100 mL de agua, lo que es reportado en análisis de laboratorio como “Ausencia” o “0 UFC x 100 mL” (New Nouveau Brunswick, n.d.)

Existen diversas técnicas para realizar el análisis de microorganismos presentes en muestras de agua, una de las más comunes es la filtración por membrana. Esta técnica tiene un alto grado de reproducibilidad, permite analizar una cantidad de muestra considerable y proporciona resultados con mayor rapidez. Este

método se basa en hacer pasar la muestra de agua problema, a través de un filtro de membrana microporosa en cuya superficie quedan retenidos los microorganismos. Habitualmente se utiliza una membrana de millipore tipo HA (hidroanálisis) (Merck MF-Millipore®, 2022), que tiene un tamaño de poro de 0,45 micras, puesto que la mayoría de microorganismos a analizar tienen un diámetro superior a 0,45 micras. Posteriormente, la membrana debe disponerse sobre un medio de cultivo adecuado a una temperatura y un tiempo necesario para posteriormente contar directamente las colonias sobre la superficie de la membrana (Páez-Sanabria, 2008).

Usualmente, el medio de cultivo utilizado con fines de identificación de coliformes en el método de filtración por membrana es el agar chromocult, medio cromogénico selectivo para coliformes totales y fecales en agua (Figura 7.1.). Gracias a la presencia de cromógenos en el medio, el crecimiento de coliformes se interpreta de la siguiente manera (Merck Chromocult®, 2022):

- **Coliformes totales:** presentan la enzima beta-galactosidasa (escinde el sustrato salmón-GAL) → Colonias rosadas.
- **Coliformes fecales:** presentan la enzima beta-glucoronidasa (escinde el sustrato X - glucorónido) y la enzima Beta-Galactosidasa (escinde el sustrato salmón-GAL) → **Colonias azul-violeta.**
- Inhibidor de bacterias Gram positivas → heptadecilsulfato sódico (Tergitol 7®), no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli*, ni de las bacterias coliformes que se desean cultivar.
- **Bacterias no coliformes** aparecen como colonias incoloras o con baja frecuencia, de color turquesa.

7.

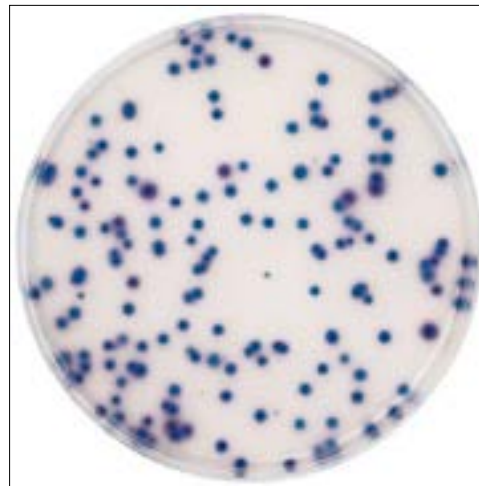


Figura 7.1. Colonias de microorganismos coliformes en medio chromocult.

Fuente: (Blamis, 2022)

Además de la técnica de filtración por membrana, también se pueden llevar a cabo metodologías para la identificación de coliformes en muestras de aguas, como diluciones seriadas y posterior siembra en superficie en medios de cultivo selectivos y diferenciales, como el medio de cultivo VRB (Violeta cristal- Rojo neutro-Bilis-Lactosa) y medio de cultivo EMB (Eosina y Azul de Metileno).

El agar VRB es especial para la detección y recuento de coliformes provenientes de alimentos, agua y otros materiales. El cristal violeta y las sales biliares que constituyen este medio, inhiben el crecimiento principalmente de los microorganismos Gram positivos presentes en la muestra. La degradación de la lactosa a ácido está indicada por el indicador de pH rojo neutro que cambia su color a rojo y por la precipitación de ácidos biliares, lo que se evidencia en el color que toman las colonias desarrolladas en la superficie del medio (Figura 7.2.) (Merck GranuCult™, 2021).



Figura 7.2. Colonia de microorganismos coliformes en medio Violeta cristal- Rojo neutro-Bilis-Lactosa (VRB).

Fuente: foto propia, 2022.

Por otro lado, el agar EMB es indicado para el aislamiento y diferenciación de bacilos entéricos Gram negativos, basado en su capacidad para fermentar lactosa. El uso de eosina y azul de metileno permite la diferenciación entre organismos fermentadores de lactosa y no fermentadores; además, tienen efecto inhibitorio frente a bacterias Gram positivas. Algunas cepas de *E. coli* pueden presentar un brillo verde metálico característico (Figura 7.3.), las cepas que fermentan la lactosa del medio aparecen como colonias oscuras con borde azul o rosado, en incluso pueden desarrollarse especies de *Candida spp.*, que se observan como colonias puntiformes de color rosado. Debido a la lactosa y la sacarosa, este medio puede ser diferencial en el cultivo primario: *Salmonella* y *Shigella* lactosa-negativas, que pueden diferenciarse de otros organismos negativos a la lactosa y a la sacarosa como *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* y *Aeromonas* (Britania Lab EMB, 2021).

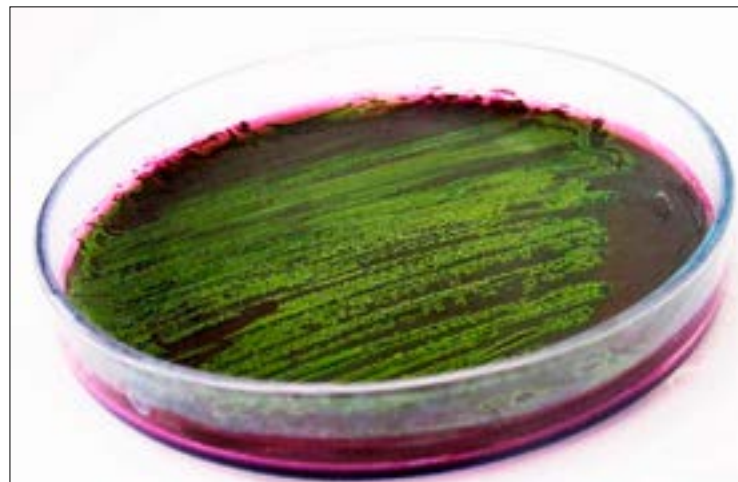


Figura 7.3. Colonias de microorganismos *Escherichia coli* en medio Eosina y Azul de Metileno (EMB).

Fuente: foto propia, 2022.

A continuación, se describe la metodología que se realizará en esta práctica de laboratorio, para identificar la presencia de coliformes totales y fecales en muestras de agua:

7.3. Identificación de coliformes totales y fecales en agua mediante filtración en membrana

7.3.1. Medición de la muestra (agua tratada)

1. Cuidadosamente, mezcle por inversión alrededor de 10 veces el recipiente donde tenga contenida la muestra de agua.
2. Con ayuda de una probeta, mida un volumen (Tabla 7.1.) de la muestra de agua que va a analizar ejemplo: agua para consumo tratada parcialmente (Figura 7.4.).

Tabla 7.1. Algunos volúmenes de muestras para análisis de filtración por membrana.

| Tipo de muestra | 100 mL | 10 mL | 1 mL |
|--|--------|-------|------|
| Agua tratada para consumo | x | | |
| Agua para consumo tratada parcialmente | x | x | |
| Agua para recreación | | | x |
| Agua superficial | | | x |

Fuente: (Rijal, 2022)

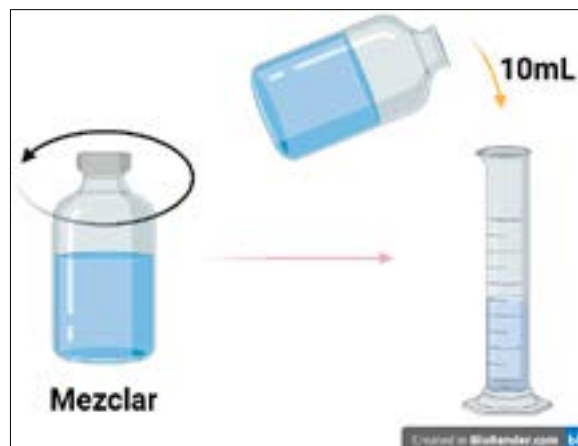


Figura 7.4. Medición de la muestra de agua a analizar.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

Nota: en caso de que la muestra de agua que vaya a analizar sea agua cruda, realice una dilución 1/10 antes de proceder con la filtración. Para esto, mida 10 mL de agua cruda y adiciónelos a 90 mL de agua destilada (diluyente), así obtendrá un volumen final de 100 mL para filtración (Figura 7.5.) (Páez-Sanabria, 2008).



Figura 7.5. Medición de muestra de agua cruda.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

7.3.2. Procedimiento de filtración, siembra e incubación

1. Cerca al mechero, destape el vaso de filtración que está empacado en papel Kraft (previamente esterilizado).
2. Ubique el soporte de filtración del equipo (donde posteriormente se dispondrá la membrana de filtración) sobre el recipiente que recibe la muestra una vez se haya filtrado, de tal manera que queden bien asegurados entre ellos.
3. Tome unas pinzas metálicas pequeñas, humedézcalas en alcohol, y flaméelas en el mechero para esterilizarlas.
4. Con cuidado y empleando las pinzas estériles, retire la membrana de celulosa de 0.45 μm del empaque donde viene empacada.
5. Ubique la membrana de celulosa sobre el soporte de filtración (la cuadrícula de la membrana debe quedar hacia arriba).
6. Complete el equipo de filtración poniendo el vaso de filtración (A. parte superior del equipo) sobre el soporte de filtración (B. parte media del equipo), asegurándose de que estén bien sellados y de que no se dañe la membrana de filtración.
7. Destape el vaso de filtración y disponga 100 mL de la muestra de agua en su interior y cierre nuevamente (Figura 7.6.).
8. Ajuste la bomba de vacío al equipo de filtración, y aplique vacío hasta que la muestra se filtre por completo y quede retenida en el vaso inferior del equipo de filtración (C).
9. Desmonte el vaso de filtración.
10. Esterilice las pinzas metálicas y tome cuidadosamente la membrana de filtración (allí se encuentran retenidos los microorganismos) (Figura 7.7.).
11. Ubique la membrana en la superficie del agar Chromocult, de tal manera que la cuadrícula de la membrana quede hacia arriba (asegúrese de que NO haya aire entre la membrana y la superficie del medio).
12. Invierta la caja de Petri e incube a 37 °C por 24-48 horas (Figura 7.8.).

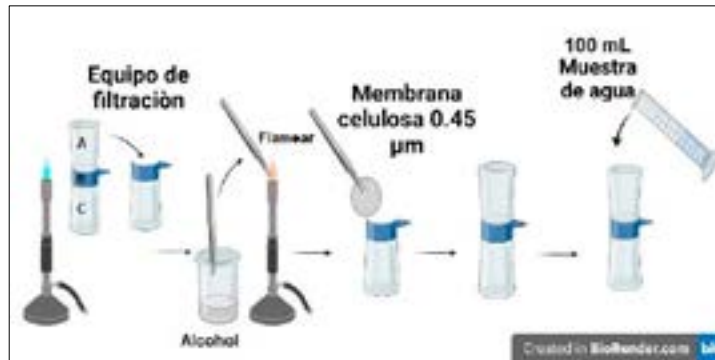


Figura 7.6. Procedimiento de filtración por membrana (paso 1-7).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.



Figura 7.7. Procedimiento de filtración por membrana (paso 8-10).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

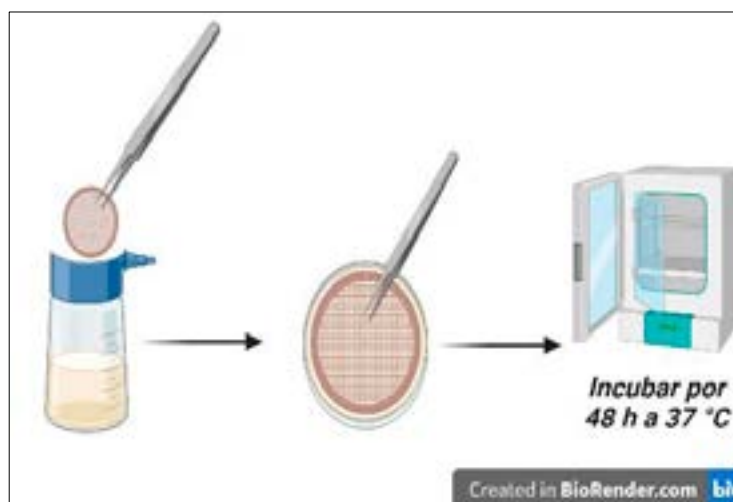


Figura 7.8. Procedimiento de filtración por membrana (pasos 11 y 12).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

7.3.3. Lectura y cálculo de resultados

Una vez finalizado el tiempo de incubación, realice el recuento e identificación de colonias presuntivas de coliformes totales y *Escherichia coli* (Tabla 7.2.). Exprese los resultados en UFC/mL (López-Suárez, 2015).

Tabla 7.2. Claves para identificación de crecimientos típicos de coliformes en agar chromocult.

| Medio de cultivo | Coliformes totales | Coliformes fecales |
|------------------|--|---|
| Agar Chromocult | Colonias que adquieren un color rojo asalmonado. | Colonias que adquieren un color entre azul oscuro o violeta |
| | -Las bacterias no coliformes aparecen como colonias incoloras o, con baja frecuencia, de color turquesa. -Inhibido el desarrollo de bacterias Gram positivas. | |

Fuente: (Merck Chromocult®, 2022)

7.4. Identificación de coliformes totales y fecales mediante siembra en superficie

7.4.1. Medición de la muestra

1. Cuidadosamente, mezcle por inversión alrededor de 10 veces el recipiente donde tenga contenida la muestra de agua.
2. Con ayuda de una probeta, mida un volumen de 10 mL de la muestra de agua que va a analizar.

7.4.2. Preparación de la suspensión inicial (10^{-1})

1. Tome la muestra que acaba de medir y adiciónela a un matraz que contenga una cantidad del diluyente (agua peptonada o solución salina fisiológica con peptona al 0.1 %) igual a 9 mL por cada mililitro de la muestra, en este caso, 90 mL (se obtiene la dilución 1/10).
2. Homogenice realizando movimientos circulares al recipiente, durante 1 a 3 minutos.

7.4.3. Preparación de las diluciones seriadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.)

1. Con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL o una micropipeta de volumen adecuado, transfiera 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) a un tubo con 9 mL del diluyente estéril.
2. Mezcle muy bien durante 5 a 10 segundos, y así obtendrá la dilución 10^{-2} .
3. Tome 1 mL de la dilución 10^{-2} , y transfíeralo a un tubo con 9 mL del diluyente estéril. Mezcle adecuadamente para obtener la dilución 10^{-3} .
4. Repita el paso anterior para obtener las diluciones que sean necesarias para conseguir un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento (Figura 7.9.).

Nota: si la muestra que está analizando es agua cruda, es recomendable realizar diluciones seriadas hasta 10^{-6} , para así disminuir la carga microbiana tanto como sea posible.



Figura 7.9. Preparación de diluciones seriadas.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

7.4.4. Inoculación e incubación

1. Seleccione tres diluciones decimales consecutivas, las cuales deben ser críticas para el recuento y expresión de resultados.
2. Con ayuda de una pipeta estéril o micropipeta, transfiera 0.1 mL de la primera dilución seriada elegida, en la superficie de dos (2) cajas de Petri con medio de cultivo VRB y dos (2) cajas de Petri con medio de cultivo EMB (0.1 mL en cada una de las cajas).
3. Cuidadosamente, extienda el inóculo de manera uniforme, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el asa de Digrafsky esterilizada (siembra masiva) (Figura 7.10.).
4. Repita los últimos dos pasos, con las dos diluciones decimales restantes, utilizando una pipeta o puntas estériles nuevas para cada dilución decimal.
5. Deje las cajas a temperatura ambiente por 15 minutos para que el inóculo sea absorbido por el agar.
6. Invierta las cajas preparadas e incube a 30 °C – 37 °C por 24-48 horas.

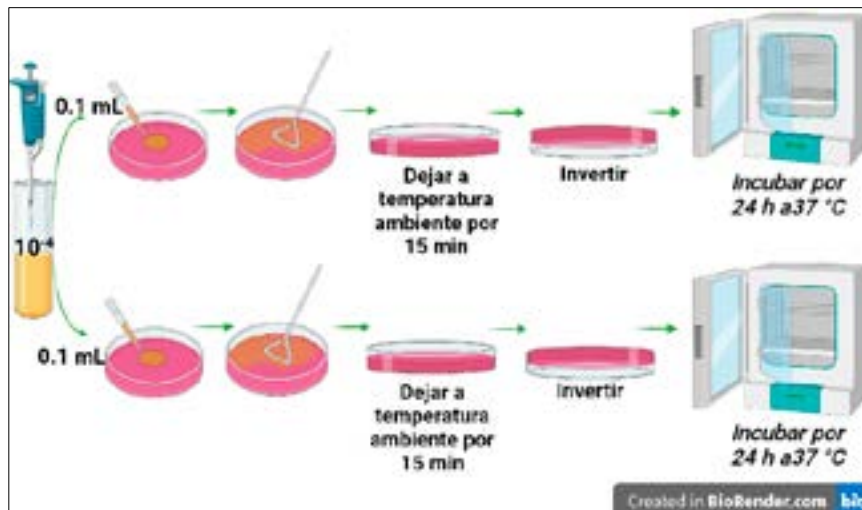


Figura 7.10. Siembra masiva en medio VRB y EMB.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender.

7.4.5. Lectura y cálculo de resultados

1. Una vez haya finalizado el tiempo de incubación, examine los crecimientos en los medios VRB y EMB, e identifique la presencia de colonias sospechosas de coliformes totales y fecales (Tabla 7.3.).
2. Realice el recuento correspondiente e informe como UFC/mL.

Tabla 7.3. Claves para identificación de crecimientos típicos de coliformes en agar VRB y EMB.

| Medio de cultivo | Coliformes totales y fecales |
|------------------|--|
| VRB | Colonias púrpuras-rojizas de al menos 0.5 mm de diámetro, a veces rodeadas por una zona rojiza, gracias a la precipitación de la bilis presente en el medio de cultivo (la aparición de dicha zona rojiza depende del tipo de coliforme). |
| EMB | <ul style="list-style-type: none"> - Las colonias de <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> son translúcidas y de color ámbar o incoloras. - Los coliformes que usan lactosa y / o sacarosa producen colonias azul oscuro con centros oscuros y un brillo metálico verdoso. - Otros coliformes como <i>Enterobacter</i> forman colonias mucoides rosadas. - Las cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> se inhiben parcialmente en este medio y aparecen como colonias incoloras. |

Fuente: (Merck GranuCult™, 2021); (Britania Lab EMB, 2021)

7.5. Actividad práctica

- Lea el siguiente caso y complete la Tabla 7.4.

En un colegio municipal, se presentó la intoxicación de varios alumnos, la mayoría de ellos con síntomas similares como dolor de cabeza, dolor abdominal, náuseas y diarrea. La Secretaría de Salud realizó la inspección del lugar y encontró alimentos perecederos como embutidos y pescados en el congelador, las frutas y verduras eran lavadas con agua del grifo, pero no recibían ningún otro tratamiento antes de su preparación. El inspector decide entonces hacer un análisis a la carne y las verduras, la carne se encontraba en buen estado, pero las verduras a pesar de estar previamente lavadas presentaron presencia de bacterias Gram negativas. Para encontrar el origen de estas bacterias decidió hacer un muestreo del agua que usaban para consumo y para el lavado de las frutas y verduras. Se realizó el análisis microbiológico de agua mediante la técnica del Número Más Probable (NMP). De acuerdo con los resultados obtenidos y según la resolución 2115 de 2007, indicar las posibles causas del brote de gastroenteritis que se vivió en el colegio.

Tabla 7.4. Resultados análisis microbiológico de aguas por la técnica del NMP.

| Series de tubos | Resultado en fluorocult | | | | | Resultado fluorescencia | | | | | NMP para coliformes totales | NMP para coliformes fecales |
|-----------------|-------------------------|---|---|---|---|-------------------------|---|---|---|---|-----------------------------|-----------------------------|
| | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | | |
| Serie 1 | + | + | - | - | + | - | + | - | - | + | | |
| Serie 2 | + | - | + | - | + | - | + | - | - | - | | |
| Serie 3 | + | - | - | - | + | - | - | - | - | - | | |
| Resultados | | | | | | | | | | | | |

Nota: los símbolos (+) presentados en la Tabla 7.4. hacen referencia a resultados positivos en los análisis microbiológicos. Por el contrario, los símbolos (-) hacen referencia a resultados negativos en los análisis microbiológicos.

8

**CAPÍTULO
OCHO**

Capítulo ocho. Productos naturales inhibidores de crecimiento bacteriano

8.1. Resultados de aprendizaje

- Compara la capacidad antimicrobiana de diferentes productos naturales, mediante la medición de los halos de inhibición de crecimiento, a través de un antibiograma.
- Diseña un diagrama de flujo del proceso de evaluación de la capacidad antimicrobiana de aceites esenciales, mediante la resolución de un estudio de caso.

8.2. Fundamentación teórica

Cuando se trata de hacer frente a infecciones causadas por agentes patógenos, es usual recurrir al uso de sustancias químicas o antibióticos, pues inhiben o destruyen de forma acelerada dichos agentes microbianos. Sin embargo, en algunos casos y por manipulación inadecuada de estos compuestos, se presentan consecuencias desfavorables como el desarrollo de resistencia por parte de los microorganismos, respuestas alérgicas del huésped a algún medicamento, dependencia a fármacos, entre otros (Organización Mundial de la Salud, 2020).

A pesar de esto, es necesario controlar el desarrollo y reproducción de microorganismos oportunistas en el organismo del huésped, debido a que pueden causar graves problemas de salud al traspasar sus barreras naturales de protección, como el sistema inmune. Cuando una infección es producida por algún agente patógeno, el sistema inmune produce ciertas células como Linfocitos T citotóxicos que logran identificar y destruir el microorganismo que está causando enfermedad; además, producen anticuerpos que tiene básicamente la misma finalidad. Otra respuesta inmediata del organismo es elevar la temperatura, pues esto nos protege de la infección, y optimiza nuestros mecanismos de defensa (Bush, 2020). De acuerdo a lo anterior, el uso de sustancias naturales para el tratamiento de infecciones es una alternativa para disminuir el uso indiscriminado de fármacos sintéticos. Las sustancias naturales son productos que tienen compuestos activos que les confiere actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos. Además, no generan dependencias, fortalecen el sistema inmune, no propician el desarrollo de resistencia microbiana, así sean consumidos regularmente no es necesario aumentar su dosis a través del tiempo, entre otros (Equipo iSalud, 2019).

Algunas sustancias antimicrobianas son obtenidas a partir de hierbas, plantas o especias; y su efectividad es atribuida principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, terpenoides y aldehídos. Algunos estudios han demostrado que dichos compuestos reaccionan de forma directa con componentes microbianos como las membranas celulares, enzimas esenciales, maquinaria de síntesis proteica, material genético, entre otros. A nivel industrial, existe un gran reto en el proceso de extracción y purificación de dichos compuestos a partir de productos naturales (Rodríguez Saucedo, 2011). A continuación, se mencionan algunos productos naturales que exhiben actividad antimicrobiana:

Los clavos de olor y la canela son utilizados a nivel industrial por sus propiedades aromáticas y saborizantes; sin embargo, tienen presencia de aldehído cinámico y eugenol, que les confieren capacidad antimicrobiana cuando se encuentran a concentraciones de 1.000 ppm, e incluso, hacen frente a formas de resistencia como esporas y toxinas (Pastrana-puche et al., 2017).

El aguacate es una fruta rica en fitoquímicos lipófilos, compuestos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, entre otros. Todo lo anterior, ha sido relacionado con un efecto protector frente a enfermedades de diferente

tipo, como gastrointestinales y cardiovasculares; pero, además, con actividad antimicrobiana. En un estudio realizado por Sierra-Castrillo et al., (2020), se evaluó la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) y bactericida (CMB), de extractos de *Persea americana* variedad Choquette, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta investigación concluyó que la mayor actividad está presente en extractos de cáscara y semilla. La CMI y CMB para la *E. coli* tratada con extractos de cáscara (solvente hexano y el cloroformo) fue de (1/2) 1000 mg/mL, mientras que la CMI y CMB para *S. aureus* (con los solventes cloroformo y acetato de etilo) fue de (1/2) 1000 mg/mL.

Los colorantes de origen natural también exhiben una marcada capacidad antimicrobiana. Dependiendo de su origen, los colorantes pueden clasificarse como vegetales, animales y minerales. Los colorantes vegetales tales como la clorofilina, el azul de arándanos o el rojo del pimentón; provienen de plantas, flores, frutas, verduras, entre otros. Los colorantes de origen animal como el rojo de la cochinilla o violeta de moluscos, son extraídos de animales e insectos. Por último, los colorantes minerales provienen de la tierra, hierro, dióxidos, entre otros. Algunos compuestos activos antimicrobianos que comparten estos colorantes naturales son los carotenoides, antocianinas, flavonoides, taninos, licopenos, etc (Guardiola San Román, 2020).

La cúrcuma se compone principalmente de curcumina, un polifenol con efectos antiinflamatorios, antioxidantes, neuroprotectores, antimicrobianos, entre otros. Esta última, ha sido demostrada en bacterias tales como *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Edwardsiella tarda*, entre otras (Guardiola San Román, 2020).

El ajo debe su gran actividad antimicrobiana a su componente mayoritario, la alicina. Sin embargo, enzimas como la anilasa, peroxidasa, mirosinasa y algunos aminoácidos, contribuyen a dicho efecto. La alicina interviene directamente en la síntesis lipídica y de ARN de los microorganismos, impidiendo su desarrollo. Géneros bacterianos como *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, *Clostridium*, y bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se ven inhibidas por este compuesto (Garzón Vallejo, 2018). Por otro lado, la cebolla debe su capacidad a su composición rica en compuestos sulfurados, como el disulfuro de alilpropilo (López Pérez & Boronat Gil, 2019)

La miel está constituida por azúcares, enzimas, aminoácidos, carotenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros, que le confieren propiedades antimicrobianas a este producto (Gegunde Díaz, 2016). El jengibre tiene componentes como A-zingibereno, Ar-curcumeno, B-sesquiterpeneol, Teraniol, Geraniol, entre otros, que le proveen dicha capacidad a este producto (Castillo Arias, 2019).

Incluso algunas plantas suculentas del género *Kalanchoe*, exhiben esta capacidad, gracias a la presencia de fenoles, quinonas, taninos, alcaloides, terpenos, flavonoides, etc (Gómez González, 2019).

En esta práctica de laboratorio se evaluará la actividad antimicrobiana de productos naturales, en función de su concentración.

8.3. Procedimiento para antibiograma (productos naturales)

8.3. Procedimiento para antibiograma (productos naturales)

Con esta metodología, se evalúa la concentración ideal de productos naturales para que tengan un efecto inhibitorio sobre determinados microorganismos. Esta técnica se efectúa en agar Mueller Hinton, especial para prueba de susceptibilidad a antibióticos o pruebas de difusión en disco (Scharlab, 2022).

8.3.1. Reactivación del cultivo microbiano

Para llevar a cabo esta metodología se requiere trabajar con cultivos microbianos en fase exponencial; por este motivo, es necesario reactivar las cepas de trabajo, máximo 24 horas antes de utilizarlas (Figura 8.1.).

1. Tome una porción del cultivo bacteriano que tenga disponible, e inocúlelo en un tubo de ensayo que contenga 5 mL de caldo BHI.
 - Si parte de un cultivo sólido; tome inóculo múltiples veces, con ayuda de un asa metálica de redondel.
 - Si parte de un cultivo líquido; tome inóculo múltiples veces, con ayuda de una pipeta o micropipeta estéril.
2. Mezcle vigorosamente, de forma manual o con ayuda de un vortex.
3. Incube por 24 horas a 37 °C.

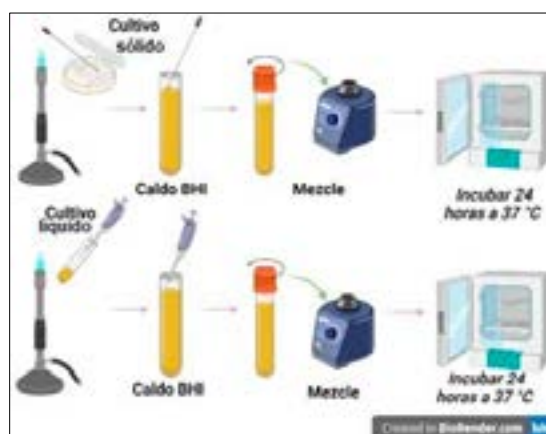


Figura 8.1. Reactivación del cultivo microbiano.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

8.3.2. Preparación de la suspensión bacteriana

Para realizar la suspensión bacteriana, se parte del cultivo reactivado 24 horas atrás. Dicha suspensión debe ser ajustada al patrón 0.5 de la escala de McFarland; que corresponde a una concentración aproximada de 1.5×10^8 células /mL.

1. En un tubo de ensayo con agua destilada estéril (5 mL aproximadamente), adicione 500 μ L del cultivo microbiano reactivado.
2. Con ayuda de un Densichek[®], mida la absorbancia de la suspensión bacteriana de trabajo; la cual debe ajustarse a 0.5 McFarland, cuyo rango aceptable de absorbancia se encuentra entre 0.44-0.56.
3. Reserve dicha suspensión para trabajar con ella posteriormente (Figura 8.2.).

Nota: es necesario tener disponible agua destilada estéril y el cultivo microbiano reactivado, en caso de que se deba ajustar la suspensión bacteriana, pues puede suceder que la absorbancia no sea la indicada en el primer intento. Si la absorbancia está por encima del límite superior (0.56) adicione más cantidad de agua destilada estéril a la suspensión, hasta que se ajuste al patrón de 0.5 McFarland. Si, por el contrario, la absorbancia está por debajo del límite inferior (0.44), adicione más cantidad de cultivo microbiano, hasta que se ajuste al patrón.

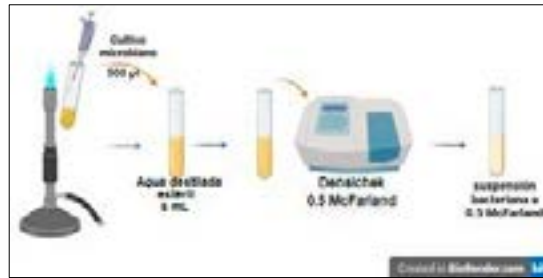


Figura 8.2. Preparación de la suspensión bacteriana.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

8.3.3. Preparación del producto natural a diferentes concentraciones

En este paso se preparan diferentes concentraciones del producto natural que se desea evaluar (Figura 8.3.); por ejemplo, ajo, cebolla, cúrcuma, orégano, tomillo, etc (Garzón Vallejo, 2018):

1. Tome 3 beakers de 100 mL, rotúlelos y adicione lo siguiente:
 - Beaker N°1: 10 g del producto natural (PN) de su elección + 100 mL de agua destilada (concentración 10%).
 - Beaker N°2: 20 g de del producto natural (PN) de su elección + 100 mL de agua destilada (concentración 20%).
 - Beaker N°3: 30 g de del producto natural (PN) de su elección + 100 mL de agua destilada (concentración 30%).
2. Homogenice y reserve.

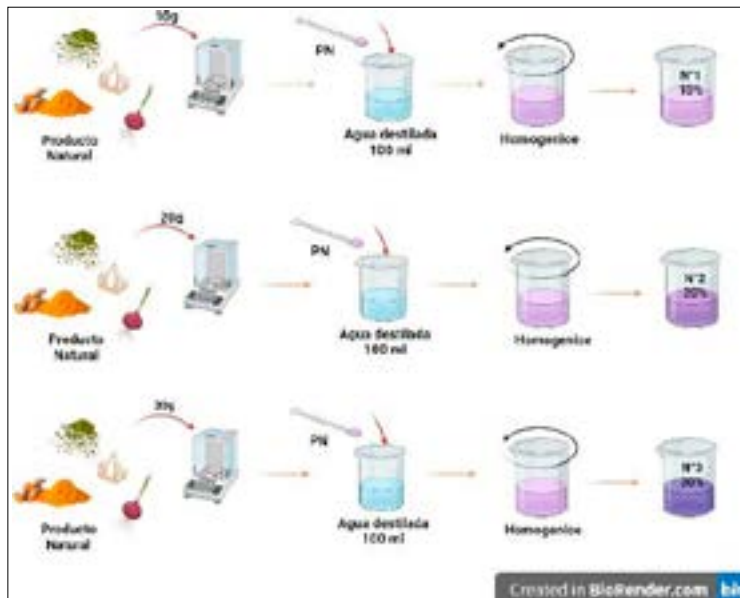


Figura 8.3. Preparación del producto natural a diferentes concentraciones.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

8.3.4. Control de crecimiento

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 0.1 mL o 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton.
3. Con un asa de Digrafsky, distribuya uniformemente el inóculo por toda la superficie del medio (Figura 8.4.).

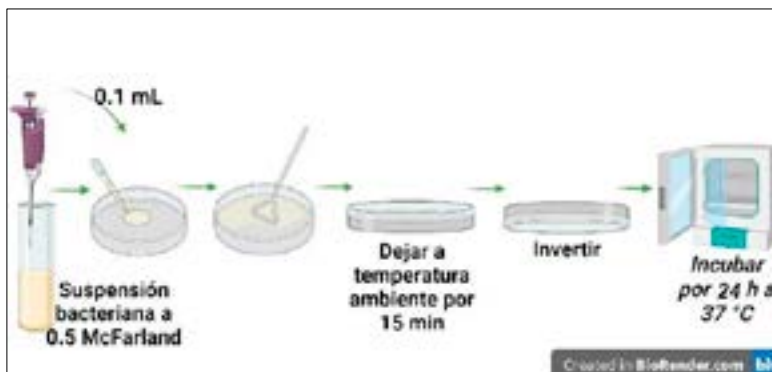


Figura 8.4. Control de crecimiento.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

8.3.5. Control positivo

El control positivo será una solución de hipoclorito al 5 %.

8.3.6. Control negativo

El control negativo será agua destilada.

8.3.7. Procedimiento

1. Con ayuda de una micropipeta de volumen adecuado; tome 0.1 mL o 100 μ L de la suspensión bacteriana ajustada a 0.5 McFarland.
2. Disponga dicho volumen en el centro de una caja de Petri con medio de cultivo Mueller Hinton.
3. Con un asa de Digrafsky, distribuya uniformemente el inóculo por toda la superficie del medio.
4. Con ayuda de una pinza estéril, tome 5 sensidiscos estériles y ubíquelos como se muestra en la (Figura 8.5.). Asegúrese de rotular adecuadamente dichos sensidiscos por la base de la caja de Petri.
5. Empleando una micropipeta de volumen adecuado, disponga de 10-20 μ L del producto natural a diferentes concentraciones, así:
 - Sensidisco N°1 (Control positivo): 10-20 μ L de hipoclorito 5 %.
 - Sensidisco N°2: (Control negativo): 10-20 μ L de agua destilada.
 - Sensidisco N°3: PN (concentración 10 %).
 - Sensidisco N°4: PN (concentración 20 %).
 - Sensidisco N°5: PN (concentración 30 %).
6. Incube los medios de cultivo que sembró, a 37 °C por 24 horas (Figura 8.6.).

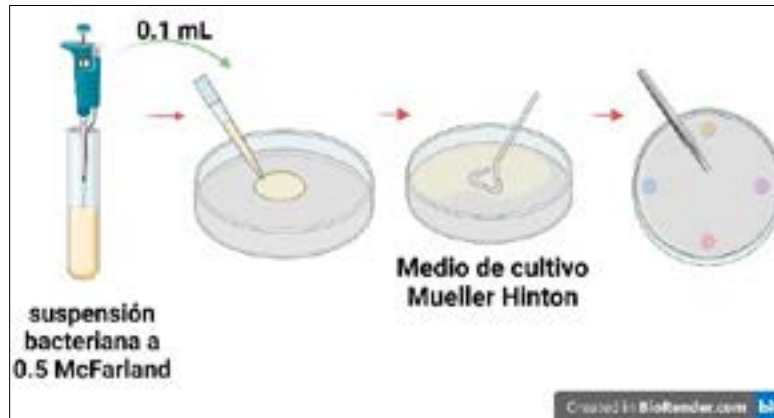


Figura 8.5. Procedimiento para antibiograma (Productos Naturales) (paso 1-4).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

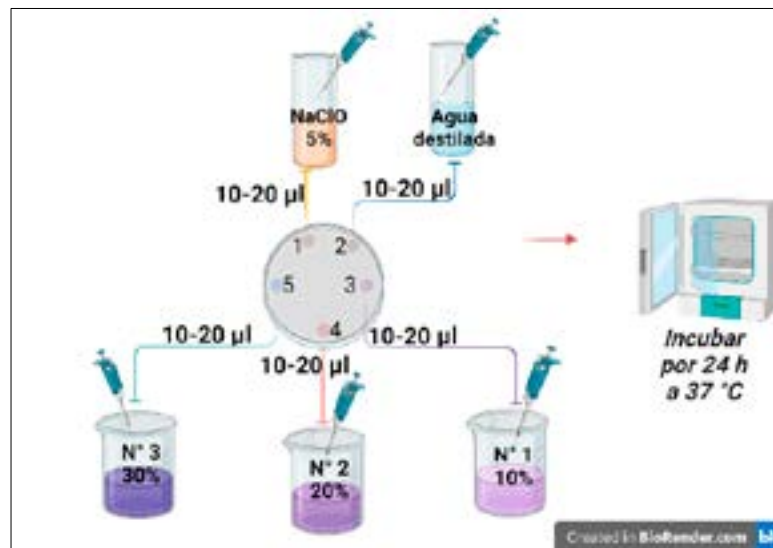


Figura 8.6. Procedimiento para antibiograma (Productos Naturales) (paso 5 y 6).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

8.3.8. Análisis de resultados

Después del periodo de incubación, observe los resultados obtenidos en los diferentes medios de cultivo (Figura 8.7.). Realice la medición de los halos desarrollados alrededor de cada sensidisco y repórtelo en “cm” en la (Tabla 8.1.):



Figura 8.7. Posibles resultados a obtener.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

Tabla 8.1. Reporte del tamaño de halos de inhibición en la técnica de antibiograma.

| | |
|------------------------------------|------------------------|
| Agente Químico: | |
| Cepa bacteriana: | |
| Control de crecimiento: | positivo negativo |
| Medida del halo | |
| Sensidisco N°1 (control positivo) | cm |
| Sensidisco N°2 (control negativo) | cm |
| Sensidisco N°3 (concentración 10%) | cm |
| Sensidisco N°4 (concentración 20%) | cm |
| Sensidisco N°4 (concentración 30%) | cm |

8.4. Actividad práctica

- Según la literatura, ¿cuál es el solvente más usado para diluir los extractos naturales cuando se desea evaluar su capacidad antibacteriana?
- Como parte de un emprendimiento de aceites esenciales, usted y un grupo de amigos desean evaluar la actividad biológica de algunas plantas, para ello hacen la extracción de aceites de dichas plantas, quieren conocer la capacidad que éstas tienen de inhibir el crecimiento de microorganismos. Siguiendo las bases teóricas y procedimentales de la práctica “*Productos naturales inhibidores de crecimiento bacteriano*” realice un diagrama de flujo donde muestre los pasos a seguir para evaluar la capacidad antimicrobiana de estos extractos naturales. Para ello deberán seleccionar la planta que quieran evaluar, las concentraciones de los extractos obtenidos, las cepas a evaluar, el medio de cultivo, los tiempos de exposición y los controles positivos y negativos.
- Con base en las plantas seleccionadas y la búsqueda bibliográfica, complete la información relacionada en la siguiente (Tabla 8.2.).

Tabla 8.2. Selección de plantas a evaluar.

| Microorganismo | Planta | Control Positivo | Resultados | Observaciones | Conclusión |
|----------------|--------|------------------|------------|---------------|------------|
| 1. | | | | | |
| 2. | | | | | |
| 3. | | | | | |

- Teniendo en cuenta los resultados de la tabla anterior, indique los posibles grupos químicos a los cuales se les atribuye el efecto inhibitorio de estas plantas.

9

**CAPÍTULO
NUEVE**

Capítulo nueve. Identificación de *Staphylococcus aureus* en murestras de alimentos

9.1. Resultados de aprendizajes

- Identifica las colonias típicas y atípicas de *Staphylococcus aureus* presentes en muestras de productos lácteos, a través de la siembra en superficie en agar Baird Parker.
- Clasifica los alimentos susceptibles a contaminación bacteriana mediante la actividad acuosa a través de las habilidades adquiridas en el simulador virtual.

9.2. Fundamentación teórica

Una de los grandes retos de la industria alimentaria es lograr la preservación de los alimentos, sus características organolépticas y microbiológicas, pues esto se relaciona directamente con la seguridad y estabilidad de los mismos. Para conseguir esto, es necesario conocer factores como la composición del alimento, su pH, procedencia, e incluso su actividad de agua (a_w , influye en las especies microbianas desarrolladas en los alimentos), y controlar las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, la temperatura), durante toda la cadena de producción alimentaria (Lorenzo et al., 2018). Así, cuando alguno de estos factores es pasado por alto, el riesgo de colonización por microorganismos patógenos aumenta considerablemente, lo que se podría ver traducido en enormes pérdidas económicas y afectaciones a la salud del consumidor. Cuando un microorganismo logra desarrollarse (hongos, bacterias, virus e incluso algunos parásitos (Tabla 9.1.)), comúnmente se evidencia en los atributos sensoriales; como el olor y el sabor del alimento, ocasionando que los consumidores rechacen el producto.

Tabla 9.1. Algunos de los principales agentes microbianos involucrados en intoxicaciones alimentarias.

| | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Salmonella</i> spp. | <i>Pediococcus</i> spp. | <i>Brucella</i> spp. | <i>Listeria</i> spp. | <i>Aspergillus</i> spp. | <i>Bothrytis</i> spp. |
| <i>Carnobacterium</i> spp. | <i>Streptococcus</i> spp. | <i>Compylobacter</i> spp. | <i>Escherichia coli</i> spp. | <i>Rhizopus</i> spp. | <i>Norovirus</i> |
| <i>Lactobacillus</i> spp. | <i>Lactococcus</i> spp. | <i>Yersinia</i> spp. | <i>Staphylococcus</i> spp. | <i>Penicillium</i> spp. | Virus de la Hepatitis |
| <i>Leuconostoc</i> spp. | <i>Bacillus</i> spp. | <i>Clostridium</i> spp. | <i>Mucor</i> spp. | <i>Alternaria</i> spp. | <i>Taenia</i> spp. |

Fuente: (Lorenzo et al., 2018)

En la mayoría de casos de intoxicación alimentaria, las personas desarrollan síntomas como diarrea, náuseas, vómito, dolores musculares, fiebre, entre otros. Sin embargo, algunos microorganismos patógenos tienen la capacidad de producir toxinas; que son de difícil eliminación, y que incluso podrían acarrear consecuencias aún más serias. Por este motivo, es fundamental prevenir el deterioro de alimentos por actividad microbiana (Lorenzo et al., 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) como “enfermedades de origen tóxico o natural, causadas por microorganismos o sustancias químicas que ingresan al cuerpo a través de alimentos o agua contaminada” (World Health Organization, 2020). Las ETAs atribuidas a bacterias pertenecientes al género *Staphylococcus* (Staphylococcal food-borne disease, SFD), tienen una alta incidencia a nivel mundial, y usualmente son causadas por la presencia de enterotoxinas producidas por *Staphylococcus aureus* [Enterotoxinas Estafilocócicas (SE por sus siglas en inglés)] (Kadariya et al., 2014).

El género *Staphylococcus* se compone de más de 50 especies, que en general viven como microbiota normal de animales homeotermos, incluidos los humanos (presente en piel, mucosas, cabello; entre otros, de más del 50 % de la población mundial) (Microbial Factsheet Series, 2011). Sin embargo, cierta especie de este

género es una de las causas principales de intoxicaciones alimentarias en el mundo (Fetsch & Johler, 2018). *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, definida como bacteria patógena oportunista (Rodríguez-Lázaro et al., 2017), lo que quiere decir que aprovecha condiciones determinadas en el hospedador; como defensas bajas, para desencadenar infecciones leves o enfermedades invasivas graves (Clínica Universidad de Navarra, 2022). Es aeróbica, pero puede llegar a presentar metabolismo anaerobio facultativo (Microbial Factsheet Series, 2011). Este microorganismo es capaz de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (7-48,5 °C), lo que representa un problema cuando se recurre a la temperatura como control de crecimiento. Además; es una de las bacterias que genera mayor preocupación en la industria alimentaria, debido a que exhibe características o capacidades particulares, tales como: ser resistente a antibióticos (como *S. aureus* Resistente a la Meticilina, MRSA), producir toxinas altamente peligrosas, soportar concentraciones de NaCl de hasta 15 %, sobrevivir en ambientes casi secos o tolerar ambientes que serían estresantes para la mayoría de bacterias; por ejemplo, ropa (Kadariya et al., 2014).

Una intoxicación causada por ingerir alimentos contaminados con *S. aureus*, puede hacerse evidente en un plazo tan corto como tres horas después del consumo del alimento; esto debido a la producción de toxinas cuando la bacteria se encuentra en condiciones idóneas de crecimiento. Sin embargo, el tiempo en que tardan en aparecer los síntomas después de haber consumido el alimento (Tiempo de incubación) puede variar, dependiendo de la cantidad de alimento ingerida, la concentración de toxinas en él (0.5 ng/mL son necesarios para causar una intoxicación alimentaria), la concentración del microorganismo en el alimento (aproximadamente $>10^5$ UFC/g) (Microbial Factsheet Series, 2011), e incluso la edad del consumidor. Algunos alimentos que pueden propiciar la colonización de esta bacteria son: carne, huevos, leche, productos de panaderías, ensaladas, entre otros (Kadariya et al., 2014).

Como se mencionó con anterioridad, las enterotoxinas estafilocócicas (Tabla 9.2.) generan particular preocupación para los productores y manipuladores de alimentos. Estas toxinas hacen parte de un grupo variado de toxinas resistentes al calor conocidas como toxinas pirogénicas, las cuales comprometen principalmente el sistema inmune del huésped; pues al parecer, logran traspasar algunas barreras naturales de protección del organismo de este. Son resistentes al calor, a enzimas encargadas de dañar proteínas, a condiciones ambientales adversas, a pH bajo, son solubles en agua, entre otros (Fetsch & Johler, 2018; Kadariya et al., 2014).

Tabla 9.2. Tipos de enterotoxinas estafilocócicas identificadas en la actualidad.

| | | | |
|----|----|---|---|
| A | C3 | H | L |
| B | D | I | M |
| C1 | E | J | N |
| C2 | G | K | O |

Fuente: (Microbial Factsheet Series, 2011)

Las toxinas de *S. aureus* pueden ser detectadas mediante bioensayos, biología molecular (como PCR, RT-PCR, RT-PCR cuantitativa, entre otras) y técnicas inmunológicas (como inmunoensayos enzimáticos) (Kadariya et al., 2014). En el laboratorio también es posible realizar una prueba de identificación conocida como “coagulasa”, esto debido a que la especie *S. aureus* es productora de dicha enzima (Tabla 9.3.), mientras que las demás especies del género *Staphylococcus*, no lo son (Bush, 2021). La prueba de coagulasa en tubo se realiza directamente a las colonias típicas o sospechosas obtenidas después de la siembra en medios de cultivo adecuados, la cual es interpretada como positiva cuando se evidencia la formación de un coágulo en el substrato empleado para la identificación, que usualmente es plasma de conejo + EDTA (Hernández Betancourt et al., 2005).

Tabla 9.3. Características típicas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Micrococcia*^a.

| Característica | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>Micrococcus spp</i> |
|-----------------------------------|------------------|-----------------------|------------------------|
| Actividad de catalasa | + | + | + |
| Producción de coagulasa | + | - | - |
| Producción de termonucleasa | + | - | - |
| Sensibilidad a lisostafina | + | + | - |
| Utilización anaeróbica de glucosa | + | + | - |
| Manitol | + | - | - |

^a +, la mayoría (más del 90%) de las cepas son positivas; -, la mayoría (más del 90%) de las cepas son negativas

Fuente: (Tallent et al., 2019)

La presencia de *S. aureus* es usualmente analizada en muestras de alimentos lácteos debido a que esta bacteria está presente también en animales, como ganado (a veces causando mastitis bovina); se puede encontrar en leche o derivados lácteos, convirtiéndose en un riesgo potencial para los consumidores (Gutiérrez et al., 2012). Algunas recomendaciones para prevenir las ETAs por *S. aureus* son: no dejar los alimentos a temperaturas entre 6-46 °C, cocinarlos a temperaturas sobre los 60 °C, almacenarlos por debajo de los 5 °C, limpiar periódicamente las neveras, tener conocimiento de las implicaciones que puede traer la mala manipulación de los alimentos, entre otras (Kadariya et al., 2014).

A continuación, se describe la metodología que se realizará en esta práctica de laboratorio, para identificar la presencia de *Staphylococcus aureus* en muestras lácteas:

9.3. Aislamiento de *Staphylococcus aureus* mediante siembra en superficie

9.3.1. Preparación de la suspensión inicial (10⁻¹)

1. En un recipiente estéril (bolsa de plástico o frasco) pese una masa o volumen de mínimo 10 g o 10 mL de la muestra (en caso de que se indique una cantidad diferente, modifique la masa o volumen).
2. Adicione una cantidad del diluyente (agua peptonada o solución salina fisiológica con peptona al 0.1%) igual a 9 mL por cada gramo o mililitro de la muestra, en este caso, 90 mL (se obtiene la dilución 1/10).
3. Homogenice realizando movimientos circulares al recipiente, durante 1 a 3 minutos, dependiendo del alimento (Figura 9.1.).

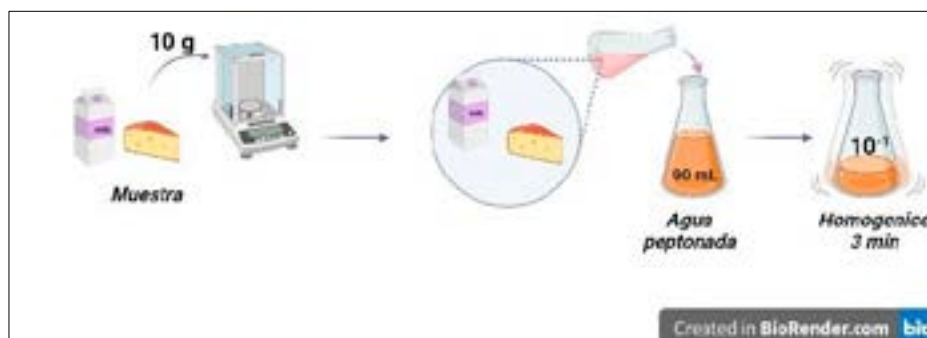


Figura 9.1. Suspensión láctea inicial.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

9.3.2. Preparación de las diluciones decimales (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc)

1. Con ayuda de una pipeta volumétrica de 1 mL o una micropipeta de volumen adecuado, transfiera 1 mL de la suspensión inicial (10^{-1}) a un tubo con 9 mL del diluyente estéril.
2. Mezcle muy bien durante 5 a 10 segundos, y así obtendrá la dilución 10^{-2} .
3. Tome 1 mL de la dilución 10^{-2} , y transfíralo a un tubo con 9 mL del diluyente estéril. Mezcle adecuadamente para obtener la dilución 10^{-3} .
4. Repita el paso anterior para obtener las diluciones que sean necesarias para conseguir un número apropiado de microorganismos para realizar el recuento.

9.3.3. Inoculación e incubación

Uno de los medios de cultivo ampliamente utilizado para la identificación de *Staphylococcus aureus* es el agar Baird Parker suplementado con yema de huevo y telurito. Este medio es selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *S. aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínicas. Contiene telurito potásico y cloruro de litio que actúan como agentes selectivos, y la yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitinasa y, además, la actividad de lipasa. Cuando el estafilococo es capaz de reducir el telurito, se pueden observar colonias de color de gris oscuro a negro (Figura 9.2.); cuando hay producción de lecitinasa, se evidencian zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes; y cuando existe actividad de lipasa, se forma una zona de precipitación alrededor de las colonias (Britania Lab Baird Parker, 2021).

1. Seleccione tres diluciones decimales consecutivas, las cuales deben ser críticas para el recuento y expresión de resultados.
2. Con ayuda de una pipeta estéril o micropipeta, transfiera 0.1 mL de la primera dilución seriada elegida, en la superficie de dos (2) cajas de Petri con medio de cultivo Baird Parker suplementado con yema de huevo y telurito (0.1 mL en cada una de las cajas).
3. Cuidadosamente, extienda el inóculo de manera uniforme, sobre la superficie del agar, sin tocar las paredes de la placa de Petri con el asa de Digiralsky esterilizada (siembra masiva).
4. Repita los últimos dos pasos, con las dos diluciones decimales restantes, utilizando una pipeta o puntas estériles nuevas para cada dilución decimal.
5. Deje las cajas a temperatura ambiente por 15 minutos para que el inóculo sea absorbido por el agar.
6. Invierta las cajas preparadas e incube a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ – $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24-48 horas.



Figura 9.2. Crecimiento típico de *S. aureus* en medio Baird Parker suplementado.

Fuente: foto propia, 2022.

9.3.4. Lectura y cálculo de resultados

- Una vez haya transcurrido el tiempo de incubación, seleccione las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas de *S. aureus* (Tabla 9.4.).

Tabla 9.4. Características de colonias típicas de *Staphylococcus aureus*.

| | | | |
|------------|------------|----------------|---|
| Negras | Brillantes | Convexas | Zona opaca y halo claro alrededor de la colonia |
| Circulares | Lisas | Diámetro 1-2mm | |

Fuente: (NOM-115-SSA1-1994, n.d.)

- Para realizar la prueba de coagulasa para confirmación, seleccione el número de colonias basándose en la Tabla 9.5.

Tabla 9.5. Número de colonias a elegir para prueba de coagulasa (NOM-115-SSA1-1994, n.d.)

| Número de colonias sospechosas en placa | Número de colonias a elegir para prueba de coagulasa |
|---|--|
| < 50 | 3 |
| 51 - 100 | 5 |
| 101 - 150 | 7 |

9.4. Prueba de coagulasa (Merek Bactident® Coagulase, 2022)

- En tubos de ensayo individuales con 0.5 mL de BHI; transfiera con ayuda de un asa metálica de redondel, cada una de las colonias típicas que haya elegido para la prueba de confirmación de coagulasa (un tubo de ensayo por colonia) (Figura 9.3.).
- Incube a 37 °C por 24 horas.



Figura 9.3. Inoculación de colonias sospechosas en BHI.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

- Cuidadosamente, reconstituya el plasma de conejo + EDTA en 3 mL de agua destilada.
- En tubos Eppendorf de 1.5-2 mL, adicione 0.1 mL del caldo BHI incubado (colonia sospechosa) y 0.3 mL del plasma de conejo + EDTA.
- Incube en baño de agua a 37 °C por 6 horas. Cada hora debe revisar los tubos Eppendorf para corroborar si se observa coagulación (Figura 9.4.).
- La prueba es considerada positiva cuando más de tres cuartos del tubo tiene formación de coágulo.

Nota: si después de las 6 horas de incubación la prueba sigue siendo negativa, incube por 24 horas y revise de nuevo si definitivamente no hay formación de coágulos.

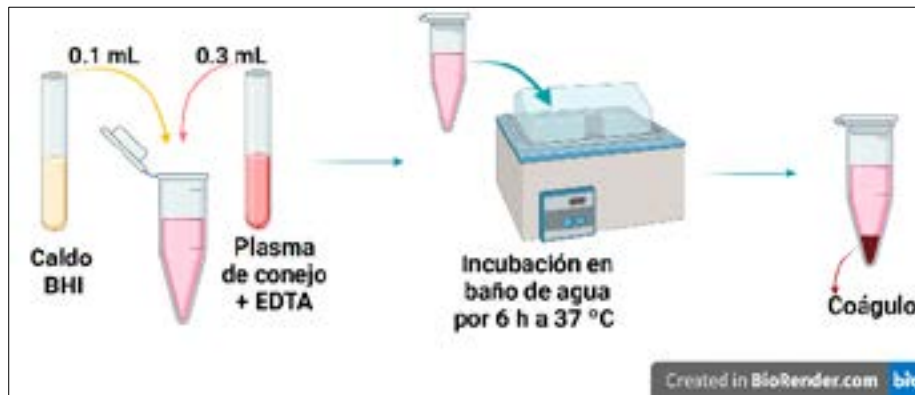


Figura 9.4. Prueba de coagulasa con colonias sospechosas.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

9.4. Cálculo y expresión de resultados

En este punto, debe tener en cuenta el número de colonias totales desarrolladas en las placas seleccionadas para recuento, el número de colonias confirmadas, la dilución sembrada y el volumen inoculado, que en este caso es de 0.1 mL. A continuación, se presenta un ejemplo para realizar el cálculo de los resultados obtenidos (NOM-115-SSA1-1994, n.d.)

- Colonias totales: 80
- Colonias elegidas para prueba de coagulasa: 5
- Colonias confirmadas: 4
- Dilución: 10^{-3} (1:1000)

$$\frac{80 \times 4}{5} = 64 \times 1000 \times 10 = 640.000$$

Informar como: 6.4×10^5 UFC/g

9.5. Actividad práctica

A continuación, encontrará un simulador de libre acceso donde podrá realizar la actividad virtual propuesta para la presente práctica de laboratorio:

<https://virtuallabs.nmsu.edu/wateractivity/>

Fuente: (Virtual Labs, n.d.)

- Complete la Tabla 9.6., e identifique los alimentos que son más susceptibles a ser contaminados con *S. aureus*, la actividad acuosa de ellos y posibles formas de prevenir su contaminación.

Tabla 9.6. Alimentos susceptibles a ser contaminados por *Staphylococcus aureus*.

| Alimento | Actividad acuosa | Prevención |
|-----------------|-------------------------|-------------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |

- b. Describa qué otros alimentos son susceptibles a la colonización de diferentes microorganismos, mencione la actividad acuosa de los mismos, los microorganismos que pueden contaminarlos y algunas formas de prevenir que esto ocurra.
- c. ¿Qué otras técnicas microbiológicas existen para identificar microorganismos contaminantes en alimentos?

10

**CAPÍTULO
DIEZ**

Capítulo diez. Fermentación láctica

10.1. Resultados de aprendizaje

- Elabora yogurt mediante un proceso de fermentación láctica en el laboratorio.
- Interpreta la importancia de las variables a controlar en un proceso de fermentación, a través del desarrollo del cuestionario presente en el simulador virtual.

10.2. Fundamentación teórica

La fermentación ha existido desde hace muchos años atrás. Se daba de forma natural al dejar los alimentos expuestos a condiciones ambientales (que eventualmente hacían que estos entraran en estado de putrefacción); o de forma controlada, cuando se entendieron las bases de este proceso y los factores que se deben tener en cuenta para que la fermentación ocurra de manera prolongada y permita la preservación y mejoramiento de las características organolépticas de los alimentos (además, aumenta la disponibilidad de vitaminas, aminoácidos, proteínas, etc). Lo que es cierto, es que para aquel tiempo era impensable que los responsables de que ciertas transformaciones se dieran en los alimentos, fuesen los microorganismos (Hutkins, 2006)

La fermentación es un proceso donde se da la conversión de un azúcar en un ácido orgánico o alcohol; un proceso donde se rompen moléculas orgánicas complejas, en unas más simples, por la acción de microorganismos (R. Sharma et al., 2020). Sin embargo, este proceso también puede ser definido -en un sentido industrial-, como el uso de microorganismos como bacterias y hongos para obtener productos que tengan alguna utilidad para los humanos (dióxido de carbono y alcohol) (Paulová et al., 2013; Vaclavik & Christian, 2008).

Cuando este proceso se propicia en alimentos, se obtienen ventajas como (R. Sharma et al., 2020):

- Alargar la vida útil de los alimentos, en comparación con aquellos que no son transformados mediante fermentación.
- Mejorar propiedades nutricionales.
- Modificar características organolépticas.
- Reducción de tiempos de cocción.
- Aumentar la capacidad antioxidante.
- Hacer frente a microorganismos patógenos presentes en materias primas.
- Producir nuevas enzimas.

El tipo de fermentación obtenida en alimentos depende directamente de la composición inicial del sustrato a fermentar, y del microorganismo fermentador. Sin embargo, el grupo bacteriano que interviene la mayoría de procesos fermentativos son las Bacterias Ácido Lácticas (BAL) como *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, y mohos y levaduras de los géneros *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Geotrichium*, *Mucor*, *Penicillium*, y *Rhizopus* (R. Sharma et al., 2020). Gracias a estos géneros microbianos, es posible obtener diversos productos alimentarios (Tabla 10.1.).

Tabla 10.1. Algunos productos alimentarios y los microorganismos involucrados en su fermentación.

| Producto | Sustrato | Microorganismos fermentadores |
|-------------------------|---------------------------------|--|
| Yogurt, queso, kéfir | Leche y caseína | <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. kefir</i> , <i>P. camemberti</i> , <i>P. roqueforti</i> , <i>S. cerevisiae</i> . |
| Kimchi, miso, tempeh | Jengibre, pepino, brócoli, etc. | <i>L. mesenteroides</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>R. oligosporus</i> , <i>R. oryzae</i> , <i>E. faecalis</i> . |
| Vino, cerveza, kombucha | Uvas, arroz, cereales, etc. | <i>Z. bailii</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>S. cerevisiae</i> . |

Fuente: (R. Sharma et al., 2020)

Las BAL son bacterias productoras de ácido láctico, son cocos o bacilos Gram positivos, no forman esporas, no pueden movilizarse, son catalasa negativa y anaerobias facultativas (Raj et al., 2022); se diferencian de las demás bacterias Gram positivas gracias a algunas características fenotípicas y genotípicas. Son organismos con exigencias nutricionales altas, pues únicamente crecen en medios ricos en nutrientes con condiciones ambientales óptimas. Además, su habilidad fermentativa radica en el hecho de que pueden metabolizar azúcares, obteniendo ácido láctico a través de una ruta homofermentativa (conversión de más del 90 % del sustrato en este subproducto); o etanol a través de una ruta heterofermentativa (conversión de alrededor del 50 % del sustrato en ácido láctico, y el porcentaje restante es transformado en alcohol, ácido acético y dióxido de carbono) (Hutkins, 2006).

La ruta homofermentativa es utilizada por algunas BAL para convertir 1 mol de glucosa en 2 moles de ácido láctico (Ruta Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP)) (Martínez-Miranda et al., 2022). Las bacterias que siguen esta ruta, lo hacen gracias a la presencia de enzimas como la aldolasa y hexosa isomerasa. Por otro lado, en la ruta heterofermentativa, las BAL convierten 1 mol de glucosa en 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂. Esto es debido a que presentan la enzima fosfocetolasa (pero no presentan las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, por lo tanto, no siguen la ruta EMP), entonces siguen la vía de las pentosas. Las BAL pueden ser clasificadas dependiendo de su temperatura de crecimiento. Las bacterias mesófilas se desarrollan idealmente a temperaturas entre 20-25 °C, su tiempo de incubación es de aproximadamente 20 horas, tienen acidez final 0.8% de ácido láctico, y solo es requerido un volumen de cultivo líquido de 1-2 % para que sean utilizadas en procesos de fermentación. En contraparte, las bacterias termófilas crecen a temperaturas entre 40-45 °C, su tiempo de incubación es 2-4 horas, tienen acidez final 0.9% de ácido láctico, y se requiere un volumen de cultivo líquido de 2-3 % para emplearlas en fermentaciones (Parra Huertas, 2010).

Filogenéticamente, existen aproximadamente 30 géneros bacterianos y 300 especies (Tabla 10.2.) (Khubber et al., 2022) pertenecientes al phylum *Firmicutes* (Raj et al., 2022), sin embargo, siete géneros son utilizados principalmente en procesos de fermentación. A continuación, se describen brevemente dichos géneros y la ruta fermentativa favorecida por cada uno de ellos indicada mediante el signo positivo.

Tabla 10.2. Principales géneros de Bacterias Ácido Lácticas

| Género bacteriano | Morfología | Ruta de fermentación | |
|------------------------|------------|----------------------|--------------------|
| | | Homofermentativa | Heterofermentativa |
| <i>Enterococcus</i> | Cocos | + | |
| <i>Lactococcus</i> | | + | |
| <i>Leuconostoc</i> | | | + |
| <i>Oenococcus</i> | | | + |
| <i>Pediococcus</i> | | + | |
| <i>Streptococcus</i> | | + | |
| <i>Tetragenococcus</i> | | + | |
| <i>Aerococcus</i> | | + | |
| <i>Vagococcus</i> | | + | |
| <i>Weissella</i> | | Cocoide | |

| | | | |
|-----------------------|---------|---|---|
| <i>Lactobacillus</i> | Bacilos | + | + |
| <i>Carnobacterium</i> | | | + |

Fuente:(Hutkins, 2006)

Nota: los símbolos (+) hacen referencia al tipo de ruta de fermentación que tiene cada género bacteriano.

Lactobacillus es el género más reconocido entre las bacterias ácido lácticas, son bacilos que varían de tamaño (desde 1.5-10 µm). Es el grupo más diverso entre las BAL, en cuanto a ecología, fisiología, genética y bioquímica. Las especies de este género crecen en temperaturas entre 30-45°C, resisten concentraciones altas de sal, presión osmótica e incluso actividad de agua baja en alimentos. Algunas especies heterofermentativas del género *Lactocobacillus* son: *plantarum*, *rhamnosus*, *coryneformis*, *curvatus*, *casei*, *paracasei*, *brevis*, *buchneri*, *fermentun*, *kéfir*, *reuteri*. Mientras que algunas especies homofermentativas de este género son: *acidophilus*, *helveticus*, *delbrueckii subsp delbrueckii*, *debrueckii subsp lactis*, *delbrueckii subsp bulgaricus*, *lactis*, *thermophilus* (Parra Huertas, 2010).

El género *Lactococcus* está compuesto por cinco especies: *lactis*, *garviae*, *piscium*, *plantarum* y *raffinolactis* (Bandyopadhyay et al., 2022). Son bacterias inmóviles, siguen de forma obligada la ruta homofermentativa, son anaerobias facultativas, y su crecimiento óptimo se da a 30 °C. De estas, *Lactococcus lactis* es aislada usualmente de leche cruda, y por esto es una de las bacterias más utilizadas como iniciadora de cultivos lácticos a nivel industrial (Bandyopadhyay et al., 2022). Lo anterior, se explica desde una base genética, pues esta bacteria posee genes específicos involucrados en la transformación de lactosa y el metabolismo e hidrólisis de la caseína presente en la leche.

Leuconostoc es un género bacteriano que pertenece a la familia *Leuconostocaceae*, compuesto por especie mesófilas, y algunas psicrófilas, que son heterofermentativas obligadas (el metabolismo de azúcares lo realizan por la ruta fosfocetolasa). Dependiendo del medio donde sean inoculadas (sólido o líquido), su forma microscópica puede variar (Hutkins, 2006).

El género *Oenococcus* fue conformado hace menos de 27 años, y está integrado por una sola especie: *Oenococcus oeni*. Es una bacteria mesófila y heterofermentativa, tolera excelentemente los ambientes ácidos, incluso más que bacterias del género *Leuconostoc*. Particularmente, *O. oeni* es una de las BAL más resistentes a altas concentraciones de etanol, pues es metabólicamente activa incluso en medios con más del 10% de etanol (Hutkins, 2006).

Pediococcus es un género conformado por especies homofermentativas, con requerimientos nutricionales elevados. Algunas especies pueden crecer a temperatura de hasta 50 °C, toleran niveles ácidos de pH 4.2, y concentraciones de sal de 6.5%. El género *Streptococcus* se compone de especies encontradas en diversos hábitats, no son móviles, son anaerobias facultativas y tienen metabolismo homofermentativo. *S. thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* son usadas en la producción de alimentos fermentados - como yogurt y queso- (Ağagündüz et al., 2022), especialmente alimentos que requieren temperaturas altas en su proceso de transformación, pues esta bacteria tiene una temperatura óptima de crecimiento de 40-42 °C. Una característica de esta especie es que su actividad proteolítica es reducida; por esto, es necesario contar con un sustrato rico en aminoácidos preformados. *Tetragenococcus* se compone de tres especies: *T. halophilus*, *T. muriaticus* y *T. solitarius*. Son bacterias homofermentativas, anaerobias facultativas, mesófilas y neutrófilas, y toleran pH entre 6.5-8 (Hutkins, 2006).

Uno de los productos obtenidos con mayor frecuencia por fermentación láctica de la leche, es el yogurt. Es importante tener en cuenta que un producto podrá ser llamado de esta manera, únicamente cuando la materia prima (leche) ha sido transformada por dos bacterias: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (antes conocido como *Lactobacillus bulgaricus*) y *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (antes conocido como *Streptococcus thermophilus*) De lo contrario; si intervienen otros microorganismos como

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus casei* o *Bifidobacterium bifidum*, el producto sería denominado “Productos lácteo probiótico” (Sanusi et al., 2022).

En la elaboración de yogurt, los componentes de la leche son transformados por bacterias ácido-lácticas, principalmente por tres procesos bioquímicos; fermentación, hidrólisis y lipólisis. La combinación de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* le provee una propiedad particular al yogurt en su textura y sabor (Huang et al., 2020).

10.3. Elaboración de yogurt⁴

10.3.1. Determinación de la acidez titulada de la materia prima (leche)

La acidez titulable mide la concentración de ácidos totales en muestras de alimentos (Ramadan et al., 2021). Para determinar la acidez de la materia prima, proceda de la siguiente manera (Figura 10.1.):

1. En un matraz, ponga 20 mL de leche y adicione 4 gotas de Fenolftaleína.
2. Titule con NaOH 0.1N hasta que obtenga un color rosa.
3. Realice los cálculos teniendo en cuenta la siguiente fórmula

$$\text{Acidez}\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{V \times N \times 90}{M}$$

V: mL de NaOH 0.1N usados en titulación

N: normalidad de la solución de NaOH

M: volumen de muestra en mL

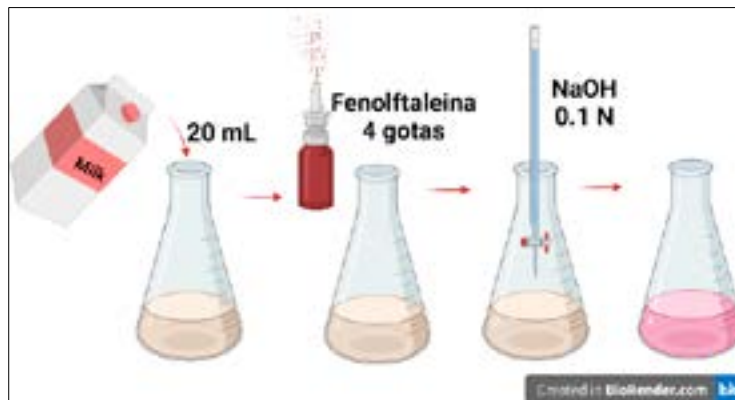


Figura 10.1. Determinación de la acidez titulable de la materia prima (leche).

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

⁴ Procedimiento basado en (Ramírez Portillo, 2015)

10.3.2. Confirmación morfológica del cultivo iniciador

Para asegurarse de que está trabajando con bacterias ácido lácticas, realice una coloración de Gram al cultivo bacteriano con el que vaya a realizar la fermentación. Tenga en cuenta que deberá observar bacilos (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) y cocos (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) Gram positivos (Figura 10.2.).

Nota: en caso de que no trabaje con un cultivo, sino con yogurt natural como iniciador, omita el paso de la confirmación morfológica.

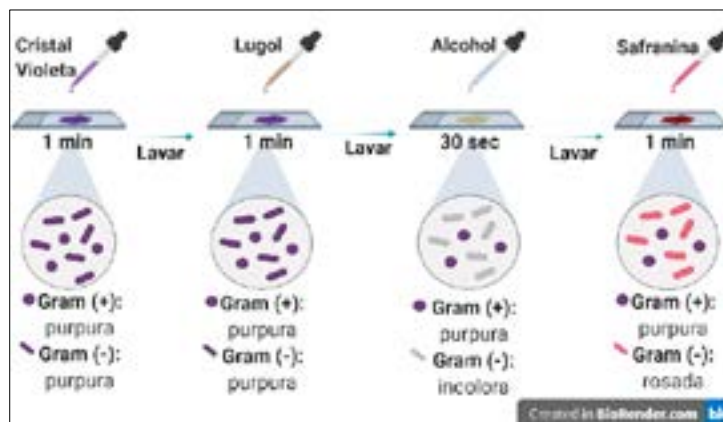


Figura 10.2. Confirmación morfológica del cultivo iniciador.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

10.3.3. Procedimiento para la elaboración de yogurt

10.3.3.1. Inoculación con cultivo iniciador de la fermentación

1. En una olla, caliente 1 L de leche entera pasteurizada, hasta que alcance una temperatura de 85-90 °C.
2. Retire del fuego y deje enfriar
3. Adicione 15 g/L de leche en polvo y 15 g/L de azúcar, y mezcle adecuadamente.

Nota: se adiciona leche en polvo para brindar una consistencia firme al yogurt.

4. Una vez la temperatura descienda a 43-45 °C, adicione 20 g/L de yogurt natural y mezcle adecuadamente (Figura 10.3.).

Nota: debe asegurarse de que el yogurt natural de su elección tiene adición de las bacterias ácido lácticas de interés para esta práctica de laboratorio. En caso de que trabaje con un cultivo bacteriano iniciador, adicione en proporción del 3 %.

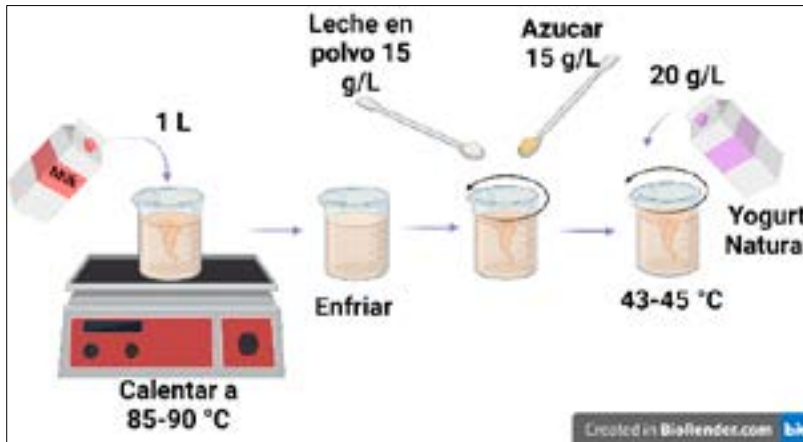


Figura 10.3. Adición de cultivo iniciador para la fermentación.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

10.3.3.2. Incubación del producto lácteo

En este paso, se da el proceso de fermentación por parte de las BAL. Por tal motivo, es necesario que se controle de forma cuidadosa la temperatura a la cual se encuentre el producto, que deberá estar entre los 42-44 °C. El tiempo de incubación podrá variar entre 3 a 10 horas. Usualmente el proceso de fermentación culmina cuando el pH llega a 4.2 o 4.5 (Figura 10.4.).

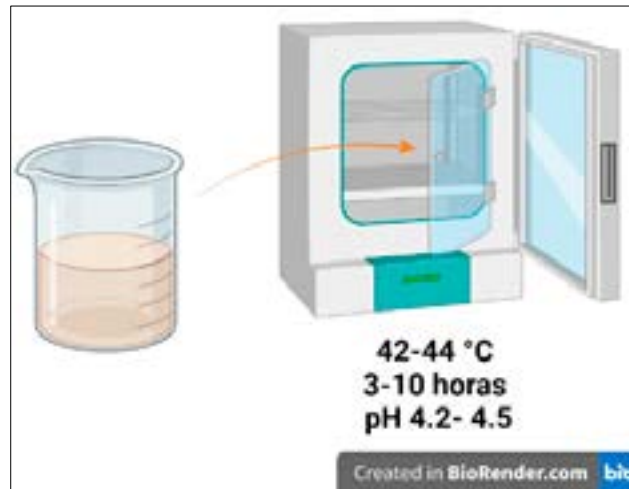


Figura 10.4. Condiciones de incubación del producto lácteo.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

10.3.3.3. Enfriamiento del producto obtenido por fermentación

Una vez haya culminado el proceso de fermentación, es necesario disminuir la temperatura a aproximadamente 20 °C. Para esto, haga un baño de hielo, e introduzca el recipiente donde tiene contenido el producto lácteo (Figura 10.5.).

Nota: con el descenso de la temperatura se busca detener el desarrollo bacteriano, para que no se alteren las

propiedades del sabor del producto.



Figura 10.5. Enfriamiento del producto obtenido por fermentación.

Fuente: gráfica propia. Creada con BioRender

10.3.3.4. Envasado y refrigeración

Disponga el producto obtenido en un recipiente de vidrio estéril y conserve a una temperatura entre 0-4 °C.

10.4. Actividad interactiva

A continuación, encontrará enlace donde debe ingresar su nombre completo y seguir los pasos para cultivar *E. coli* en un proceso de fermentación:

<https://www.ncbionetwork.org/iet/fermentation/>

Fuente: (NcBionetwork, n.d.)

10.4. Actividad práctica

- Indique dos ideas principales en cada una de las fases de crecimiento de las bacterias
- ¿Qué variables son importantes medir durante el proceso de fermentación?
- ¿Cuál es la temperatura y el pH adecuado para iniciar el cultivo de *E. coli*?
- ¿En qué parte del proceso (Fase de crecimiento) se debe transferir el cultivo al tanque de fermentación y cuál es el propósito de este procedimiento?
- ¿Qué importancia tiene este proceso desde el punto de vista biotecnológico?
- Identifique un alimento fermentado, indique el (los) microorganismo (s) involucrado (s) en la fermentación y describa brevemente su proceso fermentativo.

Bibliografía

- Ağagündüz, D., Şahin, T. Ö., Ayten, Ş., Yılmaz, B., Güneşliol, B. E., Russo, P., Spano, G., & Özogul, F. (2022). Lactic acid bacteria as pro-technological, bioprotective and health-promoting cultures in the dairy food industry. *Food Bioscience*, 47 (February). <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101617>
- Agencia Iberoamericana para la difusión de la ciencia y la tecnología. (2022). *El microscopio, un instrumento imprescindible para la Ciencia*. <https://www.dicyt.com/noticias/el-microscopio-un-instrumento-imprescindible-para-la-ciencia>
- Agentes Físicos*. (2020). Universidad de Granada. <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm>
- Agentes Químicos*. (2020). Universidad de Granada. <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/14agquimicos.htm>
- Antiguo Microscopio Compuesto*. (n.d.). Retrieved May 13, 2022, from <https://www.antiguedadestecnicas.com/productos/D-181.php>
- AQUÍ Medios de Comunicación. (2021). *La historia de un invento crucial: el microscopio*. <https://aquimediosdecomunicacion.com/2021/10/15/la-historia-de-un-invento-crucial-el-microscopio/>
- Arias-Cifuentes, E. L., & Piñeros-Espinosa, P. A. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelos de los páramos de Guasca y Cruz Verde* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8233/tesis226.pdf;jsessionid=61F7>
- Arvidson, C., Chen, J., Rhodes, M., Spurbeck, R., & Foster, D. (n.d.). *Gram Stain*. Retrieved May 14, 2022, from https://learn.chm.msu.edu/vibl/vibl/GramStain/gram_stain_HTML5Canvas.html
- Athafah, A., Sabah, I., Alamer, A., Li, B., & Zhang, J. (2020). A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role : A new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper. *Biological Control*, 145(March), 104261. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104261>
- Bandyopadhyay, B., Das, S., Kumar Mitra, P., Kundu, A., Mandal, V., Adhikary, R., & Chandra Mandal, N. (2022). Characterization of two new strains of *Lactococcus lactis* for their probiotic efficacy over commercial synbiotics consortia. *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00685-6>
- Barrios, M. B., & Sandoval, M. C. (2018). Caracterización de hongos presentes en suelos con usos contrastantes. *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria, Agroindustrial y Ambiental.*, 5(1), 3–9.
- Basak, S., & Shetty, P. H. (2021). Conventional Microbial Counting and Identification Techniques. In *Techniques to Measure Food Safety and Quality* (pp. 69–89). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_4
- Bhumbla, U. (2018). Culture Media. In *Workbook for Practical Microbiology* (pp. 76–76). Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. https://doi.org/10.5005/jp/books/14206_12

- Bilbao, N. (2009). Antisépticos y desinfectantes. *Farmacia Profesional*, 23, 37–39.
- BioNetwork. (2018). *Virtual Microscope*. <http://www.ncbionetwork.org/iet/microscope/>
- Blamis. (2022). *Agar Para Coliformes Para Microbiologia Chromocult (500g)*. <https://blamis.com.co/agar-para-coliformes-para-microbiologia-chromocult-500g>
- Bonifaz Trujillo, J. (2015). Propiedades generales de los hongos. In Mc Graw Hill Education (Ed.), *Micología Médica Básica* (5th–2015th ed.). <https://slideplayer.es/slide/13645729/>
- Britania Lab Baird Parker. (2021). *Baird Parker Agar Base*. <http://www.britanialab.com/productos/B02141REV01-BAIRD-PARKER-AGAR-BASE.pdf>
- Britania Lab EMB. (2021). *E.M.B. Agar (con Eosina y Azul de Metileno)* (pp. 2–3). Britania Lab. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6054e713a290e.pdf
- Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (2013). *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology*. McGraw-Hill Medical.
- Bush, L. (2020). *Defensas contra la infección*. Manual MSD. <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/biología-de-las-enfermedades-infecciosas/defensas-contra-la-infección>
- Bush, L. (2021). *Infecciones por Staphylococcus aureus*. Manual MSD. <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/infecciones-por-staphylococcus-aureus>
- Cabrera, J., & Passalacqua, N. (2014). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial*. ANMAT.
- Castillo Arias, A. (2019). *Evaluación de las propiedades antimicrobianas y atributos sensoriales de aceite esencial de jengibre (Zingiber officinale) adicionado a una matriz de paté de hígado de cordero*. [https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78039/Evaluación de las propiedades antimicrobianas y atributos sensoriales de aceite esencial de jengibre %28Zingiber officinale%29 adicionado a una matriz de paté de hígado de cordero.pdf?sequence=1&](https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/78039/Evaluación%20de%20las%20propiedades%20antimicrobianas%20y%20atributos%20sensoriales%20de%20aceite%20esencial%20de%20jengibre%20(Zingiber%20officinale)%29%20adicionado%20a%20una%20matriz%20de%20paté%20de%20hígado%20de%20cordero.pdf?sequence=1&)
- Cercenado, E., & Saavedra-Lozano, J. (2009). El antibiograma. Interpretación del antibiograma: conceptos generales (I). *Desde El Laboratorio a La Clínica*, 7(4), 214–217. [https://doi.org/10.1016/S1696-2818\(09\)71927-4](https://doi.org/10.1016/S1696-2818(09)71927-4)
- Clínica Universidad de Navarra. (2022). *Microorganismo oportunista*. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/microorganismo-oportunista#:~:text=Microorganismo normalmente no patógeno y,varios>
- Condalab. (2019). *Agar Rosa Bengala + Cloranfenicol + Dicloran (Agar DRBC) ISO*.
- Cuervo Mulet, R. A. (2010). *Manual de protocolos de microbiología general*.
- Di Gianfrancesco, A. (2017). Technologies for chemical analyses, microstructural and inspection investigations. *Materials for Ultra-Supercritical and Advanced Ultra-Supercritical Power Plants*, 197–245. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100552-1.00008-7>

- Dirección de Bromatología de Neuquen. (2021). *Procedimientos de microbiología general*.
- Equipo iSalud. (2019). *¿Existen los antibióticos naturales?* ISalud.Blog. <https://www.isalud.com/blog/existen-los-antibioticos-naturales/>
- Erkmen, O. (2021). Temperature effects on microorganisms. *Laboratory Practices in Microbiology*, 193–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91017-0.00025-1>
- Fernández-Cirelli, A. (2012). El agua: un recurso esencial. *Química Viva*, 11(3), 147–170. <https://www.redalyc.org/pdf/863/86325090002.pdf>
- Fernández-Santisteban, M. T. (2017). Determinación de coliformes totales y fecales en aguas de uso tecnológico para las centrifugas. *ICIDCA*, 51(2), 70–73. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223154251011.pdf>
- Fernández Olmos, A., García de la Fuente, C., Sáez Nieto, J. A., & Valdezate Ramos, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología . In *Procedimientos en Microbiología Clínica* (pp. 1–52).
- Fetsch, A., & Johler, S. (2018). Staphylococcus aureus as a Foodborne Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(2), 88–96. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0094-x>
- Fitopatología Académica. (2020). *Capacidad biocontroladora de una cepa de Trichoderma*. https://www.youtube.com/watch?v=7PtnPG3C5iY&ab_channel=FitopatologíaAcadémica
- Ford, B. J. (2002). El nacimiento del microscopio. *ContactoS*, 45, 29–38.
- Fundación General de la Universidad de Salamanca. (n.d.). *Recuento de hongos filamentosos y levaduras*. http://coli.usal.es/web/demos/demo_alteracion/RtoHongosLev/RtoHongosLev.html
- Garzón Vallejo, J. F. (2018). *Uso del ajo y/o sus compuestos activos como agente antimicrobiano en la industria de alimentos*. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/21491/81754429.pdf?sequence=1&is>
- Gegunde Díaz, A. (2016). *Evaluación de la capacidad antimicrobiana de dos productos naturales, el ajo y la miel*.
- Golani, N. (n.d.). *Laboratory Diagnosis of Fungi*.
- Gómez González, J. A. (2019). *Compuestos con actividad antimicrobiana en plantas del género Kalanchoe como tratamiento promisorio para infecciones producidas por bacterias*. <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/30708/ju88gom020.pdf?sequence=1&>
- Goni López, I. (2015, July 7). *Los microscopios de van Leeuwenhoek ¿Cuántos microscopios originales de Leeuwenhoek existen?* Investigación y Ciencia. <https://www.investigacionyciencia.es/blogs/medicina-y-biologia/43/posts/los-microscopios-de-van-leeuwenhoek-13351>
- Guardiola San Román, T. (2020). *Antimicrobianos naturales presentes en colorantes alimentarios*. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/157845/Guardiola - Antimicrobianos naturales presentes en colorantes alimentarios.pdf?seq>

- Gupta, R., & Gupta, N. (2021). Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism. In *Fundamentals of Bacterial Physiology and Metabolism*. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-0723-3>
- Gutiérrez, D., Delgado, S., Vázquez-Sánchez, D., Martínez, B., Cabo, M. L., Rodríguez, A., Herrera, J. J., & García, P. (2012). Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(24), 8547–8554. <https://doi.org/10.1128/AEM.02045-12>
- Hernández Betancourt, O., Ulloa Cuesta, Y., Del Río Méndez, D., & Galdós, M. del C. (2005). *Staphylococcus aureus* y su identificación en los laboratorios microbiológicos. *Archivo Médico de Camagüey*, 9(1), 142–152. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552005000100016
- Hongos Microscópicos*. (2021). Microbiología .Net. <https://microbiologia.net/eucariotas/hongos/>
- Huang, Y. yan, Yu, J. jia, Zhou, Q. yu, Sun, L. na, Liu, D. mei, & Liang, M. hua. (2020). Preparation of yogurt-flavored bases by mixed lactic acid bacteria with the addition of lipase. In *Lwt* (Vol. 131). <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109577>
- Hutkins, R. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. In *Blacwell publishing*.
- IDEAM. (n.d.). *Suelo*. SIAC. [http://www.ideam.gov.co/web/siac/suelo#%3A~%3Atext%3DEl suelo es un componente%20de la tierra](http://www.ideam.gov.co/web/siac/suelo#%3A~%3Atext%3DEl%20suelo%20es%20un%20componente%20de%20la%20tierra)
- Introduction to Lab Safety*. (2018). NCBioNetwork.Org. <https://www.ncbionetwork.org/iet/labsafety/>
- ISO 4833-1:2013 Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique*. (n.d.). Retrieved May 14, 2022, from <https://www.iso.org/standard/53728.html>
- Kadariya, J., Smith, T. C., & Thapaliya, D. (2014). *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health. *BioMed Research International*, 1–9. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/827965>
- Khan, M. S., & Rahman, M. S. (2021). Techniques to Measure Food Safety and Quality. In *Techniques to Measure Food Safety and Quality*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-68636-9_1
- Khubber, S., Marti-Quijal, F. J., Tomasevic, I., Remize, F., & Barba, F. J. (2022). Lactic acid fermentation as a useful strategy to recover antimicrobial and antioxidant compounds from food and by-products. *Current Opinion in Food Science*, 43, 189–198. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2021.11.013>
- Kirby-Bauer Antimicrobial Susceptibility Test*. (n.d.). https://learn.chm.msu.edu/vibl/vibl/KirbyBauer/KirbyBauer_HTML5Canvas.html
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). *Reino fungi: morfologías y estructuras de los hongos* (No. 28). <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Agaric>
- LabXchange*. (2022). https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:905fcd23:lx_simulation:1
- Lafranconi, M. (2001). Historia de la Microscopía. *Universidad Nacional Del Mar de Plata*.

- López-Suárez, K. (2015). Validación del método filtración por membrana para análisis microbiológico de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas marinas. *Boletín Científico CIOH*, 33, 215–220. <https://doi.org/https://doi.org/10.26640/22159045.287>
- López Pérez, J. P., & Boronat Gil, R. (2019). Estudio y observación de la actividad antimicrobiana de la cebolla (*Allium cepa* L.) en un laboratorio de Educación Secundaria. *Aula, Museos y Colecciones*, 6(1), 167–175. <https://doi.org/10.29077/aula/6/lopez>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation: Inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>
- Lorin, D., Teusdea, V., Mitranescu, E., Danes, M., Stef, L., Mosneang, C. L., & Cristina, R. T. (2017). The mycobiota composition in eight Romanian representative poultry and swine farms. *Romanian Biotechnological Letters*, 22(5), 12961–12971.
- Martínez-Miranda, J. G., Chairez, I., & Durán-Páramo, E. (2022). Mannitol Production by Heterofermentative Lactic Acid Bacteria: a Review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-03836-5>
- Maryani, N., Sandoval-Denia, M., Lombard, L., Crous, P., & Kema, G. (2019). New endemic *Fusarium* species hitch-hiking with pathogenic *Fusarium* strains causing Panama disease in small-holder banana plots in Indonesia. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 43(1). <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.02>
- Mateos, P. (n.d.). *Control de poblaciones microbianas: esterilización y desinfección*. Departamento de Microbiología y Genética. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca. <http://webcd.usal.es/Web/educativo/micro2/tema08.html#anchor136196>
- Mendoza, P. A., & Torres, C. (2016). Determinación y comparación de microhongos del suelo de un bosque húmedo premontano en Dagua, Valle del Cauca. *Revista de Ciencias*, 20(2), 27–35. <http://www.scielo.org.co/pdf/rcien/v20n2/0121-1935-rcien-20-02-00027.pdf>
- Merck Bactident® Coagulase. (2022). *Bactident® coagulasa plasma de conejo con EDTA, liofilizado* (Issue 1907, pp. 1–9). <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/sds/mm/1.13306>
- Merck Chromocult®. (2022). *Agar para coliformes según ISO 9308-1* (Issue 1907, pp. 1–10). Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/sds/mm/1.10426>
- Merck GranuCult™. (2021). *GranuCult™ VRB (Violet Red Bile Lactose) Agar acc. ISO 4832 and FDA-BAM*. (Issue 1907, pp. 1–10). Merck.
- Merck MF-Millipore®. (2022). *Membrane Filter, 0.45 µm pore size* (Issue 1907, pp. 1–11). Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/CO/es/product/mm/hawp04700?gclid=Cj0KCQjwr->
- Michigan State University. (2010). *Streak Plate Test*. Virtual Interactive Bacteriology Laboratory.
- Microbial Factsheet Series. (2011). *Staphylococcus aureus* (p. 5). Food Safety Authority of Ireland.
- Montaño Arias, N. M., Sandoval Pérez, A. L., Camargo Ricalde, S. L., & Sánchez Yáñez, J. M. (2010). Los

- microorganismos : pequeños gigantes. *Revista Ciencia y Cultura Elementos*, 77(0187–9073), 15–23. <https://www.redalyc.org/pdf/294/29411989003.pdf>
- NcBionetwork. (n.d.). *Fermentation*. <https://www.ncbionetwork.org/iet/fermentation/>
- New Nouveau Brunswick. (n.d.). *Facts on Drinking Water. Coliform bacteria - Total coliforms & E. coli*. <https://www2.gnb.ca/content/dam/gnb/Departments/h-s/pdf/en/HealthyEnvironments/water/Coliforme.pdf>
- NOM-115-SSA1-1994. (n.d.). *Metodo para la determinacion de Staphylococcus aureus en alimentos*. <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/mex13529.pdf>
- Ocares, Y., & Castro F, J. F. (n.d.). *Preservación de microorganismos por congelación* (pp. 119–133). Instituto de Investigaciones Agropecuarias.
- Olmos Pulido, E., Juárez Gracia, H. G., Marinero Renteria, S. D. J., & Granada Ramírez, A. (2018). *Historia de la microbiología*.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). *Resistencia a los antibióticos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
- Pacasa-Quisbert, F., Loza-Murguía, M. G., Bonifacio-Flores, A., Vino-Nina, L., & Serrano-Canaviri, T. (2017). Comunidad de hongos filamentosos en suelos del Agroecosistema de K' iphak ' iphani , Comunidad Choquenaira-Viacha. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(1), 2–25.
- Páez-Sanabria, L. J. (2008). *Validación secundaria del método de filtración por membrana para la detección de coliformes totales y Escherichia coli en muestras de agua para consumo humano analizadas en el laboratorio de salud pública del Huila*. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8227/tesis221.pdf?sequence=1>
- Panec, M., & Katz, D. S. (2016). *Plaque Assay Protocols*.
- Parada Piug, R. (n.d.). *Morfología colonial bacteriana: concepto, características y tipos*. Retrieved May 14, 2022, from <https://www.lifeder.com/morfologia-colonial-bacteriana/>
- Parra Huertas, R. R. (2010). *Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos*. 8.
- Pastrana-puche, Y. I., de Paula, C. D., & Gallo-García, L. A. (2017). Evaluación de sustancias antimicrobianas naturales en la conservación de avena Sinuana. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 321–334. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:634
- Paulová, L., Patáková, P., & Brányik, T. (2013). Advanced fermentation processes. In *Engineering Aspects of Food Biotechnology* (pp. 89–105). <https://doi.org/10.1201/b15426>
- Pedrique de Aulacio, M., de Vizcarrondo, M., & Gutiérrez de Gamboa, S. (2008). *Limpieza, desinfección, esterilización y antisepsia* (pp. 1–17). http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_14_Limpieza_desinfección.pdf
- Pérez-Ramírez, I., & Sánchez-Espinosa, K. (2019). Aspectos fisiológicos del género *Cladosporium* desde la perspectiva de sus atributos patogénicos, fitopatogénicos y biodeteriorantes. *Revista Cubana de*

Ciencias Biológicas, 7(1), 1–10.

- Pfenning, L. H., & Magalhães De Abreu, L. (2012). Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. In *Manual de Biología de Suelos Tropicales* (pp. 243–280). <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/667/cap8.pdf>
- Prácticas de Microbiología - Temperatura*. (n.d.). Retrieved May 14, 2022, from <https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/practicas-de-microbiologia/indice/influencia-del-medio-ambiente/temperatura>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., & Kim, S.-H. (2022). Recent biotechnological trends in lactic acid bacterial fermentation for food processing industries. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), 14–40. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00044-w>
- Ramadan, M. F., Ayoub, T. E. M., & Rohn, S. (2021). *Opuntia spp: Chemistry, Bioactivity and Industrial*. Springer.
- Ramírez Aristizábal, L. S. (n.d.). *Manual de Microbiología*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Ramírez Portillo, K. (2015). *Elaboración de Yogurt*.
- Rijal, N. (2022). *Bacteriological analysis of Water using Membrane Filtration Technique*. <https://microbeonline.com/analysis-of-water-membrane-filtration-technique/>
- Robertson, L. A. (2015). van Leeuwenhoek microscopes-Where are they now? *FEMS Microbiology Letters*, 362(9). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNV056>
- Rodríguez-Lázaro, D., Oniciuc, E. A., García, P. G., Gallego, D., Fernández-Natal, I., Dominguez-Gil, M., Eiros-Bouza, J. M., Wagner, M., Nicolau, A. I., & Hernández, M. (2017). Detection and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* in foods confiscated in EU borders. *Frontiers in Microbiology*, 8(1344), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01344>
- Rodríguez Saucedo, E. N. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153–170. <https://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>
- Rossi Devivo, L., & Pedrique de Aulacio, M. (2008). *Agentes Quimioterápicos Antimicrobianos* (pp. 2–27).
- Sahin, N. (2006). Biosafety, biodiversity and significance of Microbial Resource Centers (MRCs) in microbiology education. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(3), 219–224. <https://doi.org/10.1007/s11274-005-9024-1>
- Salas-Sosa, S. (n.d.). Determinación de coliformes totales y fecales por la técnica del Número Más Probable (NMP). In *Prácticas de análisis de laboratorio microbiológicos* (pp. 58–76). <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/MEMORIAS2004/CapituloIII/3PracticasdeanalisisdelaLaboratoriomiobiologicos2.pdf>
- Sam-Yellowe, T. Y. (2021). *Immunology: Overview and Laboratory Manual* (Springer, pp. 229–232). Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-64686-8>
- Sánchez Yáñez, J. M., Marquez-Benavides, L., Leal-Lozano, L., & Fernandez-Pavia, S. (2007). *Los hongos fundamentales en la productividad del suelo* (Issue April).

- Sanusi, M. S., Raji, A. O., & Ayilaran, E. O. (2022). Kinetic acidification and quality composition of yoghurt produced with soursop puree. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2229–2239. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01339-9>
- Sanz Cervera, S. A. (2011). *Prácticas de microbiología* (Universidad de la Rioja (Ed.)).
- Sattley, W. M., & Madigan, M. T. (2015). Microbiology. *ELS*, 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0000459.PUB2>
- Scharlab. (2022). *Agar Mueller Hinton*. <https://www.scharlab.com/productos-producto-catalogo-productos-detalle-articulo.php?c=39&sc=118&p=2725>
- Senawong, T., Khaopha, S., Misuna, S., Bunyatratchata, W., Sattayasai, N., Senawong, G., Surapaitoon, A., & Sripa, B. (2014). Histone Deacetylase Inhibitory Activity and Antiproliferative Activity of the Cultured Medium of *Aspergillus niger* strain TS1. *Chiang Mai Journal of Science*, 41(5.1), 981–991. https://www.researchgate.net/publication/272420075_Histone_Deacetylase_Inhibitory_Activity_and_Antiproliferative_Activity_of_the_Cultured_Medium_of_Aspergillus_niger_strain_TS1
- Sharma, A., Hazarika, N. ., Barua, P., Shivaprakash, M. ., & Chakrabarti, A. (2013). *Acremonium strictum* : Report of a Rare Emerging Agent of Cutaneous Hyalohyphomycosis with Review of Literatures. *Mycopathologia*, 176, 435–441. <https://doi.org/10.1007/s11046-013-9709-1>
- Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S. K., & Kulshrestha, S. (2020). *Fermentation Microbial Fermentation and Its Role in Quality Improvement of Fermented Foods*. 6. <https://doi.org/10.3390/fermentation6040106>
- Sierra-Castrillo, J., Gómez-Rave, L., Muñoz, A., Ramírez-Hoyos, F., Patiño-Rojas, I., Zapata-Baron, S., León-Rojas, D., & Bermúdez-Pirela, V. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos de *Persea americana* (Aguacate) variedad Choquette sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Kasmera*, 48(2), 2–8. <https://doi.org/10.5281/zenodo.4064181>
- Singh, S., Rudramurthy, S. M., Padhye, A. A., Hemashetter, B. M., Iyer, R., Hallur, V., Sharma, A., Agnihotri, S., Gupta, S., Ghosh, A., & Kaur, H. (2021). Clinical Spectrum , Molecular Characterization , Antifungal Susceptibility Testing of *Exophiala* spp . From India and Description of a Novel *Exophiala* Species , *E . arunalokei* sp . nov. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 11, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.686120>
- Tallent, S., Hait, J., Bennett, R. W., & Lancette, G. A. (2019). *Staphylococcus aureus*. In *Bacteriological Analytical Manual*. FDA. <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-12-staphylococcus-aureus>
- Traviezo Valles, L. E. (2020, August 1). Historia Breve del Microscópio. *Research Gate*, 103–109. https://www.researchgate.net/publication/349345401_Historia_Breve_del_Microscopio
- Vaclavik, V. A., & Christian, E. W. (2008). Essentials of food science. In *Choice Reviews Online* (Vol. 45, Issue 11). <https://doi.org/10.5860/choice.45-6154>
- Valenzuela, E., Díaz, P., Aranda, C., Martínez, O., & Godoy, R. (2014). Cultivo de cepas de levaduras de suelo trumao en «Vinaza». *Boletín Micológico. Micología Ambiental*, 29(2), 56–62. <https://doi.org/https://doi.org/10.22370/bolmicol.2014.29.2.867>

- Virtual Labs. (n.d.). *Understanding Water Activity*. <https://virtuallabs.nmsu.edu/wateractivity/>
- Virtual Labs. (2021). *Bacteria Sampling (Using Various Disposable Lab Equipments)*. National Institute of Food and Agriculture. <https://virtuallabs.nmsu.edu/equip.php>
- Visagie, C. M., Seifert, K. A., Houbraken, J., Samson, R. ., & Jacobs, K. (2016). A phylogenetic revision of *Penicillium* sect . *Exilicaulis* , including nine new species from fynbos in South Africa A phylogenetic revision of *Penicillium* sect . *Exilicaulis* , including nine new species from fynbos in South Africa. *IMA Fungus*, 7(1), 75–117. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2016.07.01.06>
- Washington State Department of Health. (2016). *Coliform Bacteria and Drinking Water* (Issue April). <https://doh.wa.gov/sites/default/files/legacy/Documents/Pubs//331-181.pdf>
- World Health Organization. (2020). *Food Safety*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

La Editorial de la Universidad
Tecnológica de Pereira tiene como
política la divulgación del saber
científico, técnico y humanístico para
fomentar la cultura escrita a través
de libros y revistas científicas
especializadas.

Las colecciones de este proyecto son:
Trabajos de Investigación, Ensayos,
Textos Académicos y Tesis Laureadas.

Este libro pertenece a la Colección
Textos Académicos.

En el momento donde se hace necesario migrar a la virtualidad, surge como una oportunidad de innovación en el laboratorio la creación de un manual no sólo de prácticas académicas, relacionadas con fundamentos generales de microbiología, sino una publicación que implementa metodologías para la solución de casos mediante softwares o simuladores virtuales, que complementan el aprendizaje basado en problemas a la vez que promueve el uso de una segunda lengua.

Cada capítulo está compuesto por la fundamentación teórica, el protocolo a seguir en el laboratorio, un resumen gráfico, preguntas relacionadas con la práctica y una actividad interactiva.