



UES

Universidad Estatal de Sonora
La Fuerza del Saber Estimulará mi Espíritu

MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO

Microbiología de los Alimentos

Laboratorio

Programa Académico
Plan de Estudios
Fecha de elaboración
Versión del Documento

Lic. en Nutrición Humana
2021
01/05/2025
2025



Dra. Martha Patricia Patiño Fierro
Rectora

Mtra. Ana Lisette Valenzuela Molina
**Encargada del Despacho de la Secretaría
General Académica**

Mtro. José Antonio Romero Montaña
Secretario General Administrativo

Lic. Jorge Omar Herrera Gutiérrez
**Encargado de Despacho de Secretario
General de Planeación**

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	4
IDENTIFICACIÓN	6
<i>Carga Horaria de la asignatura</i>	<i>6</i>
<i>Consignación del Documento</i>	<i>6</i>
MATRIZ DE CORRESPONDENCIA	7
NORMAS DE SEGURIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS	8
<i>Reglamento general del laboratorio</i>	<i>8</i>
<i>Reglamento de uniforme</i>	<i>8</i>
<i>Uso adecuado del equipo y materiales.....</i>	<i>9</i>
<i>Manejo y disposición de residuos peligrosos.....</i>	<i>9</i>
<i>Procedimientos en caso de emergencia</i>	<i>9</i>
RELACIÓN DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO POR ELEMENTO DE COMPETENCIA..	10
PRÁCTICAS.....	3
FUENTES DE INFORMACIÓN	56
NORMAS TÉCNICAS APLICABLES.....	58
ANEXOS	61

INTRODUCCIÓN

Como parte de las herramientas esenciales para la formación académica de los estudiantes de la Universidad Estatal de Sonora, se definen manuales de práctica de laboratorio como elemento en el cual se define la estructura normativa de cada práctica y/o laboratorio, además de representar una guía para la aplicación práctica del conocimiento y el desarrollo de las competencias clave en su área de estudio. Su diseño se encuentra alineado con el modelo educativo institucional, el cual privilegia el aprendizaje basado en competencias, el aprendizaje activo y la conexión con escenarios reales.

Con el propósito de fortalecer la autonomía de los estudiantes, su pensamiento crítico y sus habilidades para la resolución de problemas, las prácticas de laboratorio integran estrategias didácticas como el aprendizaje basado en proyectos, el trabajo colaborativo, la experimentación guiada y el uso de tecnologías educativas. De esta manera, se promueve un proceso de enseñanza-aprendizaje dinámico, en el que los estudiantes no solo adquieren conocimientos teóricos, sino que también desarrollan habilidades prácticas y reflexivas para su desempeño profesional.

La Microbiología de los Alimentos es el área de la Microbiología que trata de los procesos en los que los microorganismos influyen en las características de los productos de consumo alimenticio humano o animal, englobando aspectos de ecología microbiana y de biotecnología para la producción de alimentos.

Se pueden distinguir cuatro aspectos diferentes en la Microbiología de los Alimentos:

Los microorganismos como productores de alimentos.

La mayoría de los procesos de fabricación de alimentos en los que intervienen microorganismos se basan en la producción de procesos fermentativos, principalmente de fermentación láctica, de los materiales de partida. Los alimentos fermentados comprenden productos lácteos, cárnicos, vegetales fermentados, pan y similares y productos alcohólicos.

Los microorganismos como agentes de deterioro de alimentos.

Se considera alimento deteriorado aquel dañado por agentes microbianos, químicos o físicos de forma que es inaceptable para el consumo humano. El deterioro de alimentos es una causa de pérdidas económicas muy importante: aproximadamente el 20% de las frutas y verduras recolectadas se pierden por deterioro microbiano producido por alguna de las 250 enfermedades de mercado.

Los microorganismos como agentes patógenos transmitidos por alimentos

Ciertos microorganismos patógenos son potencialmente transmisibles a través de los alimentos. En estos casos, las patologías que se producen suelen ser de carácter gastrointestinal, aunque pueden dar lugar a cuadros más extendidos en el organismo e incluso, a septicemias.

Los tipos de microorganismos patógenos con importancia alimentaria

Comprenden bacterias, protozoos y virus, en el caso de las infecciones alimentarias, y bacterias y hongos (mohos) en el caso de las intoxicaciones. Los alimentos son la principal fuente de aporte de energía y nutrimentos para nuestro organismo y por consiguiente al ser consumidos, permite que cada una de las células que lo forman, puedan cumplir sus funciones correspondientes. Los microorganismos juegan un papel muy importante en este proceso, estableciendo interacciones biológicas, ya sea interviniendo en la elaboración de los propios alimentos, así como también, permitiendo o facilitando la absorción de algunos nutrimentos que no pueden empezar a ser metabolizados en nuestros intestinos. Desgraciadamente no todas las interacciones biológicas forjadas son benéficas para el hombre, existen microorganismos que deterioran a los alimentos o bien son patógenos para el ser humano. El papel del nutriólogo es manejar esta información, que le permitirá establecer un equilibrio en la dieta, con alimentos ricos en nutrimentos pero también microbiológicamente aceptables para consumo humano. Las prácticas del curso de Microbiología de los Alimentos están estructuradas de tal forma que el estudiante avance en su nivel de competencia manejando las Normas Oficiales Mexicanas vigentes y de esta manera relacionar la información contenida en ellas con el quehacer del Licenciado en Nutrición Humana.

- Competencias a desarrollar
 - **Competencias blandas:** Habilidades transversales que se refuerzan en las prácticas, como la comunicación, el trabajo en equipo, el uso de tecnologías, etc.
 - **Competencias disciplinares:** Conocimientos específicos del área del laboratorio, incluyendo fundamentos teóricos y habilidades técnicas.
 - **Competencias profesionales:** Aplicación de los conocimientos adquiridos en escenarios reales o simulados, en concordancia con el perfil de egreso del programa.

IDENTIFICACIÓN

Nombre de la Asignatura		Microbiología de los Alimentos	
Clave	051CP058	Créditos	6.56
Asignaturas Antecedentes	N/A	Plan de Estudios	2021

Área de Competencia	Competencia del curso
Insertar área de competencia a la que pertenece la asignatura	Insertar competencia del curso de acuerdo con lo señalado en la Secuencia Didáctica

Carga Horaria de la asignatura

Horas Supervisadas			Horas Independientes	Total de Horas
Aula	Laboratorio	Plataforma		
3	2	1		6

Consignación del Documento

Unidad Académica	Unidad Académica Navojoa
Fecha de elaboración	01/05/2025
Responsables del diseño	M.C.T.A. Karen Lillian Rodríguez Martínez / Dr. Santiago Valdez Hurtado
Validación	Coordinación de Procesos Educativos
Recepción	Coordinación de Procesos Educativos

MATRIZ DE CORRESPONDENCIA

Señalar la relación de cada práctica con las competencias del perfil de egreso

PRÁCTICA	PERFIL DE EGRESO
1. Uso y manejo del microscopio óptico compuesto	✓ Evaluar el estado de nutrición que permita emitir un diagnóstico nutricional-alimentario a nivel individual y comunitario, así como diseñar planes de alimentación y programas de intervención nutricional para brindar atención nutricional en diferentes etapas de la vida, estado fisiológico y condiciones de salud, tomando en cuenta la actividad física, disciplina deportiva realizada y estilos de vida. ✓ Diseñar programas de orientación alimentaria a individuos y población considerando aspectos individuales, socioculturales, económicos, disponibilidad de alimentos y otras características específicas de la región o comunidad, a fin de promover hábitos adecuados de alimentación que contribuyan a prevenir y tratar problemas de salud pública. ✓ Administrar las actividades inherentes a los servicios de alimentación en instituciones públicas o privadas, a fin de ofrecer a los comensales una alimentación y dieta correctas acorde sus necesidades y recursos, así como mantener o mejorar las cualidades nutricias, organolépticas y de inocuidad y calidad de los alimentos al incorporarse en los procesos de producción, transformación, desarrollo y comercialización de estos en la industria alimentaria. ✓ Desarrollar proyectos de investigación científica aplicados al análisis y la resolución de problemas de salud pública relacionados con la alimentación y la nutrición, basándose en la evidencia científica y el conocimiento teórico, epidemiológico y socioeconómico más recientes, actuando siempre con alto compromiso social y ética en su desempeño profesional.
2. Tinciones	
3. Preparación y esterilización de medios de cultivo	
4. Recuento de bacterias lácticas en placa	
5. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva en alimentos	
6. Recuento de mesófilos aerobios en un alimento cocido	
7. Análisis microbiológicos de superficies vivas, inertes y ambiente	
8. Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en moluscos bivalvos	
9. Aislamiento e identificación de salmonella spp. en aves y/o huevo	
10. Recuento de hongos en harinas de cereales y/o alimentos a base de cereales o harinas	
11. Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del número más probable de coliformes totales y fecales en productos cárnicos o marinos cocidos, lácteos o productos varios	
12. Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del número más probable de coliformes totales y fecales en agua y bebidas no alcohólicas para consumo humano.	

NORMAS DE SEGURIDAD Y BUENAS PRÁCTICAS

Reglamento general del laboratorio

Usar bata de laboratorio manga larga, abotonada, pantalón al tobillo, zapato cerrado, cabello recogido.

Tiempo máximo de retardo a la práctica de 10 minutos

Prohibido introducir alimentos, bebidas, gritar, correr, jugar y sentarse en las mesas de trabajo.

Prohibido el uso de celular o sistema de comunicación móvil.

Uso de equipo de protección persona (guantes de látex, lentes de protección sin color, mascarilla, etc.) durante la permanencia dentro del laboratorio, de acuerdo a la actividad a realizar.

Abstenerse de entrar y salir del laboratorio con los guantes puestos.

Lavarse las manos antes y después de trabajar en cada sesión.

Asegurarse de no presentar cortaduras, raspones u otras lastimaduras en la piel, en caso de que así sea cubrir la herida de la manera más conveniente para evitar cualquier tipo de contacto.

No distraer durante la manipulación de material y sustancias.

No hacer uso indebido de equipo sin autorización, así como sistemas de cómputo y transmisión de datos.

Reglamento de uniforme

I. De la filipina:

- a. Color Blanco
- b. Zipper en medio desde la parte inferior hasta cubrir el pecho entero
- c. Sin bordados adicionales
- d. No ajustada a la cintura en su totalidad, se deberá notar la holgura en la misma
- e. El largo de la filipina deberá llegar hasta la parte media del muslo. No se permitirán filipinas que lleguen a la altura de la cintura o antes de esta.
- f. Con cintillo en la parte posterior
- g. Deberá tener el logotipo institucional de UES bordado y no estampado (Es opcional que se borde el Nombre de la licenciatura o personalice con el nombre del alumno)
- h. Las mangas de la filipina deberán llegar al codo. No se permitirán filipinas que tengan mangas extremadamente cortas y dejen entrever los hombros.
- i. Deberá llevar bolsas frontales; una en cada lado de la costura de la filipina
- j. No se permitirán filipinas escotadas.

II. Del pantalón:

- a. Color beige “caqui” de vestir (preferentemente) o estilo dickies.
- b. No se permitirá el uso de pantalones demasiado holgados (estilo “cholo”)
- c. No se permitirá el uso de cadenas ligadas al pantalón y;

III. Del calzado:

- a. Color café (preferentemente) o negro.
- b. Calzado completamente cerrado de la parte frontal y superior
- c. Prohibido el uso de zapatillas, sandalias o cualesquier calzado que deje entrever el pie o partes del pie.
- d. Salvo en casos de incapacidad se analizará el posible uso de otro tipo de calzado.

IV. La adquisición del uniforme, será libre decisión del alumno; siempre y cuando cumpla lo establecido en el presente reglamento..

Uso adecuado del equipo y materiales

No hacer uso indebido de equipo sin autorización, así como sistemas de cómputo y transmisión de datos. Reportarlo con el responsable del laboratorio

Manejo y disposición de residuos peligrosos

No hacer uso indebido de equipo sin autorización, así como sistemas de cómputo y transmisión de datos. Reportarlo con el responsable del laboratorio

Procedimientos en caso de emergencia

No hacer uso indebido de equipo sin autorización, así como sistemas de cómputo y transmisión de datos. Reportarlo con el responsable del laboratorio

RELACIÓN DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO POR ELEMENTO DE COMPETENCIA

Elemento de Competencia al que pertenece la práctica	Indicar EC (I, II o III)
	Insertar redacción del EC correspondiente de acuerdo con lo señalado en la SD.

PRÁCTICA	NOMBRE	COMPETENCIA
1	Uso y manejo del microscopio óptico compuesto	EC 1. Reconocer los tipos de microorganismos patógenos que pueden presentarse en los alimentos, con un enfoque en la calidad y responsabilidad para evitar enfermedades en el ser humano en apego a normas nacionales e internacionales.
2	Tinciones	
3	Preparación y esterilización de medios de cultivo	
4	Recuento de bacterias lácticas en placa	
5	Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva en alimentos	Identificar las técnicas microbiológicas para la detección de microorganismos presentes en los alimentos, con el fin de implementarlas en el entorno laboral con un enfoque de calidad para el consumo humano de acuerdo con las normas nacionales e internacionales.
6	Recuento de mesófilos aerobios en un alimento cocido	
7	Análisis microbiológicos de superficies vivas, inertes y ambiente	
8	Aislamiento e identificación de Vibrio cholerae, V. parahaemolyticus y V. vulnificus en moluscos bivalvos	
9	Aislamiento e identificación de salmonella spp. en aves y/o huevo	Identificar la inocuidad e higiene alimentaria en el área de la nutrición con relación al manejo, preparación y envasado de alimentos de acuerdo con las normas vigentes, a fin de cumplir con una calidad adecuada para el consumo humano con un sentido de responsabilidad y ética profesional.
10	Recuento de hongos en harinas de cereales y/o alimentos a base de cereales o harinas	
11	11Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del número más probable de coliformes totales y fecales en productos cárnicos o marinos cocidos, lácteos o productos varios	
12	Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del número más probable de coliformes totales y fecales en agua y bebidas no alcohólicas para consumo humano.	



PRÁCTICAS

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Uso y manejo del microscopio óptico compuesto
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Emplear el microscopio óptico compuesto de campo claro en la observación de diferentes microorganismos, células y parásitos mediante el uso de preparaciones fijas y en fresco en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos.

FUNDAMENTO TEÓRICO
El microscopio es un instrumento fundamental en el estudio de la Microbiología que amplía las imágenes permitiendo el conocimiento detallado de estructuras y de organismos. Los microscopios son de dos tipos diferentes: el óptico y el electrónico, según sea el principio en el cual se basa la amplificación. En el microscopio óptico se obtiene la amplificación por medio de un sistema de lentes mientras que en el microscopio electrónico se usa un haz de electrones en lugar de ondas luminosas para obtener la imagen ampliada. Del microscopio óptico, el más sencillo es conocido como microscopio simple y consta de una sola lente convergente, también conocida como lupa, de capacidad amplificadora muy reducida. El aparato más utilizado es el microscopio compuesto o microscopio óptico de campo claro que supera extraordinariamente al anterior, ya que consta de dos sistemas de lentes, uno de ellos amplía la imagen del objeto observado, que es captada y nuevamente ampliada por el segundo sistema, consiguiéndose con esto un mayor poder de resolución.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS	
Por equipo: • Microscopio óptico de campo claro • Portaobjetos y cubreobjetos • Dos asas bacteriológicas • Un mechero Bunsen o lámpara de alcohol • Cultivos de microorganismos	• Agua destilada • Preparaciones permanentes de microorganismos y parásitos • Cinta para etiquetar y plumón • Bactericida o sanitizante • Papel o toallas desechables para secar

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA
Uso del microscopio: 1. Conectar el microscopio y encender el foco luminoso (ponerse de espaldas a cualquier fuente de luz potente para obtener mayor contraste y evitar reflejos). 2. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. 3. Colocar la preparación sobre la platina (sujetándola con las pinzas metálicas o con la mano cuidadosamente). 4. Comenzar la observación con el objetivo de 4X ó 10X si la preparación es de bacterias. 5. Para realizar el enfoque: 5.1. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando 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 preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos. 5.2. Separar lentamente el objetivo de la preparación con el tornillo macrométrico, observando a través de los oculares. Una vez que tenga una imagen, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino. (No. total de aumentos = No. de aumentos de los oculares x No. de aumentos del objetivo). 5.3. Cambiar de objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el tornillo micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se

perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 3. El objetivo de 40X enfoca a muy poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

- 5.4. Para el uso del objetivo de inmersión (100X), bajar totalmente la platina.
- 5.5. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
- 5.6. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio de éste y el de 40X.
- 5.7. Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
- 5.8. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
- 5.9. Observar directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
- 5.10. Enfocar cuidadosamente con el tornillo micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40X por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
- 5.11. Una vez colocado el aceite de inmersión sobre la preparación, no se debe utilizar de nuevo el objetivo 40X sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina y repetir la operación desde el paso 3.
- 5.12. Una vez finalizada la observación, bajar la platina y se colocar el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- 5.13. Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para las lentes. Comprobar también que el objetivo 40X está limpio.
6. Mantenimiento y precauciones:
 - 6.1. Al finalizar el trabajo, hay que regresar el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.
 - 6.2. Mantener el microscopio cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se usar, guardarlo en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
 - 6.3. Al transportar el microscopio, se colocará la base del microscopio sobre la palma de la mano izquierda y con la mano derecha se tomará firmemente del brazo del microscopio.
 - 6.4. No tocar las lentes con las manos. Limpiarlas muy suavemente con un papel de óptica.
 - 6.5. No dejar montado el portaobjetos sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
 - 6.6. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso, se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
 - 6.7. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
 - 6.8. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
 - 6.9. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
 - 6.10. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.

7. Observación de preparaciones en fresco:
 - 7.1. Flamear hasta el rojo vivo en el asa de inocular.
 - 7.2. Quitar el tapón de uno de los cultivos de microorganismos proporcionados y flamear el borde del tubo.
 - 7.3. Recoger una asada del cultivo y colocarla en el centro del portaobjeto limpio (en caso de que el cultivo sea sólido suspenderlo en una gota de agua destilada).
 - 7.4. Flamear de nuevo el borde del tubo y volver a taparlo.
 - 7.5. Esterilizar el asa de inocular.
 - 7.6. Colocar un cubreobjeto sobre la suspensión del cultivo.
 - 7.7. Observar la preparación empezando con el objetivo de menor aumento y después pasando a los otros, siguiendo las instrucciones antes mencionadas.
8. Observación de preparaciones fijas:
 - 8.1. Las preparaciones fijas se proporcionarán, no es necesario prepararlas. Estas preparaciones ya están listas para su visualización.
 - 8.2. Observar las preparaciones empezando con el objetivo de menor aumento y después pasando a los otros, siguiendo las instrucciones antes mencionadas.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Haga un esquema de un microscopio compuesto, dibujando cada una de sus partes e indicando su función.
2. Explique el sistema óptico de un microscopio compuesto.
3. ¿Qué amplificaciones se obtienen con un microscopio compuesto?
4. ¿Cuál es la función del aceite de inmersión en la observación microscópica?
5. ¿Qué función desempeñan el condensador y el diafragma?
6. ¿Qué diferencia hay entre una preparación en fresco y una en frote?
7. Mencione las principales características de un microscopio electrónico, de fluorescencia y de campo oscuro.
8. Mencione las características morfológicas de bacterias, levaduras, hongos, algas microscópicas y protozoarios.
9. Mencione las características morfológicas de los siguientes parásitos: trematodos, cestodos, nematodos.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#!/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Tinciones
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Realizar tinciones simples y diferenciales de microorganismos y células para observarlos en el microscopio óptico compuesto, haciendo uso de los colorantes y las técnicas utilizadas en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos

FUNDAMENTO TEÓRICO

El procedimiento para estudiar la morfología de los microorganismos, consiste en el examen de un *frotis* al microscopio, que previa fijación a un portaobjetos, se tiñe con algún colorante y se examina microscópicamente con el objetivo de inmersión, que es el de mayor poder de resolución. Para obtener un buen *frotis*, debe "extenderse" el material, con objeto de formar una película delgada, y obtener así una sola capa de bacterias perfectamente separadas sobre el portaobjetos. Con esta preparación previa pueden observarse perfectamente células aisladas, de otra forma, los microorganismos se aglomeran en masas sólidas impenetrables a la luz. Es necesaria la tinción, ya que la diminuta célula bacteriana en su estado natural permitirá el paso de cantidad excesiva de luz y no se puede tener una buena observación. Las células toman la tinción total o parcialmente de acuerdo con una relación química entre alguna sustancia celular y el colorante, o bien, su superficie queda teñida por un mecanismo de atracción. En otras palabras, las propiedades de tinción de una célula dependen de su composición química y las diferencias en sus reacciones de coloración, constituyen índices importantes para distinguir unas bacterias de otras. Existen tinciones simples y diferenciales. La tinción Gram es una de las tinciones diferenciales más importantes que separa a las bacterias en Gram (+) y Gram (-), lo que va a depender de la capacidad de retención de la membrana celular de los colorantes cristal violeta o safranina.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS

Por equipo: • Microscopio óptico de campo claro con objetivo de 100X • Portaobjetos y cubreobjetos • Dos asas bacteriológicas • Un mechero Bunsen • Cultivos de microorganismos • Agua destilada • Aceite de inmersión	• Azul de metileno o azul de algodón • Safranina, Cristal violeta o violeta de genciana • Lugol • Alcohol-cetona • Cinta para etiquetar, lápiz y/o plumón • Bactericida o sanitizante • Papel o toallas desechables para secar
---	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

Técnica para hacer un frotis fijo: 1. Anotar el número correspondiente con lápiz graso sobre el portaobjetos de la muestra por observar, indicando con más detalle la descripción en su bitácora. 2. Tomar y extender en un portaobjetos con el asa una gota del producto que se va a examinar si éste es fluido. Si es de consistencia más sólida, se diluye una pequeña porción del mismo en una gota de agua destilada colocada previamente sobre el portaobjetos con el asa. 3. Las extensiones deben ser suficientemente finas para que los microorganismos aparezcan aislados al examen microscópico y lo suficientemente gruesa para ser localizado y hacer el enfoque con facilidad. 4. Secar la preparación al aire, calentar muy suavemente en la corriente del aire caliente del

mechero para acelerar la desecación.

5. Fijar por medio del calor. Pasar el portaobjetos de dos a tres veces con cierta lentitud sobre la llama del mechero hasta una temperatura soportable al aplicarlo sobre el dorso de la mano. Se puede provocar alteraciones en la morfología de las bacterias si el calentamiento es excesivo.
6. Dejar enfriar y hacer la tinción que corresponda.

Tinción simple:

7. La preparación seca y fijada se tiñe cubriéndola durante unos minutos (1 a 3) con una solución colorante (azul de metileno, safranina o azul de algodón –este último tinte preferentemente para la observación de cultivos de hongos-).
8. Lavar con agua de la llave o destilada.
9. Secar al aire.
10. Observar con el objetivo de inmersión.

Tinción de Gram:

11. Preparar un frotis, dejar secar al aire y fijar a la flama.
12. Cubra la preparación con la solución de cristal violeta o violeta de genciana, dejar actuar el colorante durante 1 minuto.
13. Escurra el colorante y lave con agua.
14. Cubra la preparación con lugol, dejar actuar este agente durante 15 segundos.
15. Escurra el lugol, lave con agua.
16. Cubra la preparación con alcohol-cetona hasta que la preparación deje de perder color (por 30 segundos)
17. Lave abundantemente con agua.
18. Cubra la preparación con safranina por 1 minuto.
19. Lave con agua.
20. Secar la preparación al aire (no tallar).
21. Examinar al microscopio, observado en el color de cada preparación.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Definir que es un colorante.
2. Definir la función del grupo cromóforo y auxocromo de un colorante.
3. Explique las propiedades de los colorantes básicos.
4. Explique las propiedades de los colorantes ácidos.
5. Investigue las fórmulas químicas y propiedades del azul de metileno, safranina y cristal violeta.
6. ¿Qué es un mordiente?, de 3 ejemplos.
7. ¿Por qué es importante realizar un buen frotis bacteriano en la observación microscópica?
8. Explique las diferencias entre una tinción simple y una diferencial.

9. ¿Qué otro tipo de tinciones puede mencionar?
10. ¿Cuáles son algunas limitaciones de las tinciones?
11. Explique el fundamento de la tinción de Gram.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmninnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepacticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Preparación y esterilización de medios de cultivo
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Aplicar los fundamentos sobre requerimientos nutricionales de los microorganismos y de esterilización, en la preparación de medios de cultivo que permitan el crecimiento microbiano, mediante cálculos y el uso de autoclave en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos

FUNDAMENTO TEÓRICO

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el medio de cultivo y el crecimiento de los microorganismos es llamado cultivo. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. Todas las células requieren para su crecimiento normal de: agua, una fuente de carbono, de nitrógeno, azufre, fósforo, energía y sales minerales en pequeñas cantidades como: sodio, potasio, calcio, magnesio. Tanto los microorganismos como las plantas requieren que estos nutrientes estén en solución para poderlos asimilar. Por ello se debe seleccionar el medio de cultivo de tal manera que contenga los elementos necesarios para el adecuado crecimiento de la cepa que se desea. También, para que los microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial se debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. La mayoría de los microorganismos pueden crecer a una temperatura de 25-30°C o más, aunque algunas cepas se alejan mucho de este rango. El rango normal del pH tolerado es de 5 a 8; para controlar el pH se usan generalmente medios de cultivo regulados o según el caso, puede ser utilizado HCl o NaOH para ajustar el pH. Existen algunos materiales de uso muy común en los medios de cultivo como son las peptonas, el extracto de carne, extracto de levadura y el agar; estos son nutrientes para la célula y hacen posible el desarrollo de una gran cantidad de microorganismos. La mayoría de las bacterias patógenas requieren nutrientes complejos similares en composición a los líquidos orgánicos del cuerpo humano, por eso, la base de muchos medios de cultivo es una infusión de extractos de carne y peptona. En diferentes medios se encuentran numerosos materiales de enriquecimiento como carbohidratos, suero, sangre completa, bilis, etc. Los carbohidratos se adicionan por dos motivos fundamentales: para incrementar el valor nutritivo del medio y para detectar reacciones de fermentación de los microorganismos que ayuden a identificarlos. El suero y la sangre completa se añaden para promover el crecimiento de los microorganismos menos resistentes. El agar es un elemento solidificante muy empleado para la preparación de medios de cultivo sólidos. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40°C. Con mínimas excepciones no tiene efecto sobre el crecimiento de las bacterias y no es atacado por aquellas que crecen en él. La gelatina es otro agente solidificante pero se emplea mucho menos ya que bastantes bacterias provocan su licuación. Los medios de cultivo se han clasificado de acuerdo con su composición química y el uso a que se destinan en: enriquecidos, de enriquecimiento, selectivos y diferenciales, principalmente. O bien considerando su consistencia se clasifican en: sólidos, semisólidos y líquidos. El caldo nutritivo y el agar nutritivo son ejemplos de medios de cultivo líquido y sólido respectivamente, que permiten el desarrollo de muchos tipos de microorganismos heterótrofos.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS	
Por equipo:	- Medios de cultivo - Guantes de asbesto - Placa de calentamiento (o en su defecto)
- Mecheros Meker-Fisher - Matraces Erlenmeyer de 500 mL	

• Probetas de 100 mL • Bandeja de pesado o aluminio • Mecheros Meker-Fisher • Matraces Erlenmeyer de 500 mL • Probetas de 100 mL • Bandeja de pesado o aluminio	trípé y tela de asbesto) • Autoclave • Potenciómetro • HCl 1 N, NaOH 5N, u otra solución para ajustar pH, en caso de ser necesario
--	---

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

El instructor indicará los medios de cultivo que se prepararán y esterilizarán en esta sesión. Apoyarse de la NOM-065-SSA1-1993 para la realización de esta práctica.

Preparación de medios de cultivo sólidos y caldos:

1. Los medios de cultivo comercialmente disponibles se presentan como polvos deshidratados, estériles y deben ser conservados en sus frascos originales con la tapa fuertemente ajustada. Antes de preparar cualquier medio se debe leer cuidadosamente el rótulo del envase y fijarse la fecha de vencimiento. Anotar en la bitácora la fecha de vencimiento de cada agar a utilizar.
2. Los medios de cultivo se prepararán empleando material de vidrio limpio y seco.
3. Calcular la cantidad de polvo requerido, de acuerdo a las instrucciones del rótulo del envase y el volumen total de medio que se desee preparar.
4. Pesar la cantidad proporcional sobre papel de aluminio o en bandejas de plástico para pesado y se vuelca en el recipiente en el que será preparado.
5. Medir el volumen de líquido (agua destilada) en la que se disolverá el polvo en una probeta limpia y con graduación. Agregar el agua destilada en el recipiente que contiene el medio y se agita vigorosamente hasta obtener una suspensión o solución homogénea.
6. Los caldos suelen dar soluciones transparentes que no necesitan calentamiento ni ninguna otra manipulación antes de ser llevados al autoclave. Las soluciones con agar sin embargo, requerirán calentarse casi hasta ebullición con agitación constante y a fuego suave (o a Baño María o microondas) para lograr su solubilización completa. Se debe observar con cuidado la solución durante el calentamiento ya que una vez que aparecieron las primeras burbujas tiende a desbordar por ebullición.
7. Ajustar el pH al medio preparado si es necesario, utilizando para ello el potenciómetro y tomando como referencia el pH indicado en la etiqueta del recipiente original. A los agares preparados se les debe de enfriar previamente a 55° C para ajustar su pH.
8. Si se esterilizará el medio de cultivo en matraz, tapar el recipiente con algodón de tal manera que quede firme, cubrirlo con papel aluminio y etiquetar antes de esterilizar.
9. Si se utilizarán tubos para contener estas soluciones, dosificar la cantidad necesaria para cada tubo. Deben contener sólo dos terceras partes de su volumen total ocupado por el medio para evitar desbordes. Tapar y etiquetar.
10. Los medios de cultivo deben esterilizarse en autoclave a 121 °C, o sea, 15 libras de presión por pulgada cuadrada por 15 minutos, o la temperatura indicada para el medio. Siempre leer las instrucciones del fabricante, pues hay medios de cultivo selectivos y diferenciales que no se esterilizan, pues contienen nutrimentos o sustancias termolábiles.
11. Una vez retirados del autoclave, los medios deben dejarse enfriar y conservarse así refrigerados.

Recomendaciones:

12. Leer cuidadosamente las instrucciones del envase. Controlar la fecha de vencimiento.
13. No introducir ningún tipo de herramientas que puedan contaminar el medio preparado (espátulas sucias, varillas, cucharas, etc.). Para homogeneizar agitar tomando del cuello del Erlenmeyer, evitar las varillas de vidrio.

14. Los tubos con tapón de rosca no deben ajustarse completamente cuando se introducen en autoclave para su esterilización, la tapa debe quedar con media rosca. Una vez retirados del autoclave, sí deberán ajustarse para minimizar los riesgos de contaminación

Vaciado en placas:

15. Si los agares preparados van a ser utilizados en el momento sacarlos del autoclave, enfriar a una temperatura aproximada de 45-55°C (temperatura soportable al dorso de la mano) antes de verterlos sobre las placas, para ello se pueden colocar en un baño de agua para que se enfríen. Si sobre la superficie de una placa recién preparada aparecieran burbujas, éstas pueden eliminarse al pasar rápidamente la llama del mechero de Fisher sobre la superficie del agar.
16. Vaciar en placas hasta la altura indicada en las mismas (aproximadamente de 15 a 20 mL), tapar y dejar solidificar con la tapa hacia arriba.

Medio en tubo inclinado:

17. Los medios preparados se colocan en los tubos antes de esterilizar, en posición vertical en un recipiente o gradilla y se esterilizan en autoclave.
18. Después de la esterilización, colocarlos en posición inclinada levantando la parte donde se encuentra el tapón, dejando el botón lo suficientemente largo. Dejar solidificar.

Medios de cultivo para picadura:

19. Seguir el mismo procedimiento anterior, sólo que en lugar de inclinar los tubos, dejarlos en posición vertical en un recipiente o gradilla hasta su solidificación.

Medios de cultivo líquidos:

20. Seguir las instrucciones del medio deshidratado y después de esterilizar, dejar los tubos en posición vertical.

Procedimiento simplificado para el uso del autoclave:

21. Comprobar el nivel del agua.
22. Colocar en su interior el material a esterilizar.
23. Atornillar la tapa, apretar los tornillos por parejas diametralmente opuestas de forma que la tapa encaje perfectamente.
24. Abrir la válvula de vapor y encender la fuente de calor.
25. Una vez que salga el vapor por la válvula, esperar al menos 5 minutos para expulsar todo el aire y cerrar la válvula.
26. Vigilar el manómetro y la válvula de seguridad. Cuando se alcanza la presión requerida, disminuir la intensidad de calor.
27. Dejar que transcurra el tiempo necesario. Apagar la fuente de calor.
28. Esperar que el manómetro descienda a cero, abrir la llave de vapor.
29. Esperar 5 minutos y abrir la tapa.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Explique concretamente a qué se llama medio de cultivo.
2. Diga a qué se llama medio químicamente definido y a qué medio químicamente indefinido y las ventajas y desventajas de su utilización.
3. Cite algunas propiedades del agar-agar y la gelatina.
4. Indique un método para ajustar el pH de un medio de cultivo.
5. Indique las propiedades químicas de las peptonas, extracto de carne, extracto de levadura.
6. ¿Cuáles son los ingredientes del Agar nutritivo y qué tipo de nutrientes proporcionan para el desarrollo de los microorganismos?
7. Indique las diferencias entre un medio de cultivo enriquecido, selectivo, diferencial y para pruebas bioquímicas.
8. ¿Qué significa esterilización y en qué dispositivo se esterilizan los medios de cultivo?
9. Definir qué es el punto térmico mortal.
10. ¿Qué precauciones se deben considerar en la preparación y esterilización de los medios de cultivo?
11. ¿Cuál es el punto crítico para preparar un medio de cultivo sólido?

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE

Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/ReportedepRACTICadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de bacterias lácticas en placa
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Realizar la cuantificación e identificación de bacterias lácticas de un alimento mediante ensayos microbiológicos, cumpliendo las especificaciones de la normatividad para la comprensión del papel de estas bacterias en la elaboración de alimentos y en la salud del ser humano

FUNDAMENTO TEÓRICO
Existen un gran número de microorganismos que desde la antigüedad han servido para elaborar diversos productos alimenticios como las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas, son un grupo de bacterias de diferentes géneros, ampliamente distribuidas en la naturaleza y que se han utilizado principalmente para la producción de lácteos. Estos microorganismos fermentan la lactosa y por efecto de la acidez producida, la leche puede llegar a coagular gracias a la coalescencia de las caseínas al alcanzarse el pH isoelectrónico, lo cual es deseable en la elaboración de yogurt y quesos. En la elaboración de crema y mantequilla una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumentar el rendimiento. Algunas especies producen polisacáridos (gomas, mucina), que aumentan la viscosidad de la leche cambiando su textura (por ejemplo, las cepas <i>Streptococcus thermophilus</i>, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> y <i>Leuconostoc cremoris</i>). Aparte de bajar el pH en los derivados lácteos, las BAL aportan sabor y aroma, ya que como parte de su metabolismo fermentativo se da la producción de acetaldehído, diacetilo, acetoina, acetona, lactonas, ácidos volátiles, alcohol y gas. El diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla, la acetoina lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados. Además estos microorganismos producen enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas, lo cual afecta notablemente las características organolépticas de los mismos. Es importante también señalar, que como consecuencia del crecimiento de estas bacterias en los alimentos, se ejerce un efecto biopreservador manifestado en la prolongación de la vida útil de los mismos. Este efecto se lleva a cabo por varios mecanismos: a) ciertas especies (<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>, <i>Enterococcus</i>) producen bacteriocinas las cuales son proteínas que se comportan como antibióticos y que inhiben el crecimiento de bacterias relacionadas con estas; b) con la producción de ácido y descenso del pH se logra la inhibición de otras especies bacterianas y la conservación de los alimentos; c) el efecto biopreservador también se cumple gracias a la competencia por nutrientes que se da entre las diversas especies bacterianas. Los alimentos que han sido elaborados gracias a las BAL, aportan beneficios a la salud de los consumidores, el cual se ha descrito como efecto probiótico. Este puede manifestarse de manera específica en la prevención y reducción de los síntomas en los cuadros diarreicos, estreñimiento y además se le han atribuido efecto preventivo de tumores, anticolesterolémico y modulador del sistema inmunológico. Debido a que estos beneficios son consecuencia de ingerir los microorganismos fermentadores responsables, un producto no se puede vender como alimento probiótico o lácteo fermentado si no cumple con un mínimo de bacterias viables en cierta cantidad de muestra.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS
Por grupo (primera sesión): - Balanza con sensibilidad de 0,1 g - Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 30 ± 2 °C - Cinta para etiquetar y plumón

Bactericida o sanitizante
Papel o toallas desechables para secar
Cofias, guantes, cubrebocas
Aluminio o papel estraza
Por grupo (24 h):
Cuenta colonias Quebec o equivalente
Registrador mecánico o electrónico
Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 30 ± 2 °C
Aluminio o papel estraza
Cinta para etiquetar y plumón

Por grupo (48 h):
Cuenta colonias Quebec o equivalente
Registrador mecánico o electrónico
Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 30 ± 2 °C
Aluminio o papel estraza
Cinta para etiquetar y plumón
Aceite de inmersión
Colorantes: safranina, cristal violeta o violeta de genciana.
Lugol
Alcohol cetona
Paralelas
Bactericida o sanitizante
Papel o toallas desechables para secar
Tiras para prueba de oxidasa
Asa de inoculación
Mechero
Portaobjetos
Peróxido de hidrógeno al 30%
Agua destilada
Por equipo (48 h):
Microscopio óptico de campo claro con objetivo de 100x
Cinco Portaobjetos
Cinco Cubreobjetos
Dos asas bacteriológicas
Dos mecheros Bunsen
Una piseta con agua destilada

Por equipo (primera sesión):

- Una muestra de alimento para analizar, puede ser queso fresco o yogur a granel
- Seis cajas Petri con agar MRS (Man, Rogosa, Sharp) solidificadas, que hayan pasado prueba de esterilidad (incubación a 30 ± 2 °C por 48 h). (Para prepararlas con anterioridad, se requiere 1 matraz con 120 mL de agar MRS estériles fundidos y 6 cajas Petri estériles)

- Una gradilla
- Cinco pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles
- Una pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril
- Una pipeta de 10 mL con tapón de algodón estéril
- Una vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril autoadherible para homogeneizar

• Cinco varillas de vidrio acodadas o espátulas de Drigalsky de vidrio o de propileno estériles • Una botella de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Cuatro tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril	• Una espátula • Cuatro mecheros Meker-Fisher, o en su defecto Bunsen • Un auxiliador de pipeteo o perilla
--	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

La preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994

Preparación de dilución primaria

1. Preparación de dilución primaria a partir de muestras líquidas: Agitar la muestra vigorosamente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos. Tomar 10 mL de la muestra y diluir en 90 mL del diluyente 10^{-1} (solución buffer de fosfatos). El diluyente debe encontrarse a una temperatura similar a ésta; evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente
2. Preparación de dilución primaria a partir de muestras sólidas o semisólidas: Tomar la muestra del alimento por analizar y licuar en licuadora de 1 a 2 minutos hasta homogeneizar, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos. Pesar en condiciones asépticas 10 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra; evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

3. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
4. Permitir que las partículas grandes se sedimenten y tomar de las capas superiores de la suspensión 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10^{-2} .
5. Agitar la dilución 10^{-2} manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar con otra pipeta 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10^{-3} . Repetir este paso hasta realizar diluciones a 10^{-5} .

Realizar la inoculación por la técnica de extensión en superficie:

6. De la dilución 10^{-1} tomar 0.1 mL bajo condiciones asépticas e inocular en una caja Petri con agar MRS solidificado.
7. Con una varilla de vidrio acodada esterilizada a la flama o espátula de Drigalsky, distribuir bien el inóculo en toda la superficie del agar. Incluir un testigo sin inóculo.
8. Repetir la inoculación del resto de las diluciones (10^{-2} a 10^{-5}) utilizando pipetas distintas para cada una. Distribuir el inóculo con varillas de vidrio diferentes para cada una de las diluciones.
9. Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.
10. Invertir las placas e incubar de 24 a 48 h a 35 ± 2 °C

Recuento de colonias:

11. A las 24 horas, contar las colonias presuntivas: cremosas amarillentas o grisáceas, redondas y de aproximadamente 1 mm de diámetro.
12. Incubar las placas 24 horas más e incluir en el cómputo las colonias nuevas que reúnan las características ya señaladas (conteo a las 48 h).

13. Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas. De ellas, seleccionar 5 colonias y hacerles tinción de Gram (+), prueba de catalasa (-) y oxidasa (-)
14. Calcular el resultado en base al total de colonias presuntivas contadas en las placas y de las colonias confirmadas (por tinción, pruebas catalasa y oxidasa) y multiplicando por la inversa de la dilución de la placa seleccionada.
15. Reportar el resultado como UFC/g ó mL de bacterias lácticas en alimento, en agar MRS incubadas 48 h a 35 ± 2 °C.

Técnicas de confirmación de bacterias lácticas:

16. Tinción Gram: Preparar el frotis y realizar la coloración primaria, la fijación con el mordente, la decoloración y la aplicación del colorante de contraste. Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.
17. Prueba de la catalasa: Recoger con un asa de inoculación una porción de la colonia de un cultivo puro y colocar sobre un portaobjetos, agregar una gota de H₂O₂ al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas tomando lo anterior como prueba positiva.
18. Prueba de la oxidasa: Utilizar una placa o tira con reactivo para la prueba de la oxidasa (clorhidrato u oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%), colocar una porción de la colonia en la placa y observar el cambio de color los primeros 20 segundos. La prueba positiva da una coloración púrpura.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Defina en base a bibliografía fidedigna qué son las bacterias ácido lácticas (BAL).
2. Mencione el nombre de al menos cinco géneros de bacterias que se consideren BAL.
3. ¿Qué tipo de alimentos se elaboran gracias a la fermentación realizada por estas bacterias? Mencione ejemplos.
4. ¿Cuáles son los beneficios de las BAL en la industria alimentaria y para el organismo humano?
5. Investigue qué otro tipo de microorganismos beneficiosos se emplean en la producción de alimentos:

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmninnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva en alimentos
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Realizar la cuantificación, identificación, naturaleza y características del patógeno de <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva en alimentos entendiendo sus implicaciones en la salud del ser humano mediante ensayos microbiológicos y cumplimiento de las especificaciones de la normatividad

FUNDAMENTO TEÓRICO
Los estafilococos, junto con los estreptococos, son de los cocos Gram positivos de mayor importancia médica y sanitaria. Las infecciones e intoxicaciones estafilocócicas pueden ser desde triviales a letales. En la naturaleza, los estafilococos se encuentran por todas partes y algunas especies forman parte de la microbiota humana. Los estafilococos son microorganismos Gram positivos redondeados que suelen presentarse en racimos, anaerobios facultativos y producen catalasa, característica que los diferencia de los estreptococos, y secretan coagulasa. Requieren de diversos aminoácidos y otros factores de crecimiento y normalmente se cultivan en medios enriquecidos. Específicamente, <i>Staphylococcus aureus</i>, es responsable de muchas infecciones y tiene también importancia como causante de intoxicaciones alimentarias y del síndrome de shock tóxico. Muchos individuos sanos suelen llevar <i>Staphylococcus aureus</i> en la piel y las membranas mucosas; los portadores son una fuente de infección para ellos mismos y para los demás por contacto directo con vehículos de contagio (como picaportes, utensilios, etc.) y también son una fuente de contaminación de los alimentos. Una vez contaminado un alimento, <i>Staphylococcus aureus</i> coagulasa positiva puede reproducirse en él y producir la toxina estafilocócica, la cual se acumulará en el producto alimenticio y será causa de intoxicación alimentaria a quien lo consuma. El agar Baird-Parker es un medio de alta especificidad diagnóstica para el aislamiento y recuento de estafilococos coagulasa positiva en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. En el medio de cultivo preparado y completo, la peptona y el extracto de carne constituyen la fuente de carbono y nitrógeno, el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B, la glicina y el piruvato estimulan el crecimiento de los estafilococos. Este medio de cultivo es selectivo y diferencial debido al telurito de potasio y al cloruro de litio, los cuales inhiben el desarrollo de la flora acompañante. La yema de huevo adicionada, permite demostrar la actividad lecitinásica. Los estafilococos coagulasa positiva reducen el telurito a telurio y originan colonias de color grisáceo-negro, y dan reacción sobre la yema de huevo produciendo alrededor de la colonia una zona opaca que a menudo tiene una zona clara más externa. Se pueden encontrar cepas no lipolíticas, que presentan igual características de colonias pero sin la zona opaca y clara. Una vez cuantificadas las colonias sospechosas en este medio, se debe confirmar la presencia de <i>Staphylococcus aureus</i> mediante pruebas bioquímicas.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS
Por grupo (primera sesión): - Balanza con sensibilidad de 0.1 g - Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C - Cinta para etiquetar y plumón - Bactericida o sanitizante - Papel o toallas desechables para secar - Cofias, guantes, cubrebocas

Aluminio o papel estraza	
Para preparación del medio de cultivo: • Agar Baird Parker • 1 varilla de vidrio • 2 probetas de 100 mL • 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL o 500 mL • Agua destilada • Perlas de vidrio • Cajas petri estériles • Balanza con sensibilidad de 0,1 g • Bandeja de pesado o aluminio • Espátula	• 3 o 4 huevos frescos • Vaso de precipitados de 250 mL • Tintura de yodo (solución alcohólica al 2%). • Cinta para etiquetar y plumón • Bactericida o sanitizante • Papel o toallas desechables para secar • Mechero Meker-Fisher • Autoclave • Cloruro de sodio (NaCl) • Telurito de potasio
Por equipo (primera sesión): • Una muestra de alimento para analizar. • Seis cajas Petri estériles con agar Baird Parker solidificadas, que hayan pasado prueba de esterilidad (incubación a 35 ± 2 °C por 48 h). (Para prepararlas con anterioridad, se requiere 1 matraz con 120 mL de agar estériles fundidos y 6 cajas Petri estériles) • Cinco varillas de vidrio acodadas o espátulas de Drigalsky de vidrio o de propileno estériles • Una botella de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Cuatro tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Una gradilla • Cinco pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • Una pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril • Una pipeta de 10 mL con tapón de algodón estéril • Una vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril autoadherible para homogeneizar • Una espátula • Cuatro mecheros Meker-Fisher, o en su defecto Bunsen • auxiliador de pipeteo o perilla	Por grupo (24 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar y plumón Por grupo (48 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar y plumón • Aceite de inmersión • Colorantes: safranina, cristal violeta o violeta de genciana. • Lugol • Alcohol cetona • Paralelas • Bactericida o sanitizante • Papel o toallas desechables para secar • Tiras para prueba de oxidasa • Asa de inoculación • Mechero • Portaobjetos • Peróxido de hidrógeno al 30% • Agua destilada • Incubadora o baño de agua a 35 ± 2 °C.
Por equipo (48 h): • Microscopio óptico de campo claro con objetivo de 100x	

- Cinco Portaobjetos
- Cinco Cubreobjetos
- Dos asas bacteriológicas
- Dos mecheros Bunsen
- Una piseta con agua destilada
- Tubos con caldo infusión cerebro corazón
- Plasma de conejo

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

Preparación de medios y reactivos

1. Preparación del Medio base de Agar Baird Parker: Agregar lo correspondiente para 95 mL de agua destilada estéril, según lo indicado por las instrucciones del fabricante del agar base Baird Parker. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Dejar enfriar hasta 45°C.
2. Preparación de solución de telurito de potasio al 1%: Disolver 1 g de telurito de potasio en agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. La solución puede ser almacenada por varios meses a temperatura de 0 a 5 °C.
3. Preparación de la solución de cloruro de sodio al 0.85%: Agregar 0.85 gramos de NaCl en 100 mL de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos. Utilizarlo para agregar a yemas de huevo, completando 90 mL para formar emulsión.
4. Preparación de la emulsión de yema de huevo: Lavar con agua y jabón 3 ó 4 huevos frescos y limpiarlos con una solución de tintura de yodo (solución alcohólica al 2%). Enjuagar con el agua estéril y secar con gasa estéril. En condiciones asépticas, abrir los huevos y vaciarlos en un separador de claras estéril, o separar las claras con varilla de vidrio estéril. Transferir las yemas a una probeta estéril, hasta un volumen de 60 mL y completar a 90 mL con solución salina isotónica (solución de cloruro de sodio al 0.85%). Verter a un matraz Erlenmeyer con perlas de vidrio estéril y agitar fuertemente para formar la emulsión.
5. Preparación del Agar Baird Parker (100 mL): Cuando los 95 mL del medio base esté a 45°C después de esterilizar, agregar 5 mL de la emulsión de yema de huevo y 1 mL de la solución de telurito de potasio al 1% estéril. Mezclar y vaciar de 15 a 20 mL de medio completo en cajas petri previamente esterilizadas. Enfriar y dejar solidificar. Las placas pueden almacenarse por 48 h a una temperatura de 0 a 5°C.

Muestreo, transporte y preparación de diluciones:

6. El muestreo y transporte del alimento se realizará en base a la NOM-109-SSA1-1994 y la preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994.

Preparación de dilución primaria:

7. Colocar la muestra del alimento por analizar en un vaso de licuadora estéril. Operar de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo el alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos. En condiciones asépticas pesar 10 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra, para preparar la dilución 10-1. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

8. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
9. Permitir que las partículas grandes se sedimenten, tomar de las capas superiores de la suspensión 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-2.

10. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar con otra pipeta 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-3. Repetir este paso hasta preparar la dilución 10-5

Realizar la inoculación por la técnica de extensión en superficie:

11. Para el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva se empleará el método de extensión en superficie, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994 y NOM-210-SSA1-2014.
12. De la dilución 10-1 tomar 0.1 mL bajo condiciones asépticas e inocular en una caja Petri con agar Baird Parker solidificado.
13. Con una varilla de vidrio acodada esterilizada a la flama o espátula de Drigalsky, distribuir bien el inóculo en toda la superficie del agar. Incluir un testigo sin inóculo.
14. Repetir la inoculación del resto de las diluciones (10-2 a 10-5) utilizando pipetas distintas para cada una. Distribuir el inóculo con varillas de vidrio diferentes para cada una de las diluciones.
15. Mantener las placas en su posición hasta que el inóculo sea absorbido por el agar.
16. Invertir las placas e incubar de 24 a 48 h a 35 ± 2 °C.

Recuento de colonias:

17. A las 24 horas, seleccionar las placas que muestren de 20 a 200 colonias típicas (color grisáceo-negro con textura cremosa, algunas rodeadas de un halo claro).
18. Incubar las placas 24 horas más e incluir en el cómputo las colonias nuevas que reúnan las características ya señaladas (conteo a las 48 h).
19. Seleccionar la caja que contenga entre 50-150 colonias típicas y sembrar el número de colonias de acuerdo al cuadro siguiente, cada una en un tubo con 5 mL de caldo infusión cerebro corazón, para la prueba de la coagulasa e incubarlos a 35 ± 2 °C durante 18-24 h.
20. Agregar a 0.2 mL del cultivo anterior, 0.2 mL de plasma de conejo diluido v/v con solución estéril y cloruro de sodio 0.15 molar. Incubar en baño de agua a 35 ± 2 °C y observar la formación del coágulo en intervalos de 1 hora hasta cumplir 6 horas. Si no hay formación de este, observar a las 24 horas y considerar la prueba positiva si hay formación de coágulo firme.
21. A las colonias seleccionadas, realizarles un frotis y tefirlas con la técnica de Gram, practicarles también la prueba de la catalasa y oxidasa
22. Incluir tabla con el recuento de colonias sospechosas de *Staphylococcus aureus* en el alimento, para cada una de las diluciones, tablas con resultados de la tinción Gram y pruebas bioquímicas realizadas.
23. Calcular el resultado en base al total de colonias presuntivas contadas en las placas y de las colonias confirmadas (por tinción, pruebas catalasa y oxidasa) y multiplicando por la inversa de la dilución de la placa seleccionada.
24. Reportar el resultado como UFC/g ó mL de *Staphylococcus aureus* en alimento, en agar Baird Parker incubado 48 h a 35 ± 2 °C.

Número de colonias sospechosas en placa	Colonias por probar
Menos de 50	3
51-100	5
101-150	7

Técnicas de confirmación de *Staphylococcus aureus*:

25. Tinción Gram: Preparar el frotis y realizar la coloración primaria, la fijación con el mordente, la decoloración y la aplicación del colorante de contraste. Dejar secar y observar al microscopio con objetivo de inmersión.
26. Prueba de la catalasa: Recoger con un asa de inoculación una porción de la colonia de un

cultivo puro y colocar sobre un portaobjetos, agregar una gota de H₂O₂ al 30% sobre el cultivo y observar la inmediata formación de burbujas tomando lo anterior como prueba positiva.

27. Prueba de la oxidasa: Utilizar una placa o tira con reactivo para la prueba de la oxidasa (clorhidrato u oxalato de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%), colocar una porción de la colonia en la placa y observar el cambio de color los primeros 20 segundos. La prueba positiva da una coloración púrpura.

28. Se pueden realizar otras pruebas bioquímicas en medios de cultivo (opcional).

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. De las principales características de *Staphylococcus aureus*.
2. ¿Por qué *Staphylococcus aureus* representa una causa de intoxicación alimentaria?
3. ¿Cómo un alimento puede contaminarse con *Staphylococcus aureus*?
4. Describa las características de la intoxicación estafilocócica (signos y síntomas) y alimentos normalmente implicados en la intoxicación:
5. ¿Qué cantidad de toxina estafilocócica es necesaria para producir enfermedad?
6. ¿Existe alguna especificación microbiológica de *Staphylococcus aureus* en alguna Norma Oficial Mexicana para el alimento analizado? Mencione el nombre de la norma que lo contiene y el límite máximo permisible.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmninnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de mesófilos aerobios en un alimento cocido
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Realizar el recuento de mesófilos aerobios en un alimento cocido mediante muestreo y análisis con base a las Normas Oficiales Mexicanas y en su determinación de su calidad microbiológica siguiendo las buenas prácticas de higiene e inocuidad durante su elaboración.

FUNDAMENTO TEÓRICO

En la actualidad tanto el nutriólogo, tecnólogo, como el microbiólogo de alimentos tienen el gran reto de proporcionar alimentos sanos e inocuos para el consumidor. Dada la dificultad en determinar cada uno de los microorganismos de interés en la inocuidad y calidad de los alimentos, se han estado utilizando una variedad de otros microorganismos que se encuentran frecuentemente en el alimento en cuestión y son relativamente fáciles de cultivar. A tales microorganismos que sirven para indicar la presencia de otros se les ha denominado microorganismos indicadores. Uno de los grupos más importantes de microorganismos indicadores son la cuenta aeróbica de placa (CAP), también conocida como cuenta estándar de placa o cuanta total de placa. La CAP se usa como indicador de las poblaciones microbianas aeróbicas de un alimento capaces de crecer en medio sólido complejo y es posiblemente uno de los grupos indicadores más amplios ya que puede incluir todo tipo de bacterias, hongos o levaduras que sean capaces de formar colonias en 24 a 48 horas. Esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes, ya que no incluye por ejemplo organismos anaeróbicos u hongos y bacterias de crecimiento lento. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente y la misma refleja si el manejo sanitario del producto ha sido el adecuado. Cuando se incuba el medio utilizado para la CAP a 35 ± 2 °C por 48 h, los microorganismos que se determinan son los llamados mesófilos aerobios y puede aplicarse para la estimación de microorganismos viables en una amplia variedad de alimentos como en productos fresco-enfriados, congelados, precocidos, cocinados o alimentos preparados. El recuento de mesófilos aerobios refleja las condiciones de manipulación, las condiciones higiénicas de la materia prima y especialmente, si el alimento es cocido, indica una recontaminación, inadecuada temperatura de almacenamiento o conservación, un mal recalentamiento, contaminación por el medio ambiente, entre otros. Por otra parte, el recuento de termófilos, psicófilos y psicotróficos es importante para predecir la estabilidad del producto bajo diferentes condiciones de almacenamiento específicos. Para obtener resultados reproducibles y por lo tanto significativos, es de suma importancia seguir fielmente y controlar cuidadosamente las condiciones del análisis.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS

Por grupo (primera sesión):

- Balanza con sensibilidad de 0.1 g
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Cinta para etiquetar y plumón
- Bactericida o sanitizante
- Papel o toallas desechables para secar
- Cofias, guantes, cubrebocas
- Aluminio o papel estraza

Por equipo (primera sesión):

- Una muestra de alimento cocido para
- Una espátula
- Cuatro mecheros Meker-Fisher, o en su

analizar. • Sies cajas Petri estériles • Un matraz con 130 mL de Agar Estándar Métodos estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente • Una botella de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Cuatro tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Una gradilla • Cinco5 pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • Una pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril • Una pipetas de 10 mL con tapón de algodón estéril • Un vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril para homogeneizar	defecto • Un Meker-Fisher • Tres mecheros Bunsen • Un auxiliador de pipeteo o perilla Por grupo (24 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar y plumón Por grupo (48 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar y plumón
---	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

El muestreo y transporte del alimento se realizará en base a la NOM-109-SSA1-1994 y la preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994.

Preparación de dilución primaria:

1. Colocar la muestra del alimento por analizar en un vaso de licuadora estéril. Operar de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo el alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos. En condiciones asépticas pesar 10 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra, para preparar la dilución 10-1. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

2. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
3. Permitir que las partículas grandes se sedimenten (en el caso del alimento), tomar de las capas superiores de la suspensión 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-2.
4. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar con otra pipeta 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-3. Repetir este paso hasta preparar la dilución 10-5 para alimentos.

Realizar la inoculación por la técnica de vaciado en placa:

5. Para el recuento de mesófilos aerobios se empleará el método de vaciado en placa, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994:
6. En condiciones asépticas y con diferentes pipetas, colocar 1 mL de cada dilución de 10-1 a 10-5 e inocular en cajas Petri estériles separadas.
7. Depositar en cada placa de 15 a 20 mL de Agar Estándar Métodos fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir una caja sin inóculo con agar como testigo de

esterilidad.

8. Homogeneizar el inóculo en el agar con movimientos suaves, 6 de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.
9. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar de 24 a 48 h a 35 ± 2 °C.

Recuento de colonias:

10. Realizar el recuento de todas las colonias a las 24 y a las 48 h de incubación para determinar la Cuenta Total Viable (CTV) de mesófilos aerobios, incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento. Para el recuento de sólo las bacterias mesófilas aerobias no incluir las colonias de mohos y de levaduras.
11. Seleccionar las placas que se encuentren entre un intervalo de 25 a 250 colonias.
12. Obtener el resultado multiplicando por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por gramo de la muestra.
13. Reportar el resultado como UFC/g de microorganismos mesófilos aerobios o de bacterias aerobias mesófilas en Agar Estándar Métodos, incubadas 48 h a 35 ± 2 °C.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Defina microorganismo indicador.
2. Defina mesófilos aerobios y explique qué tipo de indicador microbiológico es.
3. ¿Qué indica la presencia de mesófilos aerobios en una muestra de alimento?
4. ¿En qué parte del proceso de preparación pudo el alimento haberse contaminado con mesófilos aerobios?
5. Escriba el nombre de la Norma Oficial Mexicana utilizada para la realización del recuento de estos microorganismos:
6. ¿Cuál es el nombre y el fundamento de la técnica utilizada?
7. ¿Qué significa el término de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)?
8. ¿Por qué las pipetas deben de cambiarse entre cada dilución?
9. ¿Existen especificaciones microbiológicas de mesófilos aerobios en alguna Norma Oficial Mexicana para el alimento, agua y/o bebida analizados? Mencione el nombre de las normas que las contienen y los límites máximos permisibles.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#!/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepacticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Análisis microbiológicos de superficies vivas, inertes y ambiente
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Investigar la calidad microbiológica de superficies vivas, inertes y ambiente de un Servicio de Alimentos con base a las Normas Oficiales Mexicanas mediante muestreo y análisis, vigilando el control higiénico del entorno que rodea al alimento y garantizando su inocuidad

FUNDAMENTO TEÓRICO
Se consideran enfermedades de origen alimentario o enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), las ocasionadas como consecuencia de la ingestión de alimentos o bebidas contaminados. Son debidas a distintas causas, pero en la mayoría de los casos son producidas por bacterias o sus toxinas, aunque también pueden intervenir otros microorganismos como hongos, virus, parásitos y otras sustancias. La calidad microbiológica y por lo tanto, la calidad sanitaria de los alimentos, dependerá tanto de la materia prima utilizada para su elaboración como de las condiciones higiénicas en que son preparados, manejados y conservados, incluyendo las superficies con las que entran en contacto. Especialmente durante la elaboración de los alimentos, se pueden introducir microorganismos procedentes de manipuladores infectados o como consecuencia de contaminaciones cruzadas entre alimentos crudos y cocinados al utilizar el mismo cuchillo, la misma tabla de cortar o cualquier otro utensilio para preparar alimentos sin lavarlos previamente. Alimentos contaminados por una mala manipulación y cualquier fallo higiénico repercutirán en el número de personas que pueden verse afectadas por un error sanitario, siendo bastante el riesgo sobre todo en el caso de la restauración colectiva (como en los Servicios de Alimentos), por el número de personas que pueden ser afectadas. Por lo tanto, una adecuada higiene y limpieza debe mantenerse en todas las superficies vivas, inertes y ambiente de las áreas de preparación y servicio de los alimentos, así como de almacenamiento. Para evaluar la eficiencia de la limpieza y desinfección de una superficie, se han desarrollado diversos métodos y propuesto normas que establecen el número total de microorganismos por unidad de superficie. Estos métodos pueden aplicarse a la cuantificación o búsqueda de microorganismos indicadores o patógenos específicos según corresponda. Dentro de los procedimientos más usuales se encuentran: 1) Método del hisopo o torunda: Aplicable a superficies desinfectadas, utensilios de comedor y superficie de mano. 2) Método de la esponja: Útil para áreas grandes, especialmente para detección de <i>Salmonella</i> spp. 3) Método de placa por contacto: Para superficies planas e impermeables que han sido previamente saneadas y desinfectadas. 4) Método de enjuague: Para objetos pequeños: cucharas, tenedores, mamilas de biberón o para el muestreo de superficies de interiores de envases, botellas de plástico, etc. En la presente práctica, se llevará a cabo el muestreo de superficies vivas e inertes por el método del hisopo o torunda y el muestreo de ambiente por la técnica de exposición de placa abierta.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS
Por grupo (primera sesión): - Balanza con sensibilidad de 0.1 g - Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C - Cinta para etiquetar y plumón - Bactericida o sanitizante - Papel o toallas desechables para secar - Cofias, guantes, cubrebocas - Aluminio o papel estraza

Por equipo (primera sesión): • Por equipo (primera sesión): • Cuarenta cajas Petri estériles • Un matraz con 120 mL de Agar Estándar Métodos estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente • Un matraz con 120 mL de Agar Bilis Rojo Violeta estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente • Cinco matraces de 125 mL con 50 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Cinco botellas de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Cinco tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril • Una gradilla • Quince pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • Una pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril	• Cinco pipetas de 10 mL con tapón de algodón estéril • Hisopos o torundas estériles • Pinzas rectas estériles para toma de muestra si son necesarias • Cuatro Plantillas de papel aluminio estériles de 12 cm de lado con un cuadro recortado en el centro de 5x5 cm. • Cuatro mecheros Meker-Fisher, o en su defecto Bunsen • Un auxiliador de pipeteo o perilla Por grupo (24 y 48 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar y plumón
--	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

Recolección de las muestras de ambiente:

1. Utilizar placas de Agar Estándar Métodos solidificadas que hayan pasado una prueba de esterilidad (incubación por 24-48 h a 35 ± 2 °C y no presentar crecimiento alguno de microorganismos).
2. Para el muestreo, colocarlas en lugares estratégicos del área a muestrear, exponerlas al ambiente durante 15 minutos.
3. Una vez cumplido el tiempo, tapar cuidadosamente las placas con cuidado de no contaminarlas. Etiquetar con los datos correspondientes a la muestra. Colocar en hielera con refrigerantes y transportar al laboratorio.
4. Incubar a 35 ± 2 °C durante 24 a 48 horas, después del período de incubación realizar el conteo total de colonias.
5. Reportar como UFC/placa/15 minutos de exposición.

Toma de muestras de superficies vivas:

6. En condiciones asépticas tomar la torunda con la pinza (o el hisopo), sumergir en la solución de buffer de fosfatos, exprimir contra las paredes del matraz.
7. Frotar la superficie de la palma de las manos con la torunda o hisopo, enjuagar en la solución de buffer de fosfatos y frotar de nuevo la superficie interna de los dedos y uñas.
8. Colocar la torunda o hisopo dentro del matraz con los datos que lo identifiquen. En caso de utilizar hisopo, romper cuidadosamente la parte que tuvo contacto con las manos. Colocar en hielera con refrigerantes y transportar al laboratorio. Agitar vigorosamente para proceder a los análisis.

Toma de muestras de superficies inertes:

9. En condiciones asépticas tomar la torunda con la pinza (o el hisopo), sumergir en la solución de buffer de fosfatos, exprimir contra las paredes del matraz.
10. Para superficies grandes, lisas y planas: Colocar una plantilla de aluminio de 25 cm² en la

superficie inerte a muestrear, en un ángulo de 30° frotar el área delimitada por la plantilla con la torunda o hisopo en una sola dirección, sin regresar en dirección opuesta. Para utensilios: Tomar la muestra de la superficie del utensilio que entra en contacto con el alimento o la boca.

11. Colocar la torunda o el hisopo dentro del matraz con los datos que lo identifiquen. En caso de utilizar hisopo, romper cuidadosamente la parte que tuvo contacto con las manos. Colocar en hielera con refrigerantes y transportar al laboratorio. Agitar vigorosamente para proceder a los análisis.

La preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994 en la forma que se describe a continuación.

Preparación de dilución primaria:

12. En condiciones asépticas tomar 10 mL del matraz conteniendo la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra, para preparar la dilución 10-1. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

13. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
14. Tomar 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-2.
15. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo para homogeneizar.

Realizar la inoculación por la técnica de vaciado en placa:

Se empleará el método de vaciado en placa para el recuento de mesófilos aerobios y de coliformes totales, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994 y NOM-113-SSA1-1994, respectivamente:

16. En condiciones asépticas y con diferentes pipetas, colocar 1 mL de cada muestra directa y de la dilución de 10-1 a 10-2 e inocular en cajas Petri estériles separadas. Realizar esto por duplicado (una batería de cajas serán para recuento de mesófilos aerobios la otra batería será para recuento de coliformes totales).
17. Depositar en cada caja de la batería para mesófilos aerobios de 15 a 20 mL de Agar Estándar Métodos fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir una caja sin inóculo con agar como testigo de esterilidad.
18. Depositar en cada caja de la batería para coliformes totales de 15 a 20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir también una caja sin inóculo con agar como testigo de esterilidad.
19. Homogeneizar el inóculo en el agar con movimientos suaves, 6 de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.
20. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar de los coliformes totales por 24 h y los mesófilos aerobios de 24 a 48 h, en ambos casos a una temperatura de 35 ± 2 °C.

Recuento de colonias:

21. Realizar el recuento de todas las colonias a las 24 y a las 48 h de incubación para determinar la Cuenta Total Viable (CTV) de mesófilos aerobios, incluyendo las colonias puntiformes. Para coliformes totales, realizar el conteo de las colonias típicas presentes en cada placa: aquellas colonias de color rojo oscuro que generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es rojo claro o rosa, con diámetros de 0.5 a 2.0 mm.
22. Seleccionar las placas que se encuentren entre un intervalo de 25 a 250 colonias para el caso de mesófilos aerobios y las placas que tengan de 15 a 150 colonias de coliformes totales para expresar el resultado.
23. Obtener el resultado multiplicando por la inversa de la dilución y obtener el número de UFC/cm² de muestra o UFC/mano.

24. Reportar el resultado como UFC/cm² o mano de microorganismos mesófilos aerobios y de coliformes totales, incubados 48 h a 35 ± 2 °C y por 24 h a 35 ± 2 °C, respectivamente.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Defina coliformes totales y explique qué tipo de indicador microbiológico es.
2. ¿Qué indica la presencia de coliformes totales en una muestra?
3. Escriba el nombre de la Norma Oficial Mexicana utilizada para la realización del recuento de dichos microorganismos y para el recuento de mesófilos aerobios:
4. ¿Cuál es el nombre y el fundamento de la técnica utilizada en ambos casos?
5. ¿Existe alguna especificación microbiológica de mesófilos aerobios y de coliformes totales en alguna Norma Oficial Mexicana para las superficies analizadas? Mencione el nombre de la norma que las contiene y los límites máximos permisibles para cada caso.
6. ¿De qué manera puede influir el ambiente en la calidad microbiológica de los alimentos?
¿Cuáles microorganismos pueden ser encontrados en el ambiente?
7. Investigue los microorganismos que pueden ser encontrados en el suelo.
8. Mencione microorganismos que puede transmitir el hombre a los alimentos (microbiota de la piel, fosas nasales, patógenos intestinales).
9. ¿Qué microorganismos pueden ser vehiculados a los alimentos por un cuchillo o una tabla de cortar sin higienizar?
10. Consulte el Manual de las Cinco Claves para la Inocuidad de los Alimentos de la OMS y explique en qué consiste cada una de las cinco claves.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en moluscos bivalvos
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Investigar la presencia de <i>Vibrio cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> en moluscos bivalvos por pruebas bioquímicas, cumpliendo las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas y comprendiendo la naturaleza y características de dichos patógenos, así como sus implicaciones en la salud del ser humano

FUNDAMENTO TEÓRICO

Las bacterias del género *Vibrio* pertenecen a la familia Vibrionaceae, son Gram negativas, anaerobias facultativas, móviles por un flagelo polar y tienen forma de bastón curvilíneo. El género comprende al menos doce especies patógenas para los seres humanos, ocho de las cuales pueden causar, o estar asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), sin embargo, la mayoría de las ETA por vibrios son causadas por *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* o *Vibrio vulnificus*. En las regiones de clima tropical y templado, estas especies están presentes naturalmente en el medio marino y costero, y son muy abundantes en los estuarios. Los vibrios patógenos, en particular *V. cholerae*, también pueden recuperarse de las cuencas de agua dulce en los estuarios, donde además puede introducirse por contaminación fecal. El cólera, enfermedad caracterizada por una diarrea profusa con aspecto “de agua de arroz”, es la enfermedad causada por *V. cholerae*, que infortunadamente aún es endémica en muchos países en vías de desarrollo. Se ha conocido preferentemente por su origen hídrico (aguas contaminadas), ya que *V. cholerae* tiene la capacidad de sobrevivir en agua dulce y en agua compuesta por hasta el 3 % de sal. No obstante, está demostrado que algunos alimentos pueden ser reservorio, como los productos de pesca incluyendo crustáceos (langostino, cangrejo de mar, langosta), moluscos (ostras, almejas, mejillones, abulones) y diversos peces, incluyendo el pescado procesado desecado. Los brotes de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* tienen lugar tras el consumo de pescado o productos de la pesca crudos o insuficientemente cocinados. Este grupo de bacterias presenta una característica común, su elevada sensibilidad a la desecación y al frío. Ello implica, por consiguiente, que la aparición de brotes tenga un carácter estacional. Los meses más cálidos del año, especialmente cuando coinciden con épocas lluviosas, favorecen su extensión a través del consumo de pescado. En Asia, y especialmente en Japón y Corea, donde hay un elevado consumo de pescado fresco crudo, incluso vivo, el principal agente implicado en casos de toxiinfección alimentaria es *Vibrio parahaemolyticus*. La moda actual del consumo de pescado crudo, o de productos poco cocinados, podría facilitar que este microorganismo pueda convertirse en habitual en la lista de patógenos transmitidos por los alimentos. *Vibrio vulnificus*, de las tres especies, es el agente causal de infección más grave. Puede sobrevivir en ostras durante dos semanas a temperaturas de refrigeración y se caracteriza por su naturaleza altamente invasiva que tiende a la destrucción de tejidos y se asocia a heridas infectadas. La toxiinfección por vías gastroentéricas se debe al consumo de ostras crudas a las que son sensibles personas adultas con alteraciones hepáticas o inmunodeprimidas y puede llegar a causar una grave septicemia que con frecuencia lleva a la muerte. El microorganismo tiende a estar presente en aguas de estuarios. Estos tres agentes patógenos, al igual que el resto de las especies de *Vibrio* son sensibles al calor, por lo que la cocción completa de los alimentos reduce la posibilidad de adquirir una ETA causada por estos microorganismos.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS

Por grupo (primera sesión):
Balanza con sensibilidad de 0.1 g

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C

Cinta para etiquetar y plumón

Bactericida o sanitizante

Papel o toallas desechables para secar

Cofias, guantes, cubrebocas

Aluminio o papel estraza

Bolsas estériles auto-adheribles para homogeneizar muestras

Por equipo (primera sesión):

- Al menos 200 g de una muestra de alimento para analizar (6 a 8 moluscos de concha como almejas, ostras u ostiones)
- Una espátula
- 1 vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril para homogeneizar
- 1 matraz con 225 mL de caldo peptona alcalino estéril (preparado con 10 g de peptona, 1000 mL de agua destilada, 10 g de NaCl y ajustado a un pH de 8)
- 4 mecheros Meker-Fisher, o en su defecto 1 Meker-Fisher y 3 mecheros Bunsen

Por grupo (24 h):

- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Aluminio o papel estraza
- Cinta para etiquetar
- Cepas patrón de *Vibrio* spp.
- Por equipo (24 h):
- 10 cajas con Agar TCBS
- 1 mechero Meker-Fisher
- 1 asa bacteriológica
- Por grupo (48 h):
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Aluminio o papel estraza
- Cinta para etiquetar
- Aceite de inmersión
- Colorantes: safranina, cristal violeta o violeta de genciana.
- Lugol
- Alcohol cetona
- Paralelas
- Bactericida o sanitizante
- Papel o toallas desechables para secar

Por equipo (48 h):

- Microscopio óptico de campo claro con objetivo de 100x
- 2 Portaobjetos
- 2 Cubreobjetos
- 2 asas bacteriológicas
- 1 mechero Meker-Fisher
- 1 mechero Bunsen
- 1 piseta con agua destilada
- 3 juegos de tubos con medios para pruebas bioquímicas adicionadas con 2 % de NaCl para la identificación del microorganismo (TSI/Kliger, medio SIM, caldo RM-VP para prueba de Voges-Proskauer y rojo de metilo, citrato de Simmons, gelatina nutritiva, caldo malonato de Ewing, caldo Urea)
- Tiras para la realización de la prueba de la oxidasa
- Peróxido de hidrógeno al 30%

Por grupo (72 y 96 h):

- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Refrigerador a 4 ± 2 °C
- Aluminio o papel estraza
- Cinta para etiquetar
- Por equipo (72 y 96 h):
- Rojo de metilo
- Alfa-naftol
- KOH 1 N
- Reactivo de Kovacs

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

Este es un método para realizar la identificación presuntiva de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, el cual está basado en el Apéndice Normativo B, Métodos de Prueba de la NOM-242-SSA1-2009:

1. Desconchar de 6 a 8 piezas del molusco bivalvo a analizar e incluir el líquido; la carne se podrá picar en trozos con utensilios estériles para facilitar la homogeneización. Licuar en licuadora de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos.
2. Pesar en condiciones asépticas 25 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 225 mL de caldo de enriquecimiento peptona alcalino a pH de 8. Incubar de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C.
3. Sin agitar, transferir el inóculo de la película (crecimiento superficial) a cajas Petri con agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa) y sembrar por estrías por agotamiento. Realizar también la siembra de la cepas patrón si se disponen de ellas en cajas con ese medio selectivo y diferencial. Incubar todas las cajas de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C.
4. Seleccionar las colonias típicas de cada especie de *Vibrio* del medio selectivo en que se sembró. Las colonias típicas de *Vibrio cholerae* en Agar TCBS son: amarillas con borde translúcido, lisas, convexas/ligeramente achatadas, 2-3 mm de diámetro, con viraje de color del medio de verde a amarillo; las colonias típicas de *Vibrio parahaemolyticus* y de *Vibrio vulnificus* en Agar TCBS son: grandes, lisas y verdes, debido a que no son capaces de fermentar la sacarosa.
5. A partir de una colonia bien aislada proveniente de la muestra de alimento y otra de la cepa patrón sembrada, llevar a cabo prueba de catalasa y oxidasa, si resultan positivas, realizar tinción Gram, la cual debe ser negativa. Una vez confirmadas esas pruebas, se realizará la inoculación en los medios para pruebas bioquímicas con 2 % de NaCl.
6. Comparar los resultados de la muestra con los reportados para *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en bibliografía y con los obtenidos en la cepa patrón.
7. Reportar ausencia o presencia de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en 25 g de alimento.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Indique las principales características de identificación (de tinción, morfológicas, bioquímicas) de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*.
2. ¿En qué parte de la cadena alimentaria puede un alimento contaminarse con *Vibrio* spp.?

3. Escriba el nombre de las Normas Oficiales Mexicanas utilizadas para el aislamiento e identificación de *Vibrio* spp.:
4. ¿Cuál es el fundamento de las técnicas utilizadas para identificar a estos microorganismos?
5. ¿Existe alguna especificación microbiológica respecto a la presencia de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en alguna Norma Oficial Mexicana para los productos de la pesca?
6. Mencione el nombre de la norma que los contiene y el límite indicado para cada alimento especificado

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Aislamiento e identificación de <i>Salmonella</i> spp. en aves y/o huevo
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Investigar la presencia de <i>Salmonella</i> spp. en aves y/o huevo por pruebas bioquímicas, cumpliendo con las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas y comprendiendo la naturaleza y características de dicho patógeno, así como sus implicaciones en la salud del ser humano

FUNDAMENTO TEÓRICO
El género <i>Salmonella</i> pertenece a la tribu Salmonelleae, de familia de las Enterobacteriaceae. Las salmonelas están muy difundidas en la naturaleza, siendo sus principales reservorios los animales y las personas. La toxiinfección alimentaria por <i>Salmonella</i> es consecuencia de la ingestión de alimentos que contienen cepas apropiadas de este género en grandes cantidades. Estudios del DNA mediante técnicas de hibridación han mostrado que el género <i>Salmonella</i> está constituido por 2 especies: <i>Salmonella enterica</i> y <i>Salmonella bongori</i>. <i>Salmonella enterica</i> está compuesta por 6 subespecies: <i>Salmonella enterica</i> subespecie enterica, <i>Salmonella enterica</i> subespecie salamae, <i>Salmonella enterica</i> subespecie arizonae, <i>Salmonella enterica</i> subespecie diarizonae, <i>Salmonella enterica</i> subespecie houtenae y <i>Salmonella enterica</i> subespecie indica. A su vez las subespecies de <i>Salmonella enterica</i> y la especie <i>Salmonella bongori</i> se dividen en más de 2,400 serovariedades. Algunos serotipos son más virulentos que otros, por ello se acepta de modo general que todos los serotipos de <i>Salmonella</i> son potencialmente peligrosos para el hombre. La mayoría de las serovariedades aisladas del hombre y de los animales de sangre caliente pertenecen a la subespecie enterica. La puerta de entrada de las salmonelas, lo mismo que las shigelas y de otros agentes de infecciones gastrointestinales, es casi exclusivamente la vía oral. La infección se transmite por las excretas, principalmente por las heces, pero también por la orina. Son muchos los alimentos se han visto contaminados e implicados en la toxiinfección causada por este microorganismo, entre ellos: carnes crudas de mamíferos y aves, huevos, leche y productos lácteos, pescado, gambas, ancas de rana, levadura, coco, salsas y ciertos aderezos de ensaladas, mezclas para tartas, postres y rellenos de crema, gelatina en polvo, manteca de cacahuates, cacao y chocolate. La razón de que este microorganismo pueda contaminar a casi todos los alimentos es que éstos pueden contaminarse por excretos humanos en cualquier fase de los procesos de manipulación, desde las materias primas a la preparación del alimento en la cocina. Las salmonelas pueden a veces ser vehiculadas por los alimentos de origen vegetal, tales como los cereales y los frutos del cocotero, sin embargo, los vehículos dominantes son la carne (ternera, cerdo, aves, etc.), los huevos y los productos industrializados que contienen estas materias primas básicas. También la contaminación puede deberse a un deficiente control de la temperatura, pues las bacterias se multiplican en el alimento hasta alcanzar la dosis infectiva.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS
Por grupo (primera sesión): - Balanza con sensibilidad de 0.1 g - Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C - Cinta para etiquetar y plumón - Bactericida o sanitizante - Papel o toallas desechables para secar

Cofias, guantes, cubrebocas Aluminio o papel estraza Bolsas estériles auto-adheribles para homogeneizar muestras	
Por equipo (primera sesión): • Al menos 200 g de una muestra de alimento para analizar • 1 espátula • 1 vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril para homogeneizar • 1 matraz con 125 mL de agua destilada estéril para preparar caldo selenito y cistina • 4 mecheros Meker-Fisher, o en su defecto 1 Meker-Fisher y 3 mecheros Bunsen Por grupo (24 h): • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar • Cepa patrón de Salmonella spp. • Por equipo (24 h): • 2 tubos con 10 mL de caldo tetratiónato o Vassiliadis-Rappaport • 2 tubos con 10 mL de agua estéril para preparar caldo selenito y cistina • 2 pipetas de 1 mL estériles Por grupo (48 h): • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar • Por equipo (48 h): • 5 cajas con Agar SS • 5 cajas con Agar Mac Conkey • 1 mechero Meker-Fisher • 1 asa bacteriológica Por grupo (72 h): • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar	• Aceite de inmersión • Colorantes: safranina, cristal violeta o violeta de genciana. • Lugol • Alcohol cetona • Paralelas • Bactericida o sanitizante • Papel o toallas desechables para secar Por equipo (72 h): • Microscopio óptico de campo claro con objetivo de 100x • 2 Portaobjetos • 2 Cubreobjetos • 2 asas bacteriológicas • 1 mechero Meker-Fisher • 1 mechero Bunsen • 1 piseta con agua destilada • 3 juegos de tubos con medios para pruebas bioquímicas para la identificación del microorganismo (TSI/Kliger, medio SIM, caldo RM-VP para prueba de Voges-Proskauer y rojo de metilo, citrato de Simmons, gelatina nutritiva, caldo malonato de Ewing, caldo Urea) • Tiras para la realización de la prueba de la oxidasa • Peróxido de hidrógeno al 30% Por grupo (96 h en adelante): • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Refrigerador a 4 ± 2 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar • Por equipo (96 h en adelante): • Rojo de metilo • Alfa-naftol • KOH 1 N • Reactivo de Kovacs

Este es un método para realizar la identificación presuntiva de *Salmonella* spp., el cual está basado en la NOM-114-SSA1-1994 y el Apéndice Normativo B, Métodos de Prueba de la NOM-243-SSA1-2010:

1. Tomar la muestra del alimento por analizar y licuar en licuadora de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos.
2. Por ser sustancias de origen animal crudas se pesan en condiciones asépticas 15 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 125 mL de caldo de pre-enriquecimiento selenito y cistina. Incubar de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C. (Puede realizarse también el análisis de 25 g de la muestra, en tal caso se emplean 225 mL de caldo de pre-enriquecimiento).
3. Agitar suavemente los cultivos de pre-enriquecimiento y transferir respectivamente 1 ml de la mezcla a un tubo que contenga 10 ml de caldo tetrationato y a otro con 10 ml de caldo selenito cistina. Como alternativa, en sustitución del caldo tetrationato puede emplearse el medio Vassiliadis-Rappaport. Incubar de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C.
4. Mezclar cada tubo e inocular por estrías por agotamiento a partir de cada uno en cajas Petri con agar *Salmonella-Shigella* (SS), agar XLD (xilosa lisina desoxicolato) y Agar Mac Conkey. Realizar también la siembra de la cepa patrón de *Salmonella* en cajas con esos medios selectivos y diferenciales. Incubar todas las cajas de 18 a 24 h a 35 ± 2 °C.
5. Seleccionar las colonias típicas de *Salmonella* de los medios selectivos en que se sembró. Las colonias típicas de este microorganismo en Agar SS y Mac Conkey son transparentes y pueden o no presentar punto negro; en Agar XLD las colonias son rosas o rojas transparentes con o sin centro negro. En algunos casos las colonias pueden aparecer completamente negras.
6. A partir de una colonia bien aislada proveniente de la muestra de alimento y otra de la cepa patrón sembrada, llevar a cabo la inoculación en los medios para pruebas bioquímicas y realizar tinción Gram y prueba de catalasa y oxidasa.
7. Comparar los resultados de la muestra con los reportados para *Salmonella* en bibliografía y con los obtenidos en la cepa patrón.
8. Reportar ausencia o presencia de *Salmonella* spp. en 15 g de alimento.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Indique las principales características de identificación (de tinción, morfológicas, bioquímicas) de *Salmonella*.
2. ¿Qué condiciones promueven el crecimiento de *Salmonella* y cómo se puede retardar su crecimiento?

3. ¿En qué parte de la cadena alimentaria puede un alimento contaminarse con Salmonella?
4. Escriba el nombre de las Normas Oficiales Mexicanas utilizadas para el aislamiento e identificación de Salmonella spp.:
5. ¿Cuál es el fundamento de las técnicas utilizadas para identificar a este microorganismo?
6. ¿Cómo son las colonias típicas de Salmonella en los Agares SS, XLD y Mac Conkey y explique por qué crecen así?
7. ¿Existe alguna especificación microbiológica respecto a la presencia de Salmonella en alguna Norma Oficial Mexicana para las aves y el huevo? Mencione el nombre de la norma que los contiene y el límite indicado para cada alimento especificado.
8. Mencione 3 ejemplos diferentes de enfermedades

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de hongos en harinas de cereales y/o alimentos a base de cereales o harinas
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Realizar el recuento de hongos en harinas de cereales y/o alimentos a base de cereales o harinas mediante ensayos microbiológicos, observado las especificaciones de las Normas Oficiales Mexicanas y comprendiendo la naturaleza y características de dichos microorganismos, así como su implicación en la salud del ser humano y deterioro de los alimentos.

FUNDAMENTO TEÓRICO
Algunas especies de hongos pueden crecer en baja actividad de agua (Aw) lo que les permite colonizar productos como los cereales, que de otro modo serían excesivamente secos para el crecimiento microbiano. Las micotoxinas son metabolitos de los mohos que pueden contaminar los alimentos, los piensos de los animales o las materias primas y que llegan a ser tóxicos para el hombre o para los animales domésticos. Su estudio y la legislación relacionada con su control, se basan en que son consideradas adulterantes; la preocupación mayor estriba en la posibilidad de que se produzcan tumores malignos, como resultado de la ingestión repetida de dosis bajas de micotoxinas. Existen varios géneros de mohos que incluyen especies toxigénicas, pero tres de ellos son especialmente importantes: <i>Aspergillus</i>, <i>Penicillium</i> y <i>Fusarium</i>. De todas las micotoxinas, el mayor énfasis se ha puesto en las aflatoxinas. La contaminación por mohos de los piensos y de los alimentos no se puede evitar completamente por lo que la reducción de la contaminación sería la mejor solución al problema. El Agar Dextrosa Papa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos. Este medio es recomendado para realizar el recuento colonial. También puede ser utilizado para promover el crecimiento de hongos y levaduras de importancia clínica. La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos. Los hongos pueden crecer en pH más ácidos que el resto de los microorganismos, es por ello que el medio de cultivo con ácido tartárico impide el crecimiento de otros microorganismos como las levaduras o bacterias que de manera normal estarían presentes en el medio no acidificado.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS	
Por grupo (primera sesión): - Balanza con sensibilidad de 0,1 g - Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 5 °C - Aluminio o papel estraza - Cinta para etiquetar - Bactericida o sanitizante - Papel o toallas desechables para secar 1 botella con ácido tartárico al 10% estéril	
Por equipo (primera sesión): • Por equipo (primera sesión): • Una muestra de alimento cocido para analizar. • 6 cajas Petri estériles	• 1 vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril para homogeneizar • 1 espátula • 4 mecheros Meker-Fisher, o en su

• 1 matraz con 130 mL de Agar Dextrosa Papa estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente • 1 botella de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • 4 tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril • 1 gradilla • 5 pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • 1 pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril • 1 pipeta de 10 mL con tapón de algodón estéril	defecto 1 Meker-Fisher y 3 mecheros Bunsen • 1 auxiliador de pipeteo o perilla Por grupo (24 h hasta 5 días) • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 25 ± 5 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar
--	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

El muestreo y transporte del alimento se realizará en base a la NOM-109-SSA1-1994 y la preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994:

Preparación de dilución primaria:

1. Colocar la muestra del alimento por analizar en un vaso de licuadora estéril. Operar de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo el alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos. En condiciones asépticas pesar 10 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra, para preparar la dilución 10-1. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

2. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
3. Permitir que las partículas grandes se sedimenten (en el caso del alimento), tomar de las capas superiores de la suspensión 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-2.
4. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar con otra pipeta 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-3. Repetir este paso hasta preparar la dilución 10-5 para alimentos.

Realizar la inoculación por la técnica de vaciado en placa:

Para el recuento de hongos en alimentos se empleará el método de vaciado en placa, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994:

5. En condiciones asépticas y con diferentes pipetas, colocar 1 mL de cada dilución de 10-1 a 10-5 e inocular en cajas Petri estériles separadas.
6. Depositar en cada placa de 15 a 20 mL de Agar Dextrosa Papa acidificado con ácido tartárico (en una proporción de 1.4 mL de ácido por cada 100 mL de medio) que se encuentre fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir una caja sin inóculo con agar como testigo de esterilidad.
7. Homogeneizar el inóculo en el agar con movimientos suaves, 6 de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.
8. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar de por 5 días a 25 ± 5 °C.

Recuento de colonias:

9. Realizar el recuento de todas las colonias cada 24 h de incubación hasta completar los 5 días,

para determinar la Cuenta Total Viable (CTV) de hongos.

10. Seleccionar las placas que se encuentren entre un intervalo de 20 a 200 colonias.
11. Obtener el resultado multiplicando por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por gramo de la muestra.
12. Reportar el resultado como UFC/g de hongos en Agar Dextrosa Papa, incubados por 5 días h a 25 ± 5 °C..

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Defina qué es un hongo filamentoso y qué es una levadura.
2. Mencione cuatro géneros importantes de hongos toxigénicos en alimentos.
3. Defina micotoxina.
4. ¿Qué peligros a la salud puede ocasionar el consumo de micotoxinas en los alimentos?
5. Mencione al menos tres micotoxinas producidas por hongos en alimentos y especifique para cada caso en cuáles productos alimenticios se pueden encontrar.
6. Escriba el nombre de la Norma Oficial Mexicana utilizada para la realización del recuento de estos microorganismos:
7. ¿Cuál es el nombre y el fundamento de la técnica utilizada?
8. ¿Existe alguna especificación microbiológica de hongos y micotoxinas en alguna Norma Oficial Mexicana para alimentos? Mencione el nombre de la norma que lo contiene y el límite máximo permisible.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE

Criterios de evaluación

Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc.

Se evaluarán los siguientes aspectos:

Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y

	puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#!/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales en productos cárnicos o marinos cocidos, lácteos o productos varios
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Investigar la calidad microbiológica de productos cárnicos o marinos cocidos, lácteos o productos varios con base a las Normas Oficiales Mexicanas, mediante el recuento de coliformes totales, determinando el Número Más Probable de coliformes totales y fecales y diagnosticando si son aptos para su consumo humano mediante la aplicación de medidas de prevención y control higiénico durante su elaboración

FUNDAMENTO TEÓRICO

La denominación genérica de coliformes, designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de calidad y de contaminación del agua y los alimentos. Sus criterios de identificación son: producción de gas a partir de la glucosa (y de otros azúcares) y fermentación de la lactosa con producción de ácido y gas cuando se incuban 48 horas a 35°C. El grupo de estos coliformes totales comprende especies de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter* y en él se incluye a *Escherichia coli*. Ya que la mayoría de los coliformes totales se encuentran en el medio ambiente, su significado higiénico directo es muy escaso; sin embargo, al destruirse fácilmente con el calor, sirven para establecer las contaminaciones posteriores al termoprocesado, por lo que son buenos indicadores de calidad. Los coliformes fecales son un grupo de microorganismos en que *Escherichia coli* organismo de origen fecal, representa una elevada proporción. Para distinguir a los coliformes fecales de los demás, se ideó la prueba de su nombre ("prueba de coliformes fecales"). Se definen como tales los coliformes que cultivados en medio EC a 45.5°C (salvo en los aislamientos de mariscos, 44.5°C) fermentan la lactosa con producción de gas en 24 horas. Este es un importante indicador de contaminación y su presencia en diferentes alimentos se usa principalmente en aquellos listos para consumirse que pueden haber sido sujetos a contaminación fecal en el manejo posterior a un tratamiento térmico. La carne y el pescado pueden adquirir una gran variedad de microorganismos durante la matanza/eviscerado hasta el procesamiento final, siendo *E. coli* uno de los principales que pueden estar contaminándolos. Si el tratamiento térmico de estos productos es deficiente, el alimento final puede estar bastante contaminado con coliformes fecales. En la carne de vacuno, sin duda uno de los patógenos emergentes que ha cobrado gran importancia durante los últimos 30 años es *E. coli* O157:H7, una cepa patógena de este microorganismo de origen fecal. Existe riesgo también de que los productos marinos estén contaminados con cepas patógenas de *E. coli* si la pesca de los mismos se realiza cerca de las costas o de los estuarios contaminados con aguas negras.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS

Por grupo (primera sesión):

- Balanza con sensibilidad de 0.1 g
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Baño de agua con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 44.5 ± 1 °C
- Aluminio o papel estraza

Cinta para etiquetar Bactericida o sanitizante Papel o toallas desechables para secar	
Por equipo (primera sesión): • Por equipo (primera sesión): • Una muestra de alimento cárnico cocido y/o marino cocido para analizar. • 6 cajas Petri estériles • 1 matraz con 120 mL de Agar Bilis Rojo Violeta estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente • 1 botella de dilución con 90 mL de solución buffer de fosfatos estéril • 4 tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril • 9 tubos de dilución con tapón de rosca con 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa estériles con campana de Durham • 1 gradilla • 5 pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • 1 pipeta de 5 mL con tapón de algodón estéril • 1 pipeta de 10 mL con tapón de algodón estéril • 1 vaso de licuadora estéril y motor de licuadora o bolsa estéril para homogeneizar • 1 espátula • 4 mecheros Meker-Fisher, o en su defecto 1 Meker-Fisher y 3 mecheros Bunsen • 1 auxiliador de pipeteo o perilla	Por grupo (24 y 48 h): • Cuenta colonias Quebec o equivalente • Registrador mecánico o electrónico • Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C • Baño de agua con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 44.5 ± 1 °C • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar Por equipo (48 h): • Por cada tubo positivo de prueba presuntiva: 1 tubo con 10 mL de caldo EC con campana de Durham estéril y 1 tubo con 10 mL de Caldo Bilis Verde Brillante con campana de Durham estéril. (Número máximo de tubos a utilizar por equipo: 9 tubos con Caldo Bilis Verde Brillante y 9 tubos con Caldo EC).

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

El muestreo y transporte del alimento se realizará en base a la NOM-109-SSA1-1994 y la preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994:

Preparación de dilución primaria:

1. Colocar la muestra del alimento por analizar en un vaso de licuadora estéril. Operar de 1 a 2 minutos, hasta homogeneizar por completo el alimento. Aún en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2,5 minutos. En condiciones asépticas pesar 10 g de la muestra homogeneizada y adicionar a un volumen de 90 mL del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra, para preparar la dilución 10-1. Evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

2. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
3. Permitir que las partículas grandes se sedimenten, tomar de las capas superiores de la

suspensión 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-2.

4. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar con otra pipeta 1 mL y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución buffer estéril para preparar la dilución 10-3. Repetir este paso hasta preparar la dilución 10-5.

Realizar inoculación por la técnica de vaciado en placa:

5. Para el recuento de coliformes totales en caja Petri se empleará el método de vaciado en placa, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994:
6. En condiciones asépticas y con diferentes pipetas, colocar 1 mL de cada dilución de 10-1 a 10-5 e inocular en cajas Petri estériles separadas.
7. Depositar en cada placa de 15 a 20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir una caja sin inóculo con agar como testigo de esterilidad.
8. Homogeneizar el inóculo en el agar con movimientos suaves, 6 de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.
9. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar por 24 ± 2 °C.

Realizar inoculación en tubos de fermentación múltiple.

El Número Más Probable de coliformes totales y fecales se determina en base al procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 y la NOM-210-SSA1-2014.

10. Prueba presuntiva: Se realiza la inoculación por triplicado de 1 mL de las diluciones de 10-1 a 10-3 en tubos con 10 mL de caldo lauril sulfato triptosa, previamente estériles y con campana de fermentación. Para cada una de las diluciones se utilizan pipetas diferentes. Se mezcla suavemente el inóculo con el medio y posteriormente se incuban los tubos a 35 ± 2 °C por 24 horas, prolongando la incubación hasta 48 horas si no se observan tubos positivos. Se considera positiva la prueba si hay formación de gas en la campana y turbidez en el tubo.
11. Prueba confirmativa: De cada tubo positivo de la prueba presuntiva, para la confirmación de coliformes totales tomar dos asadas y sembrar en 10 mL de caldo bilis verde brillante estéril con campana; también de cada muestra positiva para confirmación de coliformes fecales tomar dos asadas y sembrar en 10 mL de caldo EC estéril y con campana. Inocular los tubos con caldo de confirmación para coliformes totales a 35 ± 2 °C por 24 a 48 horas y los tubos para coliformes fecales a 44.5 °C en baño de agua por 24 horas. Se consideran positivos los tubos que presentan formación de gas en la campana de fermentación y turbidez.

Recuento de colonias y obtención de resultado en placa:

12. Realizar el recuento de todas las colonias típicas de coliformes a las 24 h de incubación para determinar la Cuenta Total Viable (CTV). Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.
13. Seleccionar las placas que se encuentren entre un intervalo de 15 a 150 colonias.
14. Obtener el resultado multiplicando por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por gramo de la muestra.
15. Reportar el resultado como UFC/g de microorganismos coliformes totales en Agar Bilis Rojo Violeta, incubadas 24 h a 35 ± 2 °C.

Obtención de resultados en tubos de fermentación múltiple:

16. Los resultados tanto para el caso de los coliformes totales como los fecales, se expresan según la serie de tubos que resultaron positivos en las pruebas confirmativas, buscando el NMP en las tablas correspondientes (cuando se inoculan 3 tubos conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento con 1 mL de cada una de las diluciones de 10-1 a 10-3, siendo la concentración del caldo sencilla) (Ver Tabla 1 en Anexos).

17. El resultado se expresa en Número Más Probable por gramo (NMP/g) de coliformes totales en caldo bilis verde brillante, incubados 24 h a 35 ± 2 °C y en Número Más Probable por gramo (NMP/g) de coliformes fecales en caldo EC, incubados 24 h a 44.5 °C.

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. Defina y dé las características generales de los coliformes totales y fecales.
2. ¿Qué tipo de indicador microbiológico son cada uno de ellos? ¿Cuál es su importancia como indicadores sanitarios?
3. ¿Qué indica la presencia de coliformes totales en una muestra de alimento?
4. ¿Qué indica la presencia de coliformes fecales en un alimento?
5. ¿En qué parte del proceso pueden la carne y un producto marino contaminarse con coliformes?
6. Escriba el nombre de las Normas Oficiales Mexicanas utilizada para la realización del recuento de estos microorganismos en placa y para la determinación del Número Más Probable:
7. ¿Cuál es el nombre y el fundamento de las técnicas utilizadas?
8. ¿Cuál es el fundamento de diferenciación en los medios empleados en la práctica y cómo es el desarrollo típico de los coliformes en cada uno de ellos?
9. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método del Número Más Probable frente al método de cuenta total estándar (Cuenta Total Viable)?
10. ¿Cuáles son los posibles errores que se podrían cometer en los métodos de cuenta estándar y en el método del Número Más Probable, que podrían afectar en su precisión?
11. ¿Existe alguna especificación microbiológica de coliformes totales y fecales en alguna Norma Oficial Mexicana para la carne y productos marinos cocinados? Mencione el nombre de la norma que los contiene y los límites máximos permisibles.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE

Criterios de evaluación

Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc.
Se evaluarán los siguientes aspectos:
Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza

	durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/Reportedepracticadelaboratorio.pdf

NOMBRE DE LA PRÁCTICA	Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales en aguas y bebidas no alcohólicas para consumo humano
COMPETENCIA DE LA PRÁCTICA	Investigar la calidad microbiológica de agua y bebidas no alcohólicas con base a las Normas Oficiales Mexicanas, mediante el recuento de coliformes totales y la determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales, diagnosticando si son aptos para su consumo humano y si es necesario mediante medidas de prevención y control higiénico durante su elaboración.

FUNDAMENTO TEÓRICO

La denominación genérica de coliformes totales designa a un grupo de especies bacterianas que tienen ciertas características bioquímicas en común e importancia relevante como indicadores de contaminación del agua y los alimentos. Mientras que la presencia de unos pocos microorganismos no patógenos en el agua y bebidas puede ser tolerable, la presencia de organismos indicadores específicos puede indicar que están contaminadas con patógenos. Estos organismos indicadores están generalmente asociados con el tracto intestinal; su presencia indica contaminación fecal en la fuente de esa agua o condiciones no higiénicas de preparación de las bebidas. Los microorganismos más ampliamente empleados como indicadores de este tipo son los coliformes fecales, ya que se encuentran en gran número en el tracto intestinal de humanos y animales.

MATERIALES, EQUIPAMIENTO Y/O REACTIVOS

Por grupo (primera sesión):

Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
 Baño de agua con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 44.5 ± 1 °C
 Aluminio o papel estraza
 Cinta para etiquetar
 Bactericida o sanitizante
 Papel o toallas desechables para secar

Por equipo (primera sesión):

- Una muestra de agua o bebida no alcohólica para analizar
- 1 botella o recipiente de 500 mL estéril para la toma de la muestra (si es necesario)
- 6 cajas Petri estériles
- 1 matraz con 120 mL de Agar Bilis Rojo Violeta estériles, fundidos y mantenidos a temperatura ambiente
- 4 tubos de dilución con tapón de rosca con 9 mL de solución buffer de fosfatos estéril o con 9 mL de agua destilada estéril
- 5 tubos de dilución con tapón de rosca con

- 4 mecheros Meker-Fisher, o en su defecto 1 Meker-Fisher y 3 mecheros Bunsen
- 1 auxiliador de pipeteo o perilla

Por grupo (24 y 48 h):

- Por grupo (24 y 48 h):
- Cuenta colonias Quebec o equivalente
- Registrador mecánico o electrónico
- Incubadora con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas de termómetro calibrado a 35 ± 2 °C
- Baño de agua con termostato que evite variaciones mayores de 1 °C, provistas

10 mL de caldo lactosa a doble concentración estériles con campana de Durham • 2 tubos de dilución con tapón de rosca con 10 mL de caldo lactosado sencillo estériles con campana de Durham • 1 gradilla • 5 pipetas de 1 mL con tapón de algodón estériles • 3 pipetas de 5 mL con tapón de algodón estériles • 3 pipetas de 10 mL con tapón de algodón estériles	de termómetro calibrado a $44.5 \pm 1^\circ\text{C}$ • Aluminio o papel estraza • Cinta para etiquetar Por equipo (48 h): • Por cada tubo positivo de prueba presuntiva: 1 tubo con 10 mL de caldo EC con campana de Durham estéril y 1 tubo con 10 mL de Caldo Bilis Verde Brillante con campana de Durham estéril. (Número máximo de tubos a utilizar por equipo: 7 tubos con Caldo Bilis Verde Brillante y 7 tubos con Caldo EC).
---	--

PROCEDIMIENTO O METODOLOGÍA

La preparación de todas las diluciones se hará en base a la NOM-110-SSA1-1994:

Preparación de dilución primaria:

1. Agitar la muestra vigorosamente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos y tomar 10 mL de la muestra y diluir en 90 mL del diluyente (solución buffer de fosfatos para bebidas y agua destilada estéril para agua). El diluyente debe encontrarse a una temperatura similar a ésta; evitar el contacto entre la pipeta y el diluyente.

Preparación de diluciones decimales adicionales:

2. Agitar la dilución preparada manualmente con 25 movimientos de arriba abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo no mayor a 7 segundos.
3. Tomar 1 mL de la muestra homogeneizada y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución diluyente estéril para preparar la dilución 10-2.
4. Agitar la dilución 10-2 manualmente con 25 movimientos de arriba abajo, tomar 1 mL con otra pipeta y transferirlo a un tubo conteniendo 9 mL de solución diluyente estéril para preparar la dilución 10-3; realizar hasta esta dilución para el caso del análisis de agua. Repetir este paso hasta preparar la dilución 10-5 para el análisis de las bebidas.

Realizar inoculación por la técnica de vaciado en placa:

5. Para el recuento de coliformes totales en caja Petri se empleará el método de vaciado en placa, según el procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994:
6. En condiciones asépticas colocar 1 mL de la muestra directa y de cada dilución (de 10-1 a 10-3 o de 10-1 a 10-5) e inocular en cajas Petri estériles separadas.
7. Depositar en cada placa de 15 a 20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta fundido y esterilizado, conservado a una temperatura soportable. Incluir una caja sin inóculo con agar como testigo de esterilidad.
8. Homogeneizar el inóculo en el agar con movimientos suaves, 6 de derecha a izquierda, 6 en sentido de las manecillas del reloj, 6 en sentido contrario y 6 de atrás hacia adelante.
9. Dejar solidificar, invertir las placas e incubar por $24 \text{ a } 35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Realizar inoculación en tubos de fermentación múltiple

El Número Más Probable de coliformes totales y fecales se determina en base al procedimiento descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994 y la NOM-210-SSA1-2014.

10. Prueba presuntiva: Inocular cinco tubos con 10 mL de caldo lactosado a doble concentración cada uno con 10 mL de la muestra original. Los tubos deberán estar previamente estériles y con campana de fermentación. Inocular también otros dos tubos que contengan 10 mL de caldo

lactosado sencillo con 1 mL y 0.1 mL de la muestra original, respectivamente. Mezclar suavemente el inóculo con el medio y posteriormente incubar los tubos a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, prolongando la incubación hasta 48 horas si no se observaban tubos positivos. Considerar positiva la prueba si hay formación de gas en la campana y se observa turbidez en el tubo.

11. Prueba confirmativa: De cada tubo positivo de la prueba presuntiva, para la confirmación de coliformes totales tomar dos asadas y sembrar en 10 mL de caldo bilis verde brillante estéril con campana; también de cada muestra positiva para confirmación de coliformes fecales tomar dos asadas y sembrar en 10 mL de caldo EC estéril y con campana. Inocular los tubos con caldo de confirmación para coliformes totales a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 a 48 horas y los tubos para coliformes fecales a $44,5^\circ\text{C}$ en baño de agua por 24 horas. Se consideran positivos los tubos que presentan formación de gas en la campana de fermentación y turbidez.

Recuento de colonias y obtención de resultado en placa:

12. Realizar el recuento de todas las colonias típicas de coliformes a las 24 h de incubación para determinar la Cuenta Total Viable (CTV). Las colonias típicas son de color rojo oscuro, generalmente se encuentran rodeadas de un halo de precipitación debido a las sales biliares, el cual es de color rojo claro o rosa, la morfología colonial es semejante a lentes biconvexos con un diámetro de 0.5 a 2.0 mm.
13. Seleccionar las placas que se encuentren entre un intervalo de 15 a 150 colonias.
14. Obtener el resultado multiplicando por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por gramo de la muestra.
15. Reportar el resultado como UFC/g de microorganismos coliformes totales en Agar Bilis Rojo Violeta, incubadas 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Obtención de resultados en tubos de fermentación múltiple:

16. Los resultados tanto para el caso de los coliformes totales como los fecales, se expresan según la serie de tubos que resultaron positivos en las pruebas confirmativas, buscando el NMP en las tablas correspondientes (cuando se inoculan 5 tubos conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento a doble concentración con 10 mL de la muestra, y dos tubos conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento siendo la concentración del caldo sencilla inoculados con 1 y 0.1 mL de la muestra) (Ver Tabla 2 en Anexos).
17. El resultado se expresa en Número Más Probable por 100 mL (NMP/100 mL) de coliformes totales en caldo bilis verde brillante, incubados 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ y en Número Más Probable 100 mL (NMP/100 mL) de coliformes fecales en caldo EC, incubados 24 h a 44.5°C .

RESULTADOS ESPERADOS

Parámetros para evaluar o datos a recolectar

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Preguntas o guías para la interpretación de los datos.

CONCLUSIONES Y REFLEXIONES

Relación con la teoría y aplicación en el campo profesional

ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS

CUESTIONARIO

1. ¿Qué indica la presencia de coliformes totales en una muestra de agua o bebida no alcohólica?
2. ¿Y qué indica la presencia de coliformes fecales en una muestra del mismo tipo?
3. ¿En qué parte del proceso de preparación pudo una bebida contaminarse con coliformes?
4. ¿Existe alguna especificación microbiológica de coliformes totales y fecales en alguna Norma Oficial Mexicana para el agua y las bebidas? Mencione el nombre de la norma que lo contiene y el límite máximo permisible.

EVALUACIÓN Y EVIDENCIAS DE APRENDIZAJE	
Criterios de evaluación	Para reportar: Anotar observaciones y todos los resultados obtenidos de la práctica. Incluir comentarios, dibujos de lo observado, tablas, etc. Se evaluarán los siguientes aspectos: Imagen personal, bitácora con investigación previa, uso de elementos indicados al inicio del semestre como bata, cofia, cubre bocas, etc., limpieza durante la realización de la práctica, organización del trabajo en equipo, cuando aplique: respuesta a cuestionarios o temas previos indicados por el docente, aplicación de las buenas prácticas de laboratorio, de higiene y seguridad, además de la presentación de un reporte por escrito, asistencia y puntualidad, diseño del reporte.
Rúbricas o listas de cotejo para valorar desempeño	https://ues.aya10.mx/course/523/#/student/Rubrics/index
Formatos de reporte de prácticas	chrome-extension://efaidnbmninnibpcapjpcglclefindmkaj/https://www.ues.mx/archivos/alumnos/rubricas/ReportedepRACTICadelaboratorio.pdf

FUENTES DE INFORMACIÓN

Fuentes de información utilizadas para la elaboración del manual. Formato APA 7ma. Edición

1. Adams, M.R. and Moss, M.O. (2008). Food Microbiology. (3rd ed.). UK: RSC Publishing.
2. Andino, F. y Castillo, Y. (2010). Microbiología de los Alimentos: Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. Universidad Nacional de Ingeniería UNINorte. <https://avdiaz.files.wordpress.com/2010/02/documento-microbiologia.pdf>
3. Arispe, I. Y Tapia, M. (2007). Inocuidad y calidad: requisitos indispensables para la protección de la salud de los consumidores. Agroalimentaria, 13(24), 105-117. <https://www.redalyc.org/pdf/1992/199216580008.pdf>
4. Badui Dergal, S. Química de los Alimentos. (3 ed.). México: Pearson Educación.
5. Batt, C.A. and Tortorello, M.-L. (2014). Encyclopedia of Food Microbiology. (2nd ed.). United States: Elsevier.
6. Bibek, R. y Arun, B. (2010). Fundamentos de Microbiología de los Alimentos. (4ta ed.). España: McGraw-Hill.
7. Brooks, G.F.; Carroll, K.C.; Butel, J.S.; Morse, S.A.; Mietzner, T.A. (2011). Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. (25va. ed.) México: McGraw Hill/Lange. Caballero-Torres, A. (2008). Temas de Higiene de los Alimentos. La Habana, Cuba: Editorial Ciencias Médicas.
8. Coultate, T. (1998). Manual de Química y Bioquímica de los Alimentos. (2 ed.). Zaragoza, España: Acribia.
9. FAO. (2009). Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009 - Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios. Base de Datos FAOLEX. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud. <http://www.fao.org/faolex/results/details/es/c/LEX-FAOC093118/>
10. FAO. (2017). Manual para Manipuladores de Alimentos – Alumno. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y Organización Panamericana de la Salud. <http://www.fao.org/3/i7321s/i7321s.pdf>
11. Fernández, E. (1981). Microbiología sanitaria: Agua y alimentos. Vol. 1. México: Ed. Universidad de Guadalajara. FDA. (2012). Bad bug book: Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. (2nd ed.). United States: Food and Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. Ver: <http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>
12. Frazier, W. y Westhoff, D. (1993). Microbiología de los Alimentos. Acribia.
13. Food and Drug Administration, FDA/BAM Bacteriological Analytical Manual Online 2005.
14. Gobierno del Principado de Asturias Manual. (2005). Buenas Prácticas Higiénicas. Ayuda Autocontrol Establecimientos de Comidas Preparadas. https://tematico8.asturias.es/export/sites/default/consumo/seguridadAlimentaria/seguridadalimentaria-documentos/BUENAS_PRxCTICAS_HIGIxCNICAS.pdf
15. González-Alfaro, J. (2004). Laboratorio de Microbiología, Instrumentación y principios básicos. La Habana, Cuba: Ed. Ciencias Médicas.
16. James, M. J. (2007). Microbiología de los Alimentos. España: Acribia.
17. López, Agustín; García Garibay, Mariano; Quintero Ramírez, Rodolfo; López-Munguía Canales, Agustín. 2002. Biotecnología alimentaria. México: Limusa.
18. Manual de procedimientos CCAYAC. MacFaddin. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. (3era. ed.). España: Editorial Panamericana.
19. Morejon, L. y Pardo, E. (2008). Texto de Microbiología 1. Universidad Nacional Agraria. <https://core.ac.uk/download/pdf/35166259.pdf>
20. Ortega, M. y Rodríguez, M. (s.f). Manual de Prácticas del Laboratorio del curso de "BIOLOGÍA

DE HONGOS”.

<http://www.fc.uaslp.mx/informacion-para/materialdidactico/MANUALDELABORATORIOBIOLOGIADEHONGOS.pdf>

21. Pascual Anderson, M. d. (2000). Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas. España: Díaz de Santos.
22. Ramos, A. y Pérez, M (2004) Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general. [https://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL RAMOS MARIA DE LOS ANGELES Manual de practicas de.pdf](https://www.uamenlinea.uam.mx/materiales/licenciatura/diversos/AQUIAHUATL_RAMOS_MARIA_DE_LOS_ANGELES_Manual_de_practicas_de.pdf)
23. Torres-Vitela, Ma. R. (2002). Agentes patógenos transmitidos por alimentos, Vol. I. México: Universidad de Guadalajara.
24. Torres-Vitela, Ma. R. y Castillo-Ayala A. (2006). Microbiología de los alimentos. México: Universidad de Guadalajara.
25. Tortora, Funke y Case. (2007). Introducción a la Microbiología. (9na. ed.). México: Editorial Médica Panamericana.

NORMAS TÉCNICAS APLICABLES

1. COFEPRIS. (2015). Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas. Ver: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/Normas-Oficiales-Mexicanas.aspx>.
2. COFEPRIS. (2015). Catálogo de Normas Oficiales Mexicanas, Métodos de Prueba. Ver: <http://www.cofepris.gob.mx/MJ/Paginas/NormasPorTema/Metodos-de-prueba.aspx>
3. Norma Oficial Mexicana NOM-065-SSA1-1993, Que establece las especificaciones sanitarias de los medios de cultivo. Generalidades.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Cuenta de bacterias aerobias en placa.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-093-SSA1-1994, Bienes y servicios. Prácticas de higiene y Sanidad en la Preparación de Alimentos que se Ofrecen en Establecimientos Fijos.
6. Norma Oficial Mexicana, NOM-109-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Procedimientos para la Toma, Manejo y. Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.
8. Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Cuenta de mohos y levaduras en alimentos.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del Número Más Probable.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de Salmonella en alimentos.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios, Método para la determinación de Staphylococcus aureus en alimentos.
13. Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 Modificada, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
14. Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometido a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
15. Norma Oficial Mexicana NOM-159-SSA1-1996, Bienes y servicios. Huevo, sus productos y derivados. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
16. Norma Oficial Mexicana NOM-181-SCFI-2010, Yogurt-Denominación, especificaciones fisicoquímicas y microbiológicas, información comercial y métodos de prueba.
17. Norma Oficial Mexicana NOM-194-SSA1-2004, Productos y servicios. Especificaciones sanitarias en los establecimientos dedicados al sacrificio y faenado de animales para abasto, almacenamiento, transporte y expendio. Especificaciones sanitarias de productos.
18. Norma Oficial Mexicana NOM-201-SSA1-2002, Productos y servicios. Agua y hielo para consumo humano, envasados y a granel. Especificaciones sanitarias.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
20. Norma Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002,, Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
21. Norma Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo.

22. Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba.
23. Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
24. Norma Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Métodos de prueba.
25. Norma Oficial Mexicana NOM-251-SSA1-2009. Prácticas de higiene para el proceso de alimentos, bebidas o suplementos alimenticios.
26. Norma Mexicana NMX-F-703-COFOCALEC-2004, Sistema Producto Leche-Alimentos-Lácteos-Leche y Producto Lácteo (o Alimento Lácteo)-Fermentado o Acidificado-Denominaciones, Especificaciones y Métodos de Prueba.





ANEXOS

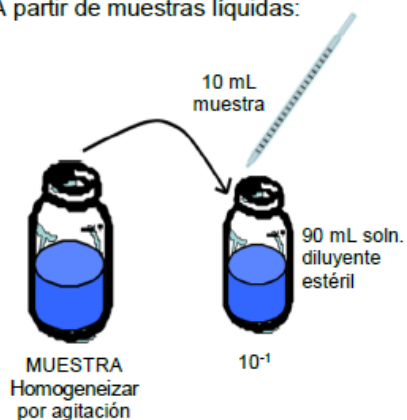
ANEXO No 1

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Preparación de diluciones decimales de alimentos, agua y bebidas”

Preparación de la dilución primaria:

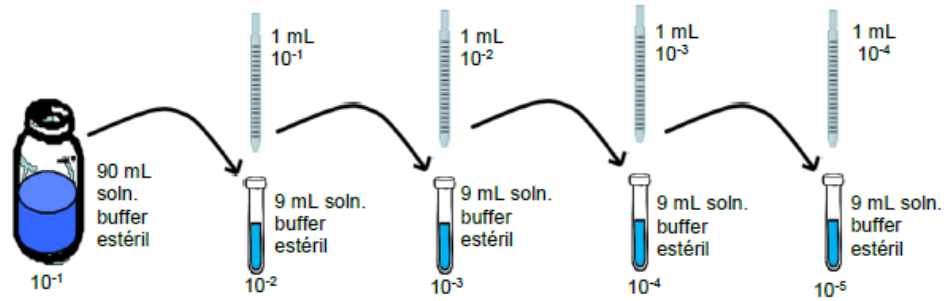
a) A partir de muestras líquidas:



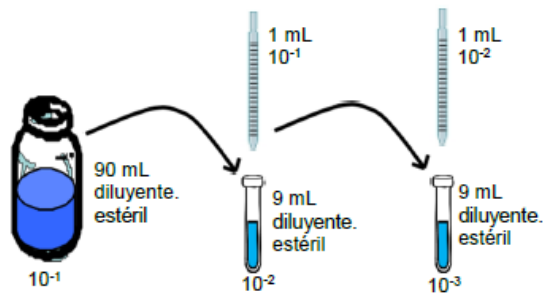
b) A partir de muestras sólidas o semisólidas:



Preparación de las diluciones decimales adicionales para alimentos y bebidas:



Preparación de las diluciones decimales adicionales para agua:



ANEXO No 2

MÉTODO DE PREPARACIÓN

“Preparación de solución buffer de fosfatos para realizar análisis microbiológicos de alimentos y bebidas”

Ingredientes y Cantidades:

Fosfato de sodio monobásico 34,0 g

Agua 1,0 L

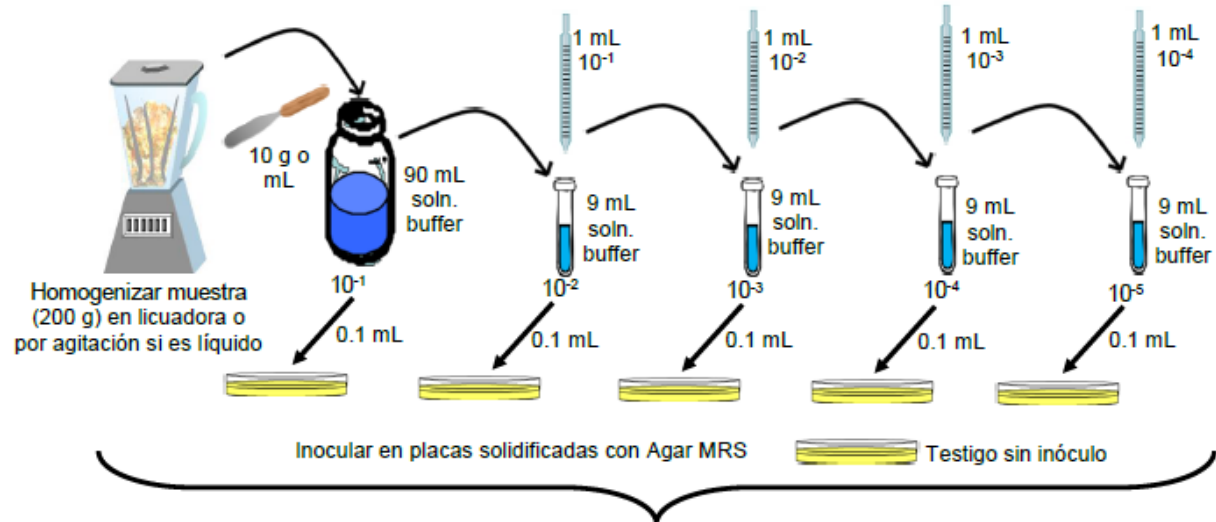
Preparación:

- 1.- Disolver el fosfato en 500 mL de agua y ajustar el pH a 7,2 con Hidróxido de sodio 1 N.
- 2.- Llevar a 1,0 L de agua.
- 3.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Conservar en refrigeración (Solución madre o solución concentrada).
- 4.- Tomar 1,25 mL de la solución concentrada y llevar a 1,0 L con agua (Solución de trabajo).
- 5.- Distribuir en porciones de 90 y 9 mL según se requiera.
- 6.- Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO No 3

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Recuento de bacterias lácticas de un alimento”



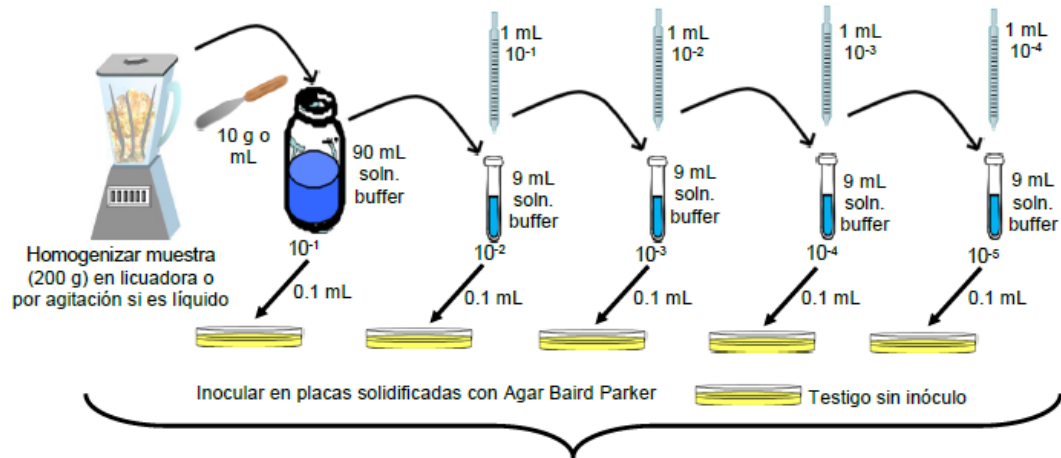
Distribuir el inóculo con varillas de vidrio acodadas (por extensión en superficie).

Incubar a 30 ± 1 °C de 24 a 48 h. Contar las colonias presuntivas: cremosas amarillentas o grisáceas, redondas y de aproximadamente 1 mm de diámetro. Seleccionar 5 colonias y hacer tinción de Gram (+), prueba de catalasa (-) y oxidasa (-). Reportar como UFC de bacterias lácticas/g o mL de alimento, obteniendo el resultado de la proporción de las colonias que fueron confirmadas, a partir del total de colonias presuntivas contadas en las placas.

ANEXO No 4

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva en alimentos”

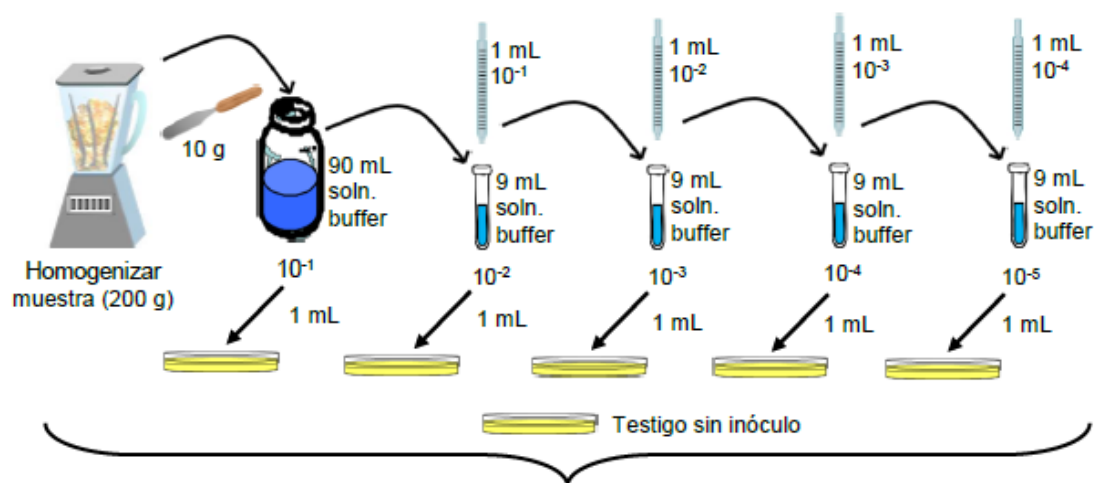


Distribuir el inóculo con varillas de vidrio acodadas (por extensión en superficie).
Incubar a 35 ± 2 °C de 24 a 48 h. Realizar el recuento de colonias típicas, confirmar por pruebas bioquímicas (incluir coagulasa) y obtener resultado. Reportar como UFC de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva/g o mL de alimento, obteniendo el resultado de la proporción de las colonias que fueron confirmadas, a partir del total de colonias presuntivas contadas en las placas.

ANEXO No 5

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Recuento de microorganismos mesófilos aerobios en un alimento cocido”



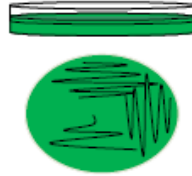
Agregar 15-20 mL de Agar Estándar Métodos.
Homogeneizar, dejar solidificar e incubar a 35 ± 2 °C de 24 a 48 horas.
Reportar como UFC/g de microorganismos mesófilos aerobios o de bacterias aerobias mesófilas en placa.

ANEXO No 6

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en moluscos bivalvos”





Agar TCBS (Tiosulfato-Citrato-Sales Biliares-Sacarosa)



Incubar de 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.



Seleccionar las colonias típicas de cada especie de *Vibrio* del medio selectivo en que se sembró.
Colonias típicas en de *Vibrio cholerae* en Agar TCBS: Amarillas, convexas/ligeramente achatadas, 2-3 mm de diámetro, con viraje de color del medio de verde a amarillo. Colonias típicas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en Agar TCBS: grandes, lisas y verdes.



A partir de una colonia bien aislada llevar a cabo la identificación de las colonias típicas por medio de pruebas bioquímicas con 2 % de NaCl.

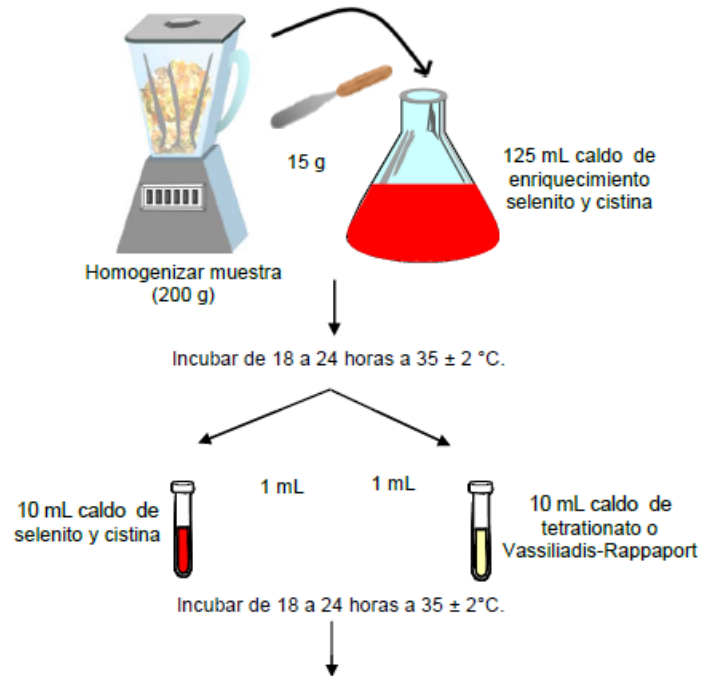


Comparar resultados con los reportados para *Vibrio* spp. en bibliografía. Reportar ausencia o presencia de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en 25 g o mL de alimento.

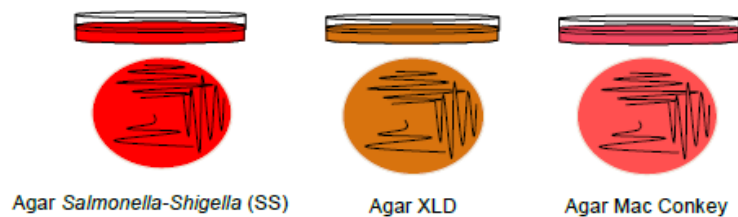
ANEXO No 7

DIGRAMA DE PRÁCTICA

“Aislamiento e identificación de *Salmonella* spp. en aves y/o huevo”



De cada tubo inocular por estrías por agotamiento en cajas con:



Incubar de 18 a 24 horas a 35 ± 2 °C.

Seleccionar las colonias típicas de *Salmonella* de los medios selectivos en que se sembró.
Colonias típicas en Agar SS y Mac Conkey: Transparentes y pueden o no, presentar punto negro.
En Agar XLD: las colonias son rosas o rojas transparentes con o sin centro negro

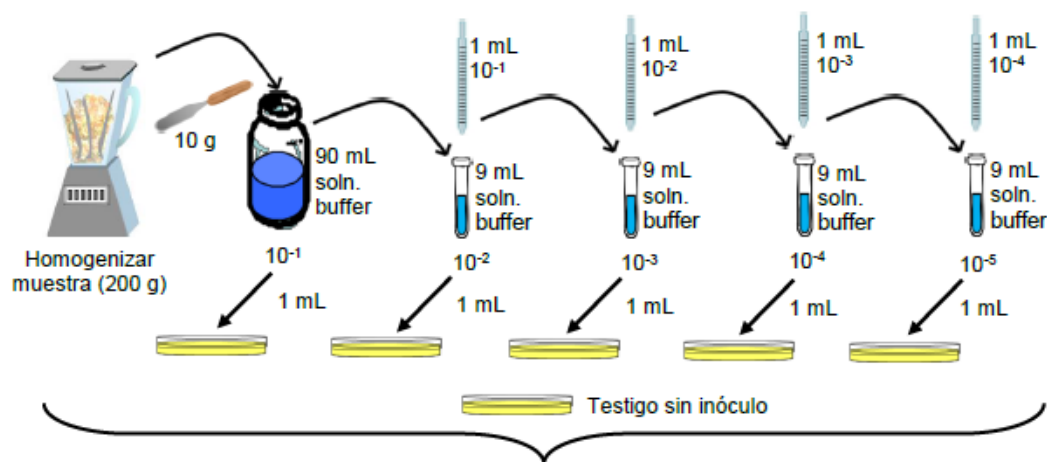
A partir de una colonia bien aislada y llevar a cabo la identificación por medio de pruebas bioquímicas.

Comparar resultados con los reportados para *Salmonella* en bibliografía. Reportar ausencia o presencia de *Salmonella* spp. en 15 g o mL de alimento.

ANEXO No 8

DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Recuento de hongos en alimentos”



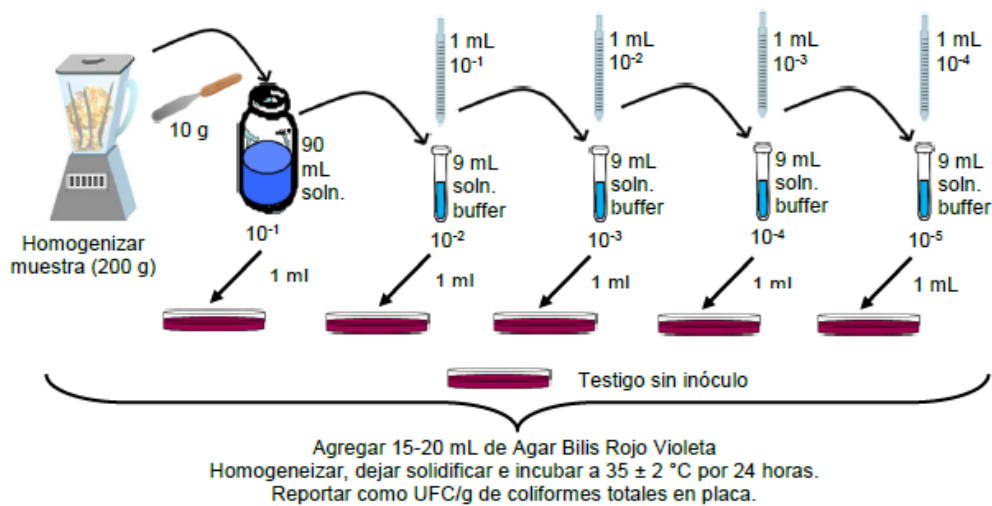
Agregar 15-20 mL de Agar Dextrosa Papa (acidificado con 1.4 mL de ácido tartárico por cada 100 mL de medio)
Homogeneizar, dejar solidificar e incubar a 25 ± 5 °C por 5 días.
Reportar como UFC/g de hongos en placa.

ANEXO No 9

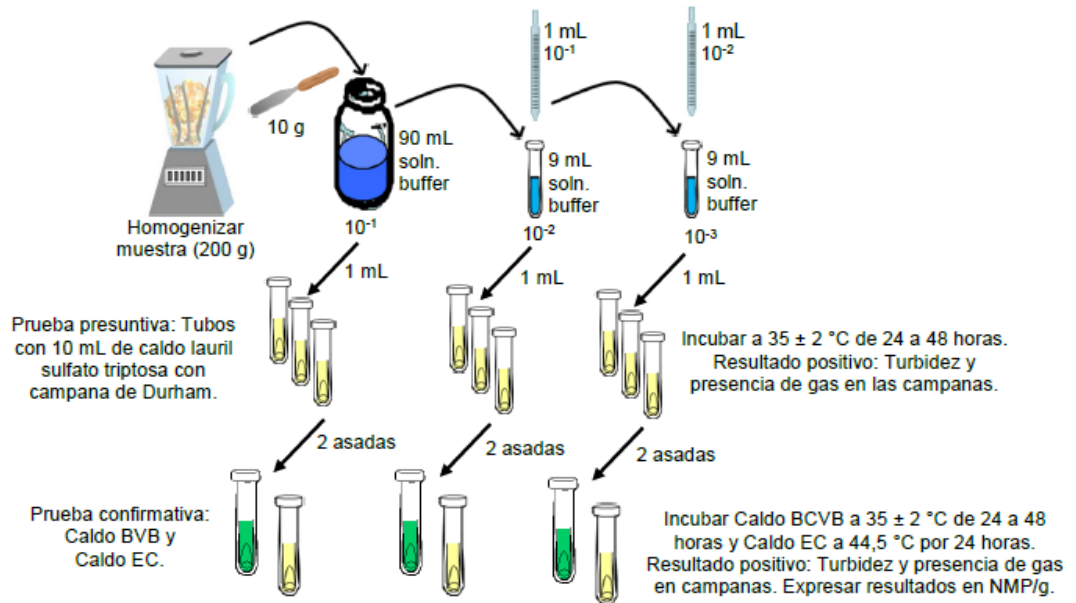
DIAGRAMA DE PRÁCTICA

“Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales en alimentos”

Recuento de coliformes totales en placa:



Determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales:



ANEXO No 10

TABLA 1

“Determinación del Número Más Probable (NMP) para coliformes totales y fecales en alimentos”

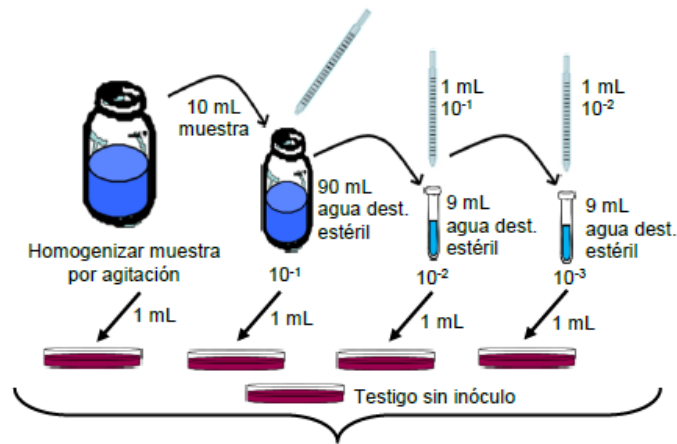
Cuando se inoculan 3 tubos conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento con 1 mL de cada una de las diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} , siendo la concentración del caldo sencilla:

Combinación de tubos positivos			NMP/g o mL de muestra	Límites de confianza al 99%		Límites de confianza al 95%	
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}		Inferior	Superior	Inferior	Superior
0	1	0	3.0	<1.0	23.0	<1.0	17.0
1	0	0	4.0	<1.0	28.0	1.0	21.0
1	0	1	7.0	1.0	35.0	2.0	27.0
1	1	0	7.0	1.0	36.0	2.0	28.0
1	2	0	11.0	2.0	44.0	4.0	35.0
2	0	0	9.0	1.0	50.0	2.0	38.0
2	0	1	14.0	3.0	62.0	5.0	48.0
2	1	0	15.0	3.0	65.0	5.0	50.0
2	1	1	20.0	5.0	80.0	8.0	61.0
2	2	0	21.0	5.0	80.0	8.0	63.0
3	0	0	23.0	4.0	177.0	7.0	129.0
3	0	1	40.0	10.0	230.0	10.0	180.0
3	1	0	40.0	10.0	290.0	20.0	210.0
3	1	1	70.0	20.0	370.0	20.0	280.0
3	2	0	90.0	20.0	520.0	30.0	390.0
3	2	1	150.0	30.0	660.0	50.0	510.0
3	2	2	200.0	50.0	820.0	80.0	640.0
3	3	0	200.0	100.0	1,900.0	100.0	1,400.0
3	3	1	500.0	100.0	3,200.0	200.0	2,400.0
3	3	2	1,100.0	200.0	6,400.0	300.0	4,800.0

Fuente: Fernández, 1981

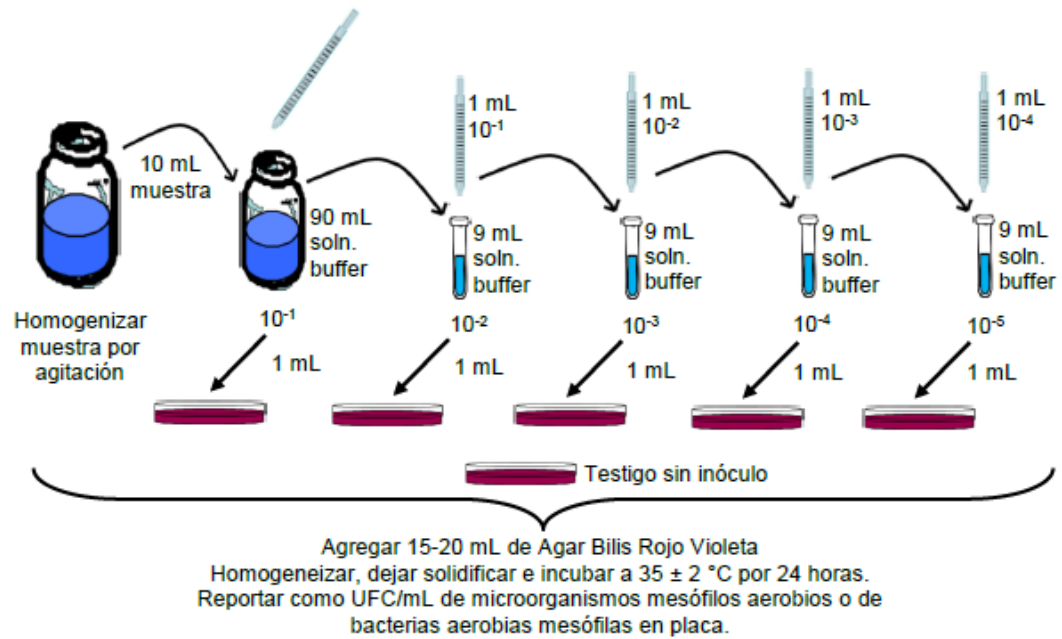
ANEXO No 11
DIAGRAMA DE PRÁCTICA
“Recuento de microorganismos coliformes totales en placa y
determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales
en agua y bebidas”

Recuento de coliformes totales en placa en agua:

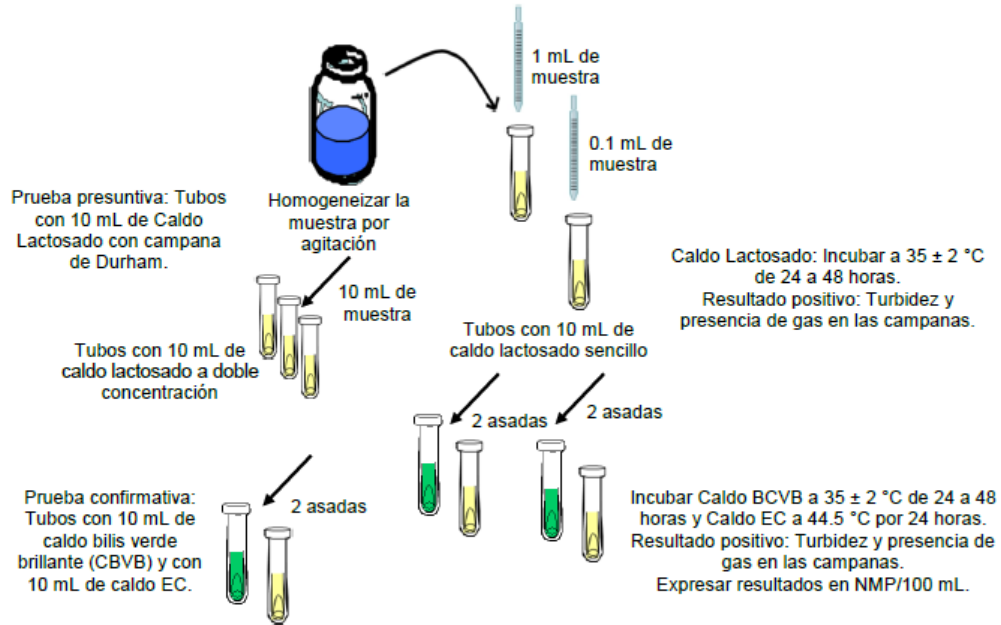


Agregar 15-20 mL de Agar Bilis Rojo Violeta
Homogeneizar, dejar solidificar e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas.
Reportar como UFC/mL de microorganismos mesófilos aerobios o de bacterias aerobias mesófilas en placa.

Análisis a muestra de bebida no alcohólica:



Determinación del Número Más Probable de coliformes totales y fecales en agua y bebidas:



ANEXO No 12

TABLA 2

“Determinación del Número Más Probable (NMP) para coliformes totales y fecales en agua y bebidas”

Cuando se inoculan 5 tubos conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento a doble concentración con 10 mL de la muestra, un tubo con 10 mL de caldo de enriquecimiento sencillo con 1 mL y otro tubo con 10 mL de caldo de enriquecimiento sencillo con 0.1 mL de muestra:

Combinación de tubos positivos			NMP/100 mL de muestra	Límites de confianza al 99%		Límites de confianza al 95%	
				Inferior	Superior	Inferior	Superior
0	1	0	2.0	<1.0	15.0	<1.0	11.0
1	0	0	2.0	<1.0	17.0	<1.0	12.0
1	1	0	4.0	1.0	21.0	1.0	16.0
2	0	0	5.0	1.0	24.0	1.0	19.0
2	1	0	8.0	1.0	30.0	2.0	23.0
3	0	0	9.0	2.0	36.0	3.0	28.0
3	0	1	12.0	3.0	43.0	5.0	34.0
3	1	0	12.0	3.0	44.0	6.0	35.0
4	0	0	15.0	4.0	64.0	6.0	49.0
4	0	1	20.0	6.0	77.0	8.0	60.0
4	1	0	21.0	6.0	80.0	9.0	62.0
5	0	0	40.0	10.0	500.0	20.0	360.0
5	0	1	100.0	20.0	720.0	30.0	540.0
5	1	0	200.0	<100.0	5400.0	100.0	3800.0
5	1	1	>200.0				

Fuente: Fernández, 1981



UES

Universidad Estatal de Sonora
La Fuerza del Saber Estimulará mi Espíritu