



UNAM
CUAUTILÁN

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA)

DIRECCIÓN DE APOYO A LA DOCENCIA
PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS PARA INNOVAR Y MEJORAR LA EDUCACIÓN (PAPIME)

Técnicas Microbiológicas para la identificación de bacterias y hongos en leche y productos lácteos de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010



CLAVE DEL PROYECTO: PE2002120



UNAM
CUAUTILÁN



Autores

Dra. Rocío Angélica Ruiz Romero

Laboratorio de Enseñanza e Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Rumiantes, FMVZ UNAM.

Dra. Sara Esther Valdés Martínez

Laboratorio de Tecnología de Calidad en Alimentos, FES Cuautitlán

Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares¹

Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ UNAM.

MVZ. M.C. Verónica Montes de Oca Basilio

Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ UNAM.

Escuela de Ciencias de la Salud, licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia,

Universidad del Valle de México (UVM) Campus Coyoacán.

MVZ M.C. Sofía Méndez Rivera

Laboratorio de Micología, Departamento de Microbiología e Inmunología, FMVZ UNAM.

Escuela de Ciencias de la Salud, licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia,

Universidad del Valle de México (UVM) Campus Coyoacán.

I.A. María de los Ángeles Ruiz Ortiz

Laboratorio de Tecnología de Calidad en Alimentos, FES Cuautitlán.

Diseño gráfico

Lic. Dipl. Cert. Edgar Alva Castillo

Corrección de estilo

Libni Jared Hernández Armenta

Diseño editorial y de portada

Myriam Vera Aguilar

Diseño de esquemas

Karen Alexia Martínez Araujo – Estudiante de la licenciatura de Ingeniería en Alimentos, FES Cuautitlán

Edición y musicalización de videos

pMVZ Luis Enrique Sánchez Ibarra – FMVZ UNAM

Agradecimiento especial

MVZ M. en C. Salvador Eduardo Acevedo Monroy – FMVZ UNAM

Catalogación en la publicación UNAM.

Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales de Información.

Nombres: Ruiz Romero, Rocío Angélica, autor. | Valdés Martínez, Sara Esther, autor. | Cervantes Olivares, Roberto Arnulfo, 1952- , autor. | Montes de Oca Basilio, Verónica, autor. | Méndez Rivera, Sofía, autor. | Ruiz Ortiz, María de los Ángeles, autor.

Título: Técnicas microbiológicas para la identificación de bacterias y hongos en leche y productos lácteos de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010 / autores Rocío Angélica Ruiz Romero, Sara Esther Valdés Martínez, Roberto Arnulfo Cervantes Olivares, Verónica Montes de Oca Basilio, Sofía Méndez Rivera, María de los Ángeles Ruiz Ortiz.

Descripción: Primera edición. | México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 2024. | "Universidad Nacional Autónoma de México. Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA). Dirección de Apoyo a la Docencia. Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME). Clave del Proyecto: PE2002120"

Identificadores: LIBRUNAM 2234440 (libro electrónico) | ISBN 9786073088039 (libro electrónico).

Temas: Leche -- Microbiología. | Productos lácteos -- Microbiología. | Bacteriología -- Técnica. | Bacterias -- Identificación. | Hongos -- Identificación.

Clasificación: LCC QR121 (libro electrónico) | DDC 579.35—dc23

***Técnicas Microbiológicas
para la identificación de bacterias y hongos
en leche y productos lácteos de acuerdo
con la NOM-243-SSA1-2010***

ISBN 978-607-30-8803-9



Universidad Nacional Autónoma de México

Primera edición, 7 de marzo de 2024

© D.R. Universidad Nacional Autónoma de México

Ciudad Universitaria, 04510, Ciudad de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Comité Editorial

Km 2.5 carretera Cuautitlán-Teoloyucan,

San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, 54714, Estado de México

Hecho en México.

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Prólogo

La leche y los productos lácteos poseen nutrientes muy favorables para la reproducción de infinidad de hongos y bacterias. La glándula mamaria de las vacas en producción es vulnerable a ser invadida por diversos agentes microbianos. Cuando esto ocurre se generan infecciones que causan severos daños a la glándula, con la consecuente disminución de la producción láctea, lo que llega a representar importantes pérdidas económicas. Muchos de los microorganismos patógenos que afectan a la glándula mamaria logran sobrevivir, durante el procesamiento de la leche, para elaborar quesos y otros productos lácteos; algunos de ellos son capaces de causar enfermedad a las personas que consumen la leche y sus derivados, lo que representa un importante riesgo para la salud pública.

La prevención y el control de las infecciones causadas por hongos y bacterias en la glándula mamaria de las vacas, requiere de la participación de laboratorios de bacteriología y micología, cuyo personal esté adecuadamente capacitado en el manejo de las técnicas utilizadas, para el cultivo e identificación de los hongos o las bacterias responsables de causar el padecimiento.

Paradójicamente los hongos y las bacterias han jugado un relevante papel en beneficio de la salud animal, y la salud pública. Desde aquel 22 de septiembre de 1928, cuando Alexander Fleming observó en una de sus cajas de cultivo bacteriano la presencia de un hongo, que inhibió el crecimiento bacteriano a su alrededor. Lo aisló y lo identificó con el nombre de *Penicilium notatum*. *Después de experimentar con distintos cultivos, comprendió que en el moho existía algún compuesto que resultaba letal para los gérmenes, pero inofensivo para las células sanas.* Fleming había descubierto lo que él mismo denominó penicilina. Gracias a este hallazgo se han salvado millones de vidas de seres humano y animales. Desde entonces se generaron numerosos antibióticos, que también han sido de gran utilidad para combatir infecciones bacterianas. Desafortunadamente el uso inadecuado de estos compuestos antimicrobianos representa, en la actualidad, un serio problema pues se han generado mutaciones en numerosas especies de bacterias patógenas, que las hacen resistentes a la mayoría de los productos antimicrobianos.

Es importante destacar que una de las causas que propician el problema de la resistencia a los antimicrobianos, radica en el hecho de que estos son frecuentemente administrados, tanto en animales como en humanos, sin que se haya realizado un previo estudio de laboratorio que permita la identificación, caracterización, y pruebas de sensibilidad a los antibióticos, del microorganismo causante de la infección que se pretende combatir. En ocasiones, cuando se llevan a cabo estudios de laboratorio, éstos son realizados por personal que no recibió la capacitación técnica adecuada, para realizar con éxito esta tarea.

En este libro, los autores describen de forma didáctica, con excelentes ilustraciones, con sólido sustento técnico, científico y normativo, de manera objetiva y de fácil comprensión, las técnicas de laboratorio microbiológico para la identificación de las bacterias y los hongos, presentes en leche y derivados de la misma. En los diferentes capítulos, se aporta información relevante sobre temas como esterilización y desinfección, así como la descripción de las características estructurales, requerimientos nutritivos y metabolismo de los hongos y bacterias, métodos recomendados para su cultivo e identificación.

De lo anterior, se deriva la importancia que tiene el trabajo de los autores de cada uno de diferentes capítulos de esta obra, a fin de brindar en términos accesibles a los estudiosos de la microbiología y de la biología en general, información relevante sobre las técnicas de laboratorio de micología y bacteriología.

Este libro es producto de la iniciativa y la creatividad del Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares†, considerado el mejor micólogo Veterinario en México.

Hago publico mi reconocimiento a las Doctoras Sara Esther Valdés Martínez y Rocío Angélica Ruiz Romero, responsable y corresponsable de este material, respectivamente, así como a todos los que participaron en la realización de esta obra, por el hecho de haberla dedicado a la memoria del Dr. Roberto Arnulfo Cervantes Olivares†.

Dr. Ricardo Flores Castro

Tabla de contenidos

	Página
Capítulo 1. Métodos de esterilización en el laboratorio	8
Capítulo 2. Cultivo de bacterias y hongos <i>in vitro</i>	23
Capítulo 3. Método de referencia para la estimación de la cuenta de <i>Staphylococcus aureus</i> de acuerdo con el apéndice B normativo de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos	45
Capítulo 4. Método de referencia para el aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> de acuerdo con el apéndice C normativo de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos	61
Capítulo 5. Método de referencia para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. De acuerdo con el apéndice A normativo: método de referencia para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos	79
Capítulo 6. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimento de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos	98
Capítulo 7. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa	122
Capítulo 8. Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y <i>E. coli</i> por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua, de acuerdo con el apéndice H normativo de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos	136

Capítulo 1

Métodos de esterilización en el laboratorio



Kantakat, S. (s.f.). *Autoclave sterilizing machine for dental tools to clean. class B/ high quality* [Fotografía]. Shutterstock. <https://www.shutterstock.com/es/image-photo/autoclave-sterilizing-machine-dental-tools-clean-1518042260>

Introducción

La esterilización es el proceso de eliminación completa de microorganismos viables de un objeto, medio de cultivo y/o superficies. La esterilización se obtiene cuando los microorganismos se someten a condiciones extremas que garantizan su destrucción; a los agentes antimicrobianos durante un tiempo suficiente¹.

Existen diferentes formas de esterilizar objetos, medios y superficies; a continuación, se describen algunos métodos brevemente.

I. Métodos físicos de esterilización

1. Calor

La aplicación de temperatura para la destrucción de microorganismos es uno de los métodos de esterilización más eficaces y es ampliamente utilizado, donde la actividad bactericida resulta de la destrucción de enzimas y otros constituyentes celulares esenciales, el calor se puede aplicar de diversas formas¹:

1.1 Calor seco

La esterilización en seco es el proceso de eliminación de microorganismos mediante la aplicación de calor sin humedad, apropiado para sustancias sensibles a la humedad. El proceso de esterilización por calor seco se basa en el principio de conducción; es decir, el calor es absorbido por la superficie exterior de un artículo y luego pasa a la siguiente capa. Al final, todo el artículo alcanza la temperatura adecuada necesaria para lograr la esterilización^{1, 2}.

El calor seco sin humedad destruye los microorganismos al provocar la desnaturalización de las proteínas. El calor seco provoca daños oxidativos por radicales libres, provoca el secado de las células e incluso puede quemarlas llevándolas hasta convertirse en cenizas, como en la incineración^{1, 2}.

A diferencia del calor seco, el daño hidrolítico que resulta de la exposición al vapor en la esterilización por calor húmedo, resulta ser más efectivo^{1, 2}.

1.1.1 Flameado

El flameado, es una esterilización en seco que implica la exposición de objetos metálicos y/o de vidrio a la llama durante algún tiempo, donde la llama quema los microorganismos y otros polvos presentes en el instrumento. En el caso del flameado, el material a esterilizar (navajas de bisturíes, varillas de vidrio, espátulas de vidrio, etc.) se sumerge en alcohol antes de quemarlo en una llama de gas, este proceso no garantiza la esterilidad y no es tan eficaz como la esterilización al rojo vivo¹ (**imagen 1.1**).



Imagen 1.1 Calor seco: flameado

1.1.2 Incineración

La incineración es un proceso de esterilización que adicionalmente provoca una reducción significativa en el volumen de los desechos. Por lo general, se lleva a cabo como medida de disposición final en hospitales, laboratorios (medios de cultivo crecidos, algodón, gasas y cajas Petri desechables). Los residuos se calientan hasta que se convierten en cenizas que luego se eliminan, este proceso se lleva a cabo en un dispositivo llamado incinerador. La NOM-ECOL-098-2000 indica que la incineración debe alcanzar por lo menos los 850 °C alcanzados en o cerca de la pared interna de la cámara de combustión final, durante un tiempo mínimo de por lo menos dos segundos³.

1.1.3 Aire caliente

El horno de aire caliente es un método de esterilización por calor seco que permite la esterilización de objetos que no pueden esterilizarse con calor húmedo, utiliza el principio de conducción en el que el calor primero es absorbido por la superficie externa y luego por conducción, pasa a la capa interna².

Este proceso se realiza en una cámara denominada horno Pasteur, la cual es comparable con un horno doméstico. En este proceso debe alcanzarse una temperatura mínima de 160 °C y hasta 180 °C durante 1.5 a 3 horas por lo menos. El aire caliente debe circular para que cada objeto a esterilizar alcance la temperatura deseada y destruya a todos los microorganismos tanto esporulados como no esporulados. El horno Pasteur es ampliamente utilizado para esterilización de material de cristalería y material de cirugía, no es recomendable para sustancias líquidas, algodón, telas y plásticos, ya que estos materiales tienden a deteriorarse por deshidratación e incluso pueden carbonizarse² (**imagen 1.2**).



Imagen 1.2 Calor seco: aire caliente (horno Pasteur)

1.2 Calor húmedo

La esterilización por calor húmedo es uno de los métodos de esterilización más efectivos donde el vapor a presión y la temperatura actúan como un agente bactericida. En este método, los microorganismos se destruyen mediante la

coagulación de sus proteínas, este método es mucho más efectivo que la esterilización por calor seco, donde los microbios o microorganismos se eliminan por oxidación⁴.

1.2.1 Ebullición

Sencillo y práctico, aunque no totalmente seguro, las formas vegetativas de la mayoría de los microorganismos mueren por aplicación de temperaturas de 90 – 100 °C durante 10 a 15 minutos. Las bacterias esporuladas requieren de mayor tiempo de exposición, aproximadamente 121 °C de 15 a 20 minutos. La ebullición puede utilizarse como alternativa para esterilizar material de cristalería, instrumental de cirugía, jeringas, recipientes, etc⁴.

1.2.2 Pasteurización

Existen tres tipos de procesos bien diferenciados:

a. Pasteurización VAT, lenta o *Low Temperature, Long Time (LTLT)*, baja temperatura, largo tiempo.

En el caso de VAT, es el primer proceso que se descubrió y se encuentra prácticamente en desuso, el procedimiento involucra el calentamiento del alimento líquido hasta los 63 °C durante 30 minutos para luego enfriarlo en el mismo recipiente. Una vez enfriado (a veces en periodos de más de 24 horas) el alimento se envasa asépticamente, para que no se produzcan contaminaciones, este tratamiento reduce la carga de microorganismos y destruye microorganismos patógenos, pero no esteriliza^{1, 2}.

b. Pasteurización HTST (*High Temperature, Short time*), a altas temperaturas durante un breve período.

En el proceso HTST, el más utilizado, el líquido se calienta a una temperatura de entre 71 y 89 °C durante 15 segundos. Esta tipología permite trabajar con grandes volúmenes, es muy rápido y precisa de poco equipamiento, por lo que fue un proceso de pasteurización de amplio uso a nivel industrial.

Se puede trabajar con proceso *batch* (lote), donde el líquido se calienta en un recipiente estanco o autoclave industrial, o en flujo continuo, donde el alimento circula entre dos placas de metal o de forma tubular, también denominadas PHE (*plate heat exchanger*) o intercambiadores de calor^{1, 2}.

c. Proceso UHT (*Ultra-High Temperature*), a altas temperaturas.

Por último, el UHT, también conocido como ultrapasteurización, es un proceso de flujo continuo donde el líquido se somete a 150 °C durante 2 segundos y se enfría después a temperatura ambiente, este calentamiento rápido produce una degradación mínima del alimento. Las condiciones de trabajo conducen a una esterilización comercial en la actualidad, es el proceso más empleado a nivel industrial para ultrapasteurizar leches fluidas y muchos otros productos alimenticios^{1, 2}.

1.2.3 Vapor a presión

La esterilización por calor húmedo por encima de 100 °C implica la esterilización por vapor a presión. El agua, generalmente hierve a 100 °C bajo presión atmosférica normal (760 mm de Hg); sin embargo, el punto de ebullición del agua aumenta si se aumenta la presión, este principio se emplea en un autoclave donde el agua hierve a 121 °C a una presión de 15 psi o 775 mm de Hg⁴.

Un autoclave es un dispositivo que funciona según el principio de esterilización por calor húmedo mediante la generación de vapor a presión. En este método, los microorganismos se destruyen mediante la coagulación de sus proteínas, y este método es mucho más efectivo que la esterilización por calor seco, ya que el vapor a presión tiene un mayor poder de penetración; cuando este vapor entra en contacto con la superficie, mata a los microbios al emitir calor latente. El líquido condensado asegura la muerte húmeda de los microbios⁴.

Las autoclaves se utilizan para la esterilización de instrumentos contaminados junto con diferentes medios de cultivo, proceso conocido como inactivación, ya que aseguran una esterilidad completa (**imagen 1.3**).



Imagen 1.3 Calor húmedo: vapor a presión

2. Filtración

El proceso de filtración es único entre las técnicas de esterilización, ya que evita la presencia de microorganismos en un medio, en lugar de destruirlos; además, es capaz de evitar el paso de partículas tanto viables como no viables y, por tanto, puede utilizarse tanto para la clarificación como para la esterilización de líquidos y gases⁴.

2.1 Filtros de profundidad

Estos filtros están elaborados por un material fibroso (papel, asbesto o fibra de vidrio) dispuesto al azar, de manera que dentro de la estructura del filtro se crean vías tortuosas donde pueden quedar retenidos la mayoría de los contaminantes presentes. Entre sus ventajas se encuentran su alta capacidad de retención de partículas sobre su superficie y a través de toda su estructura, que permiten filtrar grandes volúmenes; sin embargo, tienen como desventaja que no presentan un tamaño de poro uniforme y existe la posibilidad de liberación de partículas y microorganismos que hayan crecido dentro del filtro, hacia el material filtrado⁴.

Dadas sus características, los filtros de profundidad se usan principalmente como prefiltros, ya que permiten eliminar las partículas grandes, pero no la eliminación total de los microorganismos^{1, 4}.

2.2 Filtros de superficie

Son filtros elaborados generalmente de acetato de celulosa o nitrato de celulosa y contienen poros de tamaño uniforme, normalmente de 0.8, 0.6, 0.45, 0.2 y 0.1 mm de diámetro. Este tipo de filtro tiene como ventaja que al conocer exactamente el tamaño de poro que presentan, se pueden seleccionar filtros capaces de retener la totalidad de microorganismos presentes en una solución; sin embargo, se saturan rápidamente y la velocidad de filtración a través de ellos es lenta. Para la filtración esterilizante se pueden usar combinaciones de un filtro de profundidad con un filtro de superficie que tenga un tamaño de poro de 0.22 mm. La mayor parte de los filtros de membrana se pueden esterilizar en autoclave y luego se manipulan asépticamente al ensamblar el equipo⁴.

Los filtros de membrana en forma de discos se pueden ensamblar en portafiltros operados por presión para montaje de jeringas y uso en línea o dispositivos de torre de filtración al vacío para filtración de líquido⁴ (**imagen 1.4**).



Imagen 1.4 Filtración: filtros de superficie

3. Radiaciones

La irradiación es el proceso de exponer superficies y objetos a diferentes tipos de radiación para esterilizarlos, para la esterilización se utiliza principalmente radiación electromagnética⁴.

El objetivo principal de estas radiaciones es el ADN microbiano, donde el daño se produce como resultado de la ionización y la producción de radicales libres (radiaciones ionizantes) o la excitación (radiaciones no ionizantes)⁴.

3.1 Radiaciones ionizantes (rayos alfa, beta, gamma y equis)

Los rayos X y los rayos γ son las radiaciones ionizantes más utilizadas para la esterilización, se trata de radiación de alta energía que provoca la ionización de diversas sustancias junto con el agua, la ionización da como resultado la formación de un gran número de metabolitos de O_2 tóxicos como el radical hidroxilo, el ion superóxido y el H_2O_2 a través de la ionización del agua, estos metabolitos son agentes altamente oxidantes y matan a los microorganismos oxidando varios componentes celulares⁴.

Con la radiación ionizante, la resistencia microbiana disminuye a medida que aumenta la presencia de humedad u oxígeno disuelto (como resultado de una mayor producción de radicales libres) y también con temperaturas elevadas. La esterilización por radiación generalmente se expone a los artículos en estado seco que incluyen instrumentos quirúrgicos, suturas, prótesis, ungüentos de dosis unitaria, jeringas de plástico y productos farmacéuticos secos⁴.

3.2 Radiaciones no ionizantes

a. Radiaciones infrarrojas

La radiación infrarroja (IR) es un método de esterilización térmica en el que la radiación se absorbe y luego se convierte en energía térmica, para este propósito, se utiliza un túnel que contiene una fuente IR. Los instrumentos y la cristalería por esterilizar se mantienen en una bandeja y luego se pasan a través del túnel en una cinta transportadora, moviéndose a una velocidad controlada, para garantizar el tiempo de estancia de los materiales durante el tiempo necesario para su esterilización. Durante su estancia dentro del túnel, los instrumentos estarán expuestos a la radiación, lo que dará como resultado una temperatura de aproximadamente $180\text{ }^\circ\text{C}$ durante aproximadamente 17 minutos, este tipo de esterilización se aplica para la esterilización común, cuando se esterilizan productos en cantidades importantes y productos envasados como jeringas y catéteres⁴.

b. Radiaciones ultravioleta

La radiación ultravioleta incluye rayos de luz de 150 a 3900 Å, de los cuales 2600 Å tienen el mayor efecto bactericida, las ondas no ionizantes tienen muy poco poder de penetración, por lo que los microorganismos que mueren son los que se encuentran en la superficie⁴.

Tras la exposición, estas ondas son absorbidas por muchos materiales, particularmente los ácidos nucleicos, como resultado, las ondas causan la formación de dímeros de pirimidina que provocan errores en la replicación del ADN y causan la muerte de los microbios o microorganismos por mutación⁴.

II. Métodos químicos de esterilización

1. Desinfección

La desinfección es el procedimiento por el cual se realiza la eliminación de microorganismos por medio de agentes químicos que generalmente no tienen un efecto esterilizante. Algunos desinfectantes pueden tener un efecto esterilizante cuando se usan apropiadamente, tal es el caso del formaldehído, fenol, glutaraldehído, óxido de etileno, peróxido de hidrógeno y ácido peracético².

Hay desinfectantes que debido a que en solución producen poco daño celular, pueden aplicarse sobre superficies corporales (antisépticos) como alcohol etílico, tintura de yodo, cloruro de benzalconio² (**imagen 1.5**).



Imagen 1.5 Desinfectantes Antisépticos

En el cuadro 1 se muestran los mecanismos de acción de los desinfectantes sobre los microorganismos, los grupos químicos funcionales y ejemplos de ellos².

Factores que influyen en la desinfección²

1. Naturaleza y concentración del desinfectante
2. Tiempo de exposición
3. pH
4. Temperatura
5. Naturaleza del organismo
6. Presencia de materia extraña

En el cuadro 1.1 se muestran los mecanismos de acción de los desinfectantes sobre los microorganismos.

Cuadro 1.1 Mecanismos de acción de los desinfectantes sobre los microorganismos²

MECANISMO DE ACCIÓN	GRUPOS QUÍMICOS	EJEMPLOS
Lesión sobre membranas celulares y alteración de la permeabilidad	Detergentes aniónicos	Detergentes aniónicos (sulfonato de alquilbenceno, alquil éter sulfato, alquil sulfato y dodecilsulfato de sodio)
	Detergentes catiónicos	Detergentes catiónicos (cloruro de benzalconio, bromuro de cetrimonio, benzododecinio, cetilpiridinio)
	Ácidos	Ácidos (ácido acético, ácido benzoico, ácido propiónico, ácido butírico, ácido láctico, ácido cítrico)
	Álcalis	Álcalis (hidróxido sódico)
	Alcoholes	Alcoholes (etanol, isopropanol)
Desnaturalización y coagulación de proteínas y enzimas alterando su función	Fenoles	Fenoles (ácido carbólico)
	Iones de metales pesados	Soluciones de cobre, mercurio y plata
	Agentes alquilantes	Formaldehído y óxido de etileno
Desnaturalización y oxidación de proteínas alterando su función	Colorantes	Anilinas: Verde brillante, cristal violeta, violeta de genciana Acridinas: Acriflavina
	Halógenos: Cloro, Yodo, peróxidos	Hipocloritos y yoduros, ácido peracético, peróxido de hidrógeno

III. Métodos de verificación de la esterilización

Existen diferentes métodos para la comprobación de la esterilización, siendo estos una garantía para que los equipos funcionan correctamente y cumplan con su cometido: esterilizar; en otras palabras, tienen el objetivo o permiten realizar el control de la calidad del proceso de esterilización¹.

Para realizar este control existen indicadores o controles físicos, químicos y biológicos, los cuales se describen brevemente a continuación¹.

1. Indicadores o controles físicos

El control de la eficiencia de la esterilización mediante indicadores físicos se lleva a cabo por medio de su colocación en el interior del paquete a esterilizar, con el fin de comprobar la temperatura, el tiempo de esterilización y la presión en un equipo determinado y para lo cual estos indicadores son calibrados a fin de detectar cualquier fallo, mediante la incorporación de termómetros, manómetros, sensores de carga, etc., los cuales son de gran utilidad pero no constituyen un medio eficaz para comprobar la esterilización y para lo cual se hace necesario usar como complemento controles biológicos y demás métodos de control¹ (**imagen 1.6**).



Imagen 1.6 Métodos de verificación de esterilización: manómetro

2. Indicadores o controles químicos

Los indicadores o controles químicos son productos comerciales consistentes en compuestos químicos que cambian de color (indicadores colorimétricos) si se cumple un elemento clave del proceso de esterilización, como por ejemplo la temperatura necesaria.¹

La desventaja de estos es que pueden reaccionar cambiando de color aun cuando no se han dado los parámetros necesarios para obtener la esterilización, lo cual no garantiza que los productos estén estériles, siendo los indicadores químicos diferentes de acuerdo con el proceso de esterilización utilizado (calor seco, húmedo o gas)¹ (**imagen 1.7**).



Imagen 1.7 Métodos de verificación: indicadores o controles químicos

3. Indicadores o controles microbiológicos o biológicos

Los indicadores microbiológicos, son el mejor método para determinar la eficiencia de un proceso de esterilización, están diseñados para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos viables después de la esterilización. Son dispositivos inoculados con esporas de microorganismos especialmente resistentes a los distintos agentes de esterilización, son de presentación variada ya que pueden presentarse en forma de tubos, tiras o ampulas como medios de cultivos incorporados. Una vez que han sido utilizados, se incuban a temperatura de 55 °C en los laboratorios de microbiología¹.

En el **cuadro 1.2** se muestran los distintos controles utilizados en el laboratorio de microbiología para determinar la eficiencia de los procesos de esterilización¹:

Cuadro 1.2 controles para verificar la esterilización

CONTROLES FÍSICOS	CONTROLES QUÍMICOS	CONTROLES MICROBIOLÓGICOS
Termómetros	Cinta testigo	Bacillus stearothermophilus
Barómetros de presión	Tinta termocrómica	Bacillus subtilis
Válvulas		

Resumen

En el laboratorio de microbiología se emplean distintos métodos de esterilización y desinfección, lo más común es el uso de la autoclave para esterilizar material termoestable, en caso de medios de cultivo termolábiles se utiliza la filtración (filtros de superficie). Cuando se trabaja con cultivos se utiliza el flameado y la esterilización al rojo vivo en asas microbiológicas. En el caso de desinfectantes, el cloruro de benzalconio al 10 % y el etanol al 70 % son utilizados para limpiar superficies, por ejemplo, las mesas de trabajo.

Literatura citada

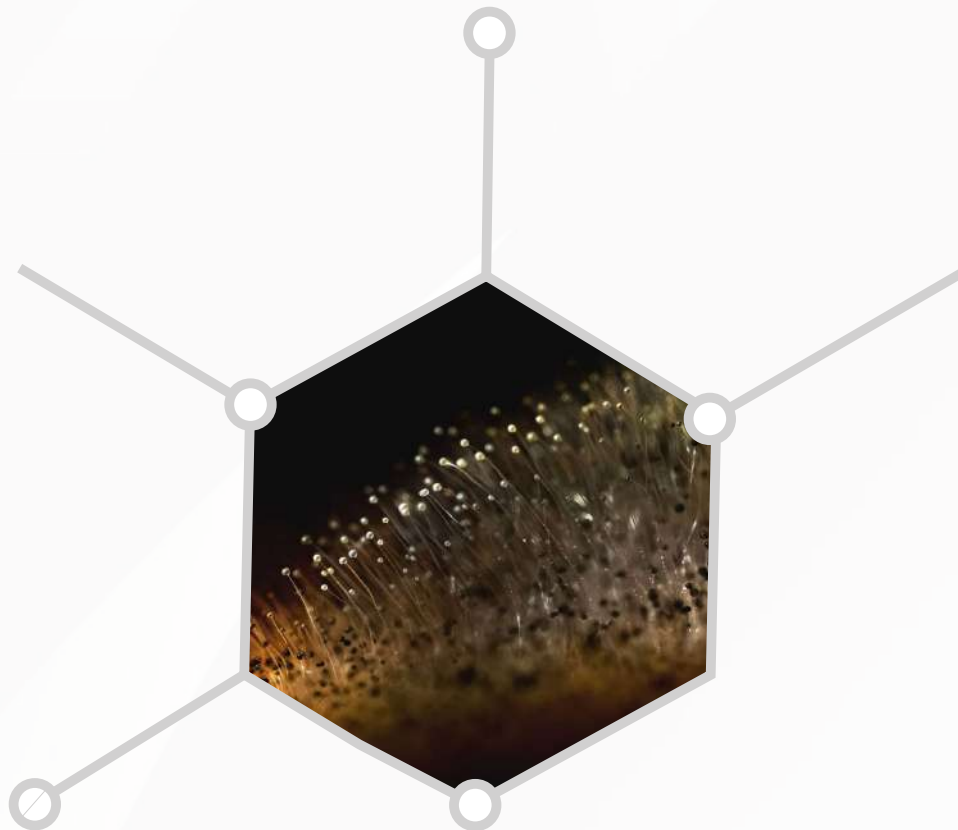
- 1 Murray, P. (1999). Decontamination, Disinfection and Sterilization in P. Murray, *Manual of Clinical Microbiology* (7th ed., pp. 143-157). American Society for Microbiology.
2. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (2014). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. Procedimientos de Control sobre Microorganismos*. Universidad Nacional Autónoma de México.
3. González, G. (2003). *Optimización del proceso de incineración de residuos sólidos municipales* [Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Azcapotzalco]. Repositorio Institucional Universidad Autónoma Metropolitana.
4. World Health Organization. (2019). *The International Pharmacopoeia. Methods of Sterilization*. (9th Ed.). World Health Organization.

A continuación, en el video 1.1, se muestran los distintos métodos de esterilización en el laboratorio.



Capítulo 2

Cultivo de bacterias y hongos *in vitro*



Tasi, Z. (2021). *Gotas de agua en el panel de vidrio* [Fotografía].
Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/gotas-de-agua-en-el-panel-de-vidrio-YIKYquFdVlo>

Introducción

Los microorganismos se clasifican de acuerdo con diferentes características, siendo las más elementales aquellas que son más obvias, por ejemplo, la presencia de membrana nuclear (**eucariotes**) lo que condiciona pertenecer a los reinos animales, vegetal, hongo (eumicota), protozario o cromista. Mientras que si el material genético se encuentra en un nucleóide sin estar contenido por ninguna estructura membranal (**procariones**) se reconoce que el microorganismo pertenece a los reinos arqueobacteria o eubacteria¹.

I. Hongos

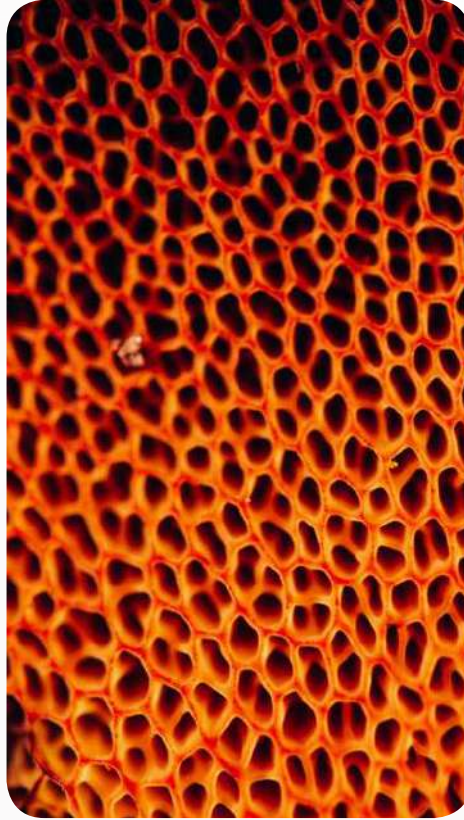
Los hongos forman un reino aparte del reino animal y vegetal en la naturaleza, son **heterótrofos** (carecen de clorofila y por lo tanto deben tomar su alimento del medio que los rodea, no pueden fabricarlo a partir de agua, CO₂ y luz solar como las plantas) también son **multicelulares** (están compuestos por multitud de células, pero no forman órganos y sistemas como los pluricelulares), y son **eucariotes**, lo cual significa que tienen un núcleo delimitado y organelos internos especializados en la obtención de energía, desechos y otras funciones (como ocurre en las células humanas)¹.

De acuerdo con su estructura microscópica se pueden clasificar en 2 grupos: mohos y levaduras².

- a. Mohos. Su cuerpo lo constituye un filamento formado por miles de células ordenadas una tras otra llamado **hifa**. Cuando la hifa llega a un tamaño y volumen visible a simple vista forma una estructura algodonosa llamada **micelio**. Cuando el moho madura aparecen en su parte superior las células reproductivas llamadas **esporas**, normalmente de color oscuro (azul, verde, café o negro), lo que le da el color característico al moho².

Si se observan al microscopio, las esporas pueden encontrarse contenidas en una "bolsa" (se les llama **ascosporas**) o en cuerpos de fructificación. Los cuerpos de fructificación pueden ser cerrados (**esporangios**) o abiertos como "pedestal" (**conidióforos**), por esta razón

las esporas que contienen se llaman esporangiosporas y conidias respectivamente. Las esporas se desprenden fácilmente por acción del viento y cada una puede dar origen a una nueva colonia si se deposita en un sitio con humedad y nutrientes².



Dykes, T. (2019). *Panal Naranja* [Fotografía].
Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/panal-naranja-2ZSyzoTqv-0>

Algunos mohos producen esporas sexuales (**zigosporas**), que resultan de la unión de dos células provenientes de diferentes hifas. Estas especies son comunes en el suelo, pero carecen de importancia en la contaminación de alimentos².

Los mohos se pueden desarrollar sobre cualquier superficie, incluso rocas, requieren poca humedad y pocos nutrientes para sobrevivir. Su hábitat normal es la tierra y llegan a presentarse en seres vivos².

Algunos mohos tienen la capacidad de producir toxinas (llamadas micotoxinas) entre las que se encuentran las **aflatoxinas**, las **fumonisin**as, la **ocratoxina** y la **vomitoxina**, su producción normalmente se da en ambientes secos como las harinas, los granos de cereal y a temperaturas mayores a 15 °C, por lo que en carnes frescas y refrigeradas, lácteos y derivados, frutas y hortalizas no son de importancia².

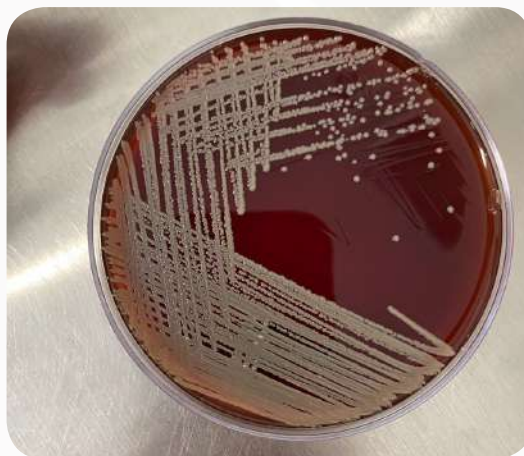
- b. Levaduras. Las levaduras son hongos preferentemente unicelulares, aunque se pueden agrupar ocasionalmente en cadenas cortas². Se reproducen principalmente por gemación: en este proceso una célula genera una yema que eventualmente se separa de la célula madre, esta yema es de menor tamaño al inicio, pero en corto tiempo alcanza la misma talla que su célula madre².

Las levaduras ocasionalmente se pueden reproducir por “fisión binaria” un proceso en el que la célula se divide en dos células idénticas, donde no hay célula madre e hija, pero que es mucho más común en las bacterias². La reproducción es mucho más activa que en los mohos, por lo que participan de manera más importante en la descomposición de todo tipo de alimentos.

Ninguna especie de levadura ha sido nunca involucrada en una intoxicación por alimentos, pero su papel en la descomposición es relevante o en la elaboración de cerveza entre otros productos fermentados².

II. Bacterias

Son el grupo más abundante de microbios o microorganismos presentes en alimentos, incluyendo carnes. Son microbios o microorganismos **unicelulares**, la mayoría **heterótrofos** (no son capaces de utilizar CO₂ como fuente de carbono, por eso requieren de compuestos orgánicos), excepto un grupo pequeño llamado cianobacterias que contienen clorofila y pueden sintetizar su alimento como las plantas verdes; además, son **procariontes**, lo cual significa que no tienen núcleo delimitado ni organelos especializados para sus diversas funciones^{1,3}.



Las bacterias pueden clasificarse por su forma en tres grupos principales:¹

Cocos (forma de esfera)

Bacilos (forma de bastón)

Espirilos (forma de tornillo)

Algunos bacilos presentan organelos para moverse llamados flagelos. En cada especie el número y la distribución de los flagelos es característica¹; otros bacilos presentan esporas como mecanismo de resistencia a las condiciones adversas del medio ambiente, como desecación, temperaturas extremas, falta de alimento, falta (o presencia) de oxígeno, conservadores, antibióticos¹.

En el diagnóstico microbiológico, la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico remitido al laboratorio de diagnóstico constituye el primer paso hacia su identificación (demostración). Esto puede realizarse mediante el examen directo al microscopio de una preparación húmeda, o bien, de un frotis fijo teñido con colorantes específicos³.

Los métodos de tinción ofrecen las siguientes ventajas en la identificación de microorganismos:

1. Proporcionan contraste entre el microorganismo y el medio que le rodea, permitiendo llevar a cabo la diferenciación entre los distintos tipos morfológicos.
2. Permitir el estudio de estructuras propias de la célula bacteriana y micótica³.

La tinción de Gram es aplicada en forma universal como primer paso en la identificación de bacterias y levaduras. Este método divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo con los componentes predominantes de su pared celular^{1,3}.

Al colorear los microorganismos con cristal violeta o violeta de genciana (colorante primario) y añadirles una solución débil de yodo (mordente) estos microorganismos se combinan con algunos componentes de la célula bacteriana y son retenidos por la pared celular^{1,3}. Posteriormente, cuando se tratan con

alcohol acetona (decolorante) la pared de las bacterias sufre una deshidratación que impide la salida del colorante; así, la safranina (colorante de contraste) es incapaz de penetrar en la pared celular. Como consecuencia de este proceso, las bacterias Gram positivas se tiñen de color morado, mientras que las bacterias Gram negativas se tiñen de color rosa o rojo.

En el caso de las levaduras, estas se tiñen de morado, pero es importante resaltar que su afinidad tintorial no está dada por los componentes de la pared celular^{1,3}.

Factores que afectan el crecimiento microbiano

Considerando que en general los microbios o microorganismos no aumentan de tamaño durante su existencia, el término “crecimiento” en realidad se refiere a reproducción, se dice que la población crece cuando se reproduce activamente. Como cualquier ser vivo, la reproducción requiere de condiciones óptimas de humedad, disponibilidad de nutrientes, pH, temperatura y oxígeno, si los microbios o microorganismos cuentan con estas condiciones óptimas pueden reproducirse aceleradamente y descomponer los alimentos o causar una enfermedad^{1,4}.

El tiempo de duplicación (TD), es el tiempo que tarda un microbio o microorganismo en completar una fisión binaria, es decir, en formar dos células a partir de una, en reproducirse.¹ Los TD son dependientes de las condiciones dominantes en el medio, será menor mientras más condiciones requeridas por los microorganismos se cumplan, y viceversa.

El TD en condiciones óptimas es característico de cada especie, va desde 20 minutos para *Escherichia coli*, hasta 15 días en el caso de *Mycobacterium tuberculosis*, causante de la tuberculosis¹.

En la **figura 2.1** se muestra la curva típica de crecimiento bacteriano, con las fases que presenta a lo largo del tiempo.

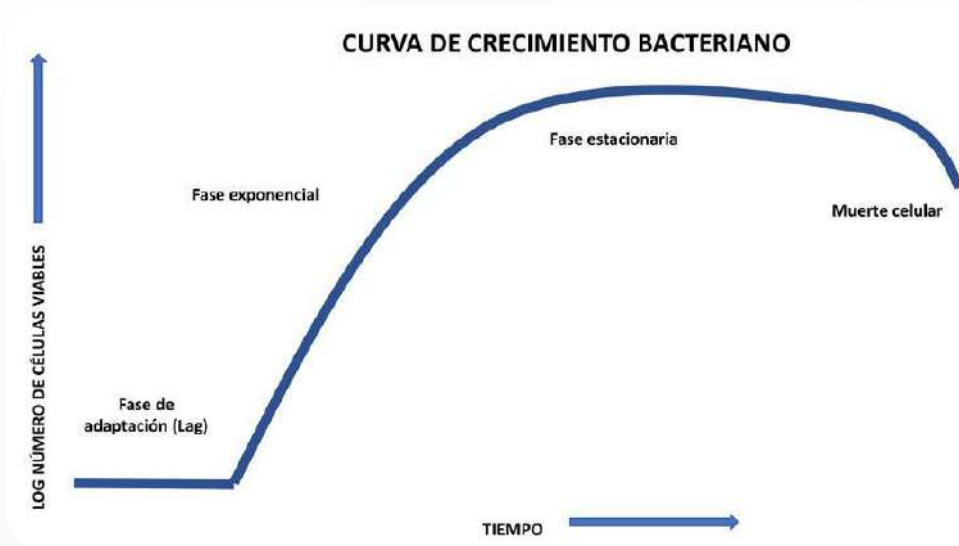


Figura 2.1. Curva de crecimiento bacteriano

Dado que el comportamiento durante el crecimiento bacteriano no es uniforme, es decir, no describe una línea recta siempre en ascenso, en una típica curva de crecimiento se observan cuatro fases, que se conocen como¹:

1. Fase de latencia (lag)
2. Fase exponencial o logarítmica (log)
3. Fase estacionaria
4. Fase de declive o muerte

1. Fase de latencia o Fase lag

Para iniciar un cultivo bacteriano se parte de un pequeño inóculo celular. Cuando este inóculo es introducido en un medio de cultivo fresco completo, es decir, con todos los nutrientes necesarios para crecer a la especie bacteriana dada, inicialmente no se observan cambios en el número de individuos¹.

Se ha demostrado que durante esta fase de "latencia", en la cual no parece haber crecimiento celular, las bacterias acrecientan su tamaño y están metabólicamente muy activas, pues están sintetizando ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, etc¹. La duración de esta fase en el tiempo depende de algunos factores intrínsecos de la población y de algunos factores ambientales, por ejemplo¹:

- Tamaño del inóculo inicial
- Condiciones ambientales previas del inóculo
- Tiempo para sintetizar los elementos necesarios para la división

2. Fase exponencial o logarítmica (log)

Cuando las bacterias están listas para comenzar a dividirse, se observa un aumento exponencial en el número de células por unidad de volumen por unidad de tiempo. Están, entonces, en la fase exponencial o logarítmica de la curva¹.

Durante esta fase se considera que la mayor parte de las bacterias están pasando por eventos de fisión binaria a una velocidad constante y es en esta fase en la que los científicos calculan el tiempo de duplicación¹.

Al igual que todas las fases del crecimiento bacteriano, la fase exponencial o logarítmica y el tiempo de duplicación de una población depende no solo de la especie, sino de que las bacterias en el medio de cultivo encuentren todos los nutrientes necesarios y las condiciones adecuadas para su crecimiento¹.

3. Fase estacionaria

El crecimiento exponencial de las bacterias no es infinito y esto se debe a que el medio de cultivo, que es un sistema de crecimiento cerrado, tarde o temprano se queda sin nutrientes (las bacterias lo consumen todo)¹.

Además de los nutrientes, un aumento en el número de células en un volumen constante (aumento de la concentración celular) es sinónimo también de un aumento en la concentración de metabolitos o productos de desecho que pueden tener efectos inhibitorios en el crecimiento¹.

Un mayor número de células en un espacio finito también implica que eventualmente no habrá suficiente espacio para más células, lo que se traduce en una inhibición del crecimiento¹. En esta fase, llamada fase estacionaria, algunas células continúan dividiéndose, pero otras comienzan a morir a una tasa similar, por lo que la curva se aplana¹.

4. Fase de declive o muerte

Después de la fase estacionaria, que se observa como un plato en la curva de crecimiento, prosigue la fase de muerte o declive, donde las bacterias comienzan a morir y la curva sufre un declive¹. Durante la fase de muerte las bacterias mueren exponencialmente, por lo que se considera una etapa “reversa” que la fase exponencial¹.

Cultivo *in vitro* de bacterias y hongos

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio, con los nutrientes necesarios para ello. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos en medio artificial recibe el nombre de **medio de cultivo** y el crecimiento de los microorganismos en este, es el **cultivo**³⁻⁵.

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes esenciales, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos³.

I. Cultivo *in vitro*

Para realizar el estudio de los microbios o microorganismos, es necesario recuperarlos del hábitat natural donde se encuentran y hacer que proliferen en medios artificiales que les proporcionen sus requerimientos nutricionales, a este procedimiento se le conoce como cultivo *in vitro*⁴. Para que los microbios o microorganismos crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son³:

1. Nutrientes

Un medio de cultivo adecuado para la investigación microbiológica ha de contener, como mínimo⁴:

- Fuentes de energía como glucosa, sulfatos y/o nitratos.

- Fuentes de carbono que también se pueden utilizar como fuentes de energía.
- Fuentes de nitrógeno como amoníaco.
- Otros nutrimentos como azufre, fósforo y sales inorgánicas. En muchos casos serán necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento.

Todas estas sustancias se suministraban originalmente en forma de infusiones de carne, extractos de carne o extractos de levadura. Sin embargo, la preparación de estas sustancias para su aplicación a los medios de cultivo provocaba la pérdida de los factores nutritivos lábiles⁴.

Actualmente, la forma más extendida de aportar estas sustancias a los medios es utilizar peptona que, además, representa una fuente fácilmente asequible de nitrógeno y carbón ya que la mayoría de los microorganismos, que no suelen utilizar directamente las proteínas naturales, tienen capacidad de atacar los aminoácidos y otros compuestos más simples de nitrógeno como se encuentran presentes en la peptona⁴.

Ciertas bacterias tienen necesidades nutritivas específicas por lo que se añade a muchos medios de cultivo, sustancias especiales, entre las que se encuentran suero generalmente de bovino, sangre, líquido ascítico, entre otras. En ocasiones también es necesaria la adición de ciertos carbohidratos como glucosa, y sales minerales como las de calcio, magnesio, manganeso, sodio o potasio, así como sustancias promotoras del crecimiento, generalmente de naturaleza vitamínica como vitaminas del complejo B⁴.

Es común la adición a los medios de cultivo de ciertos colorantes, ya sea como indicadores de ciertas actividades metabólicas o bien, por sus capacidades de ejercer de inhibidores selectivos de ciertos microorganismos⁵.

2. Consistencia del medio

Partiendo de un medio líquido, su consistencia puede ser modificada, añadiendo productos como albúmina, gelatina o agar, con lo que se obtienen medios en estado semisólido o sólido⁴ (**imagen 2.1**).



Imagen 2.1 Medio líquido: caldo nutritivo

Los medios solidificados con gelatina tienen el gran inconveniente de que muchos microorganismos no se desarrollan adecuadamente a temperaturas inferiores al punto de fusión de este solidificante y de que otros tienen la capacidad de licuarla, por lo cual los medios de cultivo con gelatina están en desuso⁴.

Actualmente los medios sólidos son de uso universal, por su versatilidad y comodidad, pero hay también gran cantidad de medios líquidos cuyo uso está ampliamente extendido en el laboratorio⁵ (imagen 2.2).

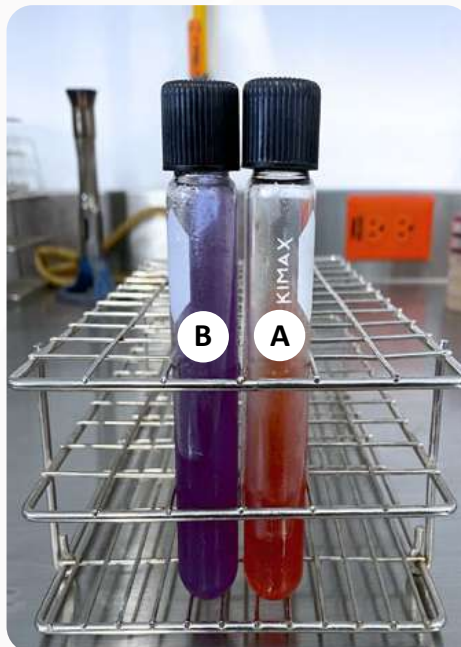


Imagen 2.2 Medio semisólido: triple azúcar hierro A; (TSI) y lisina descarboxilasa (LIA) B

3. Presencia o ausencia de oxígeno

Gran cantidad de bacterias pueden crecer en una atmósfera con tensión de oxígeno normal. Algunas pueden obtener el oxígeno directamente de variados sustratos, pero los microorganismos anaerobios estrictos solo se desarrollarán adecuadamente en una atmósfera sin oxígeno ambiental.

En un punto intermedio, los microorganismos microaerófilos crecen mejor en condiciones atmosféricas parcialmente anaerobias (tensión de oxígeno muy reducida), mientras los anaerobios facultativos tienen un metabolismo capaz de adaptarse a cualquiera de las citadas condiciones. Debido a las necesidades específicas de oxígenos que requieren las bacterias, se clasifican en⁴⁻⁵:

- Anaerobios obligados: crecen en medios bajos de potencial de óxido-reducción.
- Anaerobios facultativos: son capaces de crecer en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.
- Anaerobios aerotolerantes: la condición óptima para su desarrollo es la anaerobiosis, aunque pueden permanecer viables en presencia de O₂.
- Microaerófilas: requieren de baja tensión de oxígeno y de 5-10 % de CO₂.
- Aerobias obligadas: el O₂ es indispensable para su desarrollo.

4. Humedad

El agua, tanto en el medio como en la atmósfera, es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37 °C proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseeque el medio, esto se logra, colocando un recipiente con agua dentro de la incubadora y chequeando que este no se encuentre vacío⁴.

5. Temperatura

Sin lugar a dudas la temperatura es uno de los factores más determinantes en el desarrollo y supervivencia de microorganismos, ejerce dos tipos de efectos opuestos, a medida que la temperatura se eleva, las reacciones químicas y enzimáticas de las células se aceleran, pero si la elevación es muy alta algunas de las proteínas empiezan a sufrir daños irreversibles, así pues, para un buen desarrollo de los microorganismos se requiere que la temperatura se mantenga en un margen adecuado, siendo la temperatura de 18 a 45°C en donde mejor se desarrollan las bacterias patógenas conociendo ese margen como el de los microorganismos mesófilos, la clasificación de los microorganismos de acuerdo a la temperatura óptima de crecimiento es la siguiente^{4,5}:

En el **cuadro 2.1**, se muestra la clasificación de microorganismo de acuerdo con la temperatura óptima de crecimiento:

Cuadro 2.1. Clasificación de los microorganismos de acuerdo con la temperatura óptima de crecimiento⁴

Tipo	Temperatura °C		
	Mínima	Óptima	Máxima
Psicrofílicos	- 10	10 – 15	18 – 20
Psicotrópicos	- 5	20 – 30	35 – 40
Mesofílicos	5 – (-10)	30 – 37	~45
Termofílico	10	42 – 46	~50
Termodúricos	20 – 45	50 – 80	68 – 85

6. pH

Otro factor que afecta el crecimiento y desarrollo de los microorganismos es el pH o potencial hidrógeno que todos conocemos por la escala de acidez a alcalinidad siendo el margen de 0 a 6.9 el rango de acidez, el 7 el punto neutro y de 7.1 a 14 como el rango de alcalinidad^{4,5}.

Al igual que con la temperatura, los microorganismos se distribuyen en rangos de pH siendo el rango cercano al neutro (7.0) donde se concentran la mayor cantidad de microorganismos, que pueden utilizar este ambiente para llevar a cabo sus reacciones enzimáticas, cuando encontramos microorganismos prefieren para sus reacciones un pH ácido como lo hacen la mayoría de los hongos (pH 5.6) o algunas bacterias como los lactobacilos y algunos patógenos que resisten un medio ácido

y se les llama **acidófilos** como es el caso de *Listeria monocytogenes* que es uno de los agentes importantes en la industria alimentaria, por otro lado son muy pocos los microorganismos que pueden utilizar el rango de pH alcalino y son conocidos como **alcalófilos**^{4,5}.

En el **cuadro 2.2**, se muestra la relación de pH, pOH y concentración de iones hidrógeno y iones hidróxido, así como ejemplos de alimentos que poseen los diferentes pH.

Cuadro 2.2. Relación de pH, pOH y concentración de iones hidrógeno y iones hidroxilo^{4,5}

EJEMPLO	pH	CONC. H+	CONC. OH-	pOH
	14	1×10^{-14}	1×10^0	0
NaOH, 0.1M	13	1×10^{-13}	1×10^{-1}	1
Blanqueador casero	12	1×10^{-12}	1×10^{-2}	2
Agua de cal	11	1×10^{-11}	1×10^{-3}	3
Leche de magnesia	10	1×10^{-10}	1×10^{-4}	4
Bórax	9	1×10^{-9}	1×10^{-5}	5
Clara de huevo, agua de mar, sangre humana, lágrimas	8	1×10^{-8}	1×10^{-6}	6
PUNTO NEUTRO	7	1×10^{-7}	1×10^{-7}	7
Lluvia	6	1×10^{-6}	1×10^{-8}	8
Café negro	5	1×10^{-5}	1×10^{-9}	9
Plátanos, tomates	4	1×10^{-4}	1×10^{-10}	10
Vino	3	1×10^{-3}	1×10^{-11}	11
Coca-cola, vinagre	2	1×10^{-2}	1×10^{-12}	12
Jugo de limón	1	1×10^{-1}	1×10^{-13}	13
Jugo gástrico	0	1×10^0	1×10^{-14}	14

Es importante señalar que la mayoría de las reacciones bioquímicas que se utilizan en laboratorio para la identificación de microorganismos se valen del cambio de pH para visualizar la acidificación o alcalinización de los medios de cultivo⁴.

7. Esterilidad del medio

Todos los medios de cultivo, que indiquen en su procedimiento de elaboración, han de estar perfectamente estériles antes de ser empleados para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en un alimento, para evitar la aparición de formas de vida que puedan alterar, enmascarar o incluso impedir el crecimiento microbiano normal del o de los especímenes inoculados en dichos medios. El sistema clásico para esterilizar los medios de cultivo es mediante la aplicación de calor húmedo, lo cual se logra en el laboratorio empleando la autoclave (que utiliza vapor de agua a presión como agente esterilizante). Las condiciones comunes de esterilización son 121 °C/15 minutos /15 psi⁴.

II. Tipos de medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizan de manera rutinaria son^{4,5}:

1. Medios basales
2. Medios enriquecidos
3. Medios selectivos
4. Medios diferenciales
5. Medios de enriquecimiento
6. Medios de transporte

A continuación, se describen brevemente cada uno de estos:

1. Medios basales

Son medios que contienen los ingredientes mínimos indispensables para permitir el desarrollo bacteriano, es decir, una fuente de energía y una fuente de nitrógeno, se utilizan para aquellas bacterias que no son exigentes en su crecimiento, por ejemplo, caldo nutritivo, agar nutritivo y agua peptonada; generalmente se utilizan para conservar cepas bacterianas^{4,5}.

2. Medios enriquecidos

Este tipo de medios son medios basales suplementados con nutrientes específicos que favorecen el crecimiento de cierto

tipo de bacterias como es la adición de sangre, suero, vitaminas, huevo, con lo cual se obtienen medios específicos como: agar sangre, agar Lowenstein-Jensen, caldo sangre, se utilizan para favorecer el crecimiento de bacterias exigentes en su crecimiento^{4,5}.

3. Medios selectivos

Estos medios favorecen el crecimiento de ciertas bacterias al inhibir el crecimiento de bacterias indeseables por poder alterar el crecimiento de los microorganismos que se desea cuantificar, su crecimiento se controla, a través de la adición de inhibidores, generalmente compuestos químicos nocivos, por ejemplo: agar McConkey que contiene cristal violeta, caldo lactosado y bilis verde brillante, en donde la bilis inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas^{4,5} (**imagen 2.3**).



Imagen 2.3 Medio selectivo: agar McConkey A, agar verde brillante B, agar Oxford C, agar Baird-Parker D

4. Medio diferenciales

Estos medios de cultivo son adicionados con sustancias para que solo crezcan cierto tipo de bacterias y estas, al actuar sobre alguna de las sustancias adicionadas, permiten observar macroscópicamente ciertas propiedades de crecimiento que ayudan a diferenciar sus colonias de otras especies de bacterias, por ejemplo: agar *Salmonella-Shigella* que contiene lactosa y un indicador de pH que permite diferenciar las colonias de bacterias fermentadoras de este carbohidrato^{4,5}.

5. Medios de enriquecimiento

Son medios líquidos que favorecen o permiten la multiplicación de las bacterias cuando la muestra obtenida es muy pobre, por ejemplo: caldo tioglicolato que favorece el crecimiento de las bacterias anaeróbicas y caldo tetracionato que favorece el crecimiento de bacterias microaerófilas^{4,5}.

6. Medio de transporte

Son medios utilizados cuando un microorganismo específico no puede ser cultivado inmediatamente, es decir, son capaces de conservar viva una muestra o cepa de microorganismos por un periodo de tiempo prolongado, manteniendo regulada la falta de carbono, nitrógeno y factores de crecimiento orgánico con el fin de evitar la multiplicación microbiana, preservando a los microorganismos vivos sin alterar su concentración y composición, por ejemplo: medio Carry-Blair, medio AMIES, medio Stuart^{4,5} (**imagen 2.4**).

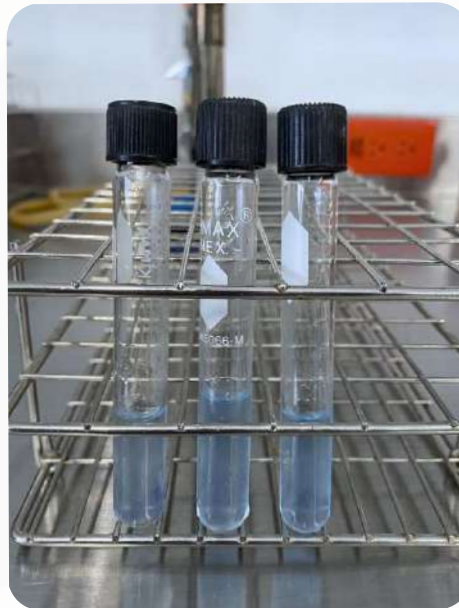


Imagen 2.4 Medios de transporte: medios Stuart

III. Clasificación de los medios de cultivo de acuerdo con su estado físico

1. Líquidos

Son medios que no contienen agar, el cual es el agente solidificante por excelencia, son envasados en tubos, botellas y matraces, se siembra por agitación del asa, por medio de pipetas o depositando una porción de la muestra. El crecimiento bacteriano en este tipo de medios se manifiesta por turbidez, por lo general se le conocen con el nombre de caldos^{4,5}.

2. Semisólidos

Los medios semisólidos, van adicionados de un poco de agar, por lo general contienen del 0.5 al 0.75 % de agar, son envasados en tubos, se siembran con asa recta por picadura. El crecimiento se observa por turbidez en el sitio de inoculación en bacterias inmóviles y turbidez a los lados de la línea de inoculación en bacterias móviles^{4,5}.

3. Medios sólidos y duros

Los medios sólidos contienen 1.5 % de agar y los duros del 3 al 7 % de agar, se envasan en cajas de Petri, botellas o tubos. La utilidad de los medios sólidos es el aislamiento de colonias de bacterias o levaduras, para realizar pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos y guardar cepas bacterianas y micóticas. Los medios duros se utilizan para disminuir el crecimiento invasivo de algunos microorganismos^{4,5}.

La técnica de siembra para estos medios es: cuando se encuentran envasados en cajas de Petri es la de aislamiento en cultivo puro, cuando se envasan en tubo se siembra por estría continua o picadura. Para el cultivo de hongos en caja o tubo, la siembra se realiza con la técnica de punto aislado, para las pruebas de susceptibilidad a quimioterapéuticos se utiliza la técnica de siembra de estría cerrada con hisopo^{4,5}.

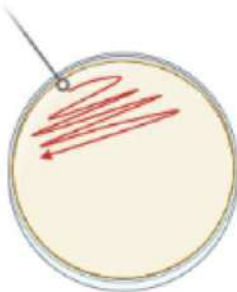
En el **cuadro 2.3**, se muestran los métodos de siembra de cultivos.

Cuadro 2.3. Métodos de siembra de cultivos³

TIPO DE MEDIO DE CULTIVO	MÉTODO DE SIEMBRA
Medios líquidos	Siembra por agitación del asa
Medios semisólidos	Picadura en el centro del agar
Medios sólidos envasados en tubos	Siembra por picadura en el fondo del tubo y en estría
Medios sólidos en caja de Petri	<ol style="list-style-type: none"> 1. Depositar el inóculo en el cuadrante 1. 2. Flamear y enfriar el asa entre cada cuadrante para realizar el aislamiento 3. Asegurarse que exista contacto entre las estrías de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4) 4. En el caso de siembra de muestras se realiza la técnica de primoaislamiento, sembrando en los cuatro cuadrantes sin flamear el asa entre cada uno de ellos.
Medios sólidos en caja de Petri para hongos filamentosos	Siembra por punto aislado con asa en "L"
Pruebas de susceptibilidad en quimioterapéuticos	Siembra en estría cerrada con hisopo

En la **figura 2.2**, se muestra la técnica de sembrado en medios sólidos envasados en caja de Petri.

1. Depositar el inóculo en el cuadrante.



2. Flamear y enfriar el asa entre cada cuadrante para realizar el aislamiento.



Asegurarse que exista contacto entre las estrías de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4).

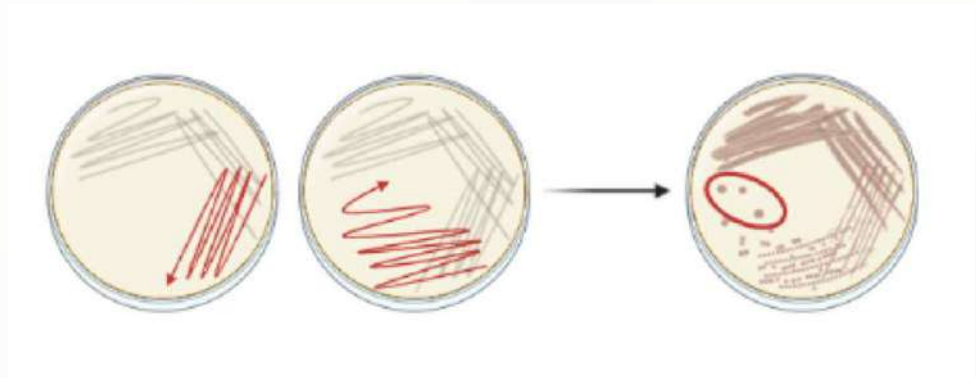


Figura 2.2. Método de siembra en medios sólidos en cajas de petri³.

En el caso de siembra de muestras se realiza la técnica de primoaislamiento, sembrando en los cuatro cuadrantes sin flamear el asa entre cada uno de ellos.

Cepas ATCC

Estas cepas son un conjunto de especies de bacterias que comparten al menos una característica, son usadas en los laboratorios de microbiología para controlar diferentes procedimientos. Este grupo de material biológico de referencia certificado, son conocidos como *American Type Culture Collection (ATCC)*⁴.

Literatura citada

1. Prakash, S., Mousumi, D. & Prasad, G. (2012). *Microbes: concepts and applications*. Wiley-Blackwell.
2. Boekhout, T. & Kurtzman, C. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, 1-81. https://doi.org/10.1007/978-3-642-79856-6_1
3. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (2014). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. Cultivo de Bacterias y Hongos in vitro*. Universidad Nacional Autónoma de México.
4. o, M., Power, D., Miller, S., Wilson, G. & Johnson, J. (Eds.). (2009). *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media* (2nd Ed.). Becton, Dickinson and Company.
5. Sandle, T. (2008). *Microbiological Culture Media: a complete guide for pharmaceutical and healthcare manufacturers*. PDA and DHI Publishing.

A continuación, en el **video 2.1**, se muestran los distintos medios de cultivo y la técnica de sembrado de cada uno de estos.



The video thumbnail features a collage of laboratory images: test tubes with orange liquid, a petri dish with bacterial culture, and two institutional logos. The text 'ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO' is prominently displayed in the center, with a play button icon. The bottom right corner of the thumbnail is dark blue with the text 'Video 2.1'.

ELABORACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Video 2.1

Capítulo 3

Método de referencia para la estimación de la cuenta de *staphylococcus aureus* de acuerdo con el apéndice b normativo de la Norma Oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos.

Determinación de microorganismos indicadores.

Determinación de microorganismos patógenos



Oosthuizen, J. (2013). *Methicillin-resistant, Staphylococcus aureus (MRSA)* [Ilustración].
Public Health Image Library (PHIL). <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=19059>

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas que se originan por la ingestión de alimentos contaminados por patógenos, produciendo síntomas como vómitos, diarreas, dolores abdominales, dolor de cabeza, fiebre, alteraciones neurológicas y otros. Además, ciertas ETA pueden generar enfermedades crónicas y, en casos extremos, la muerte.

A nivel mundial, las intoxicaciones alimentarias causadas por *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) enterotoxigénico (SAE) no son notificadas a los sistemas de vigilancia epidemiológica. El subreporte de intoxicación alimentaria estafilocócica (IAE) se debe, principalmente, a que la recuperación normalmente ocurre sin suministro de medicamentos y, frecuentemente, los organismos de salud no la incluyen dentro de las enfermedades de declaración obligatoria, tal como sucede en Estados Unidos de Norteamérica (EE. UU.), donde los médicos están obligados a reportarla.

S. aureus es un coco Gram positivo, anaerobio facultativo, se agrupa en racimos pigmentados dorados o blancos, es una bacteria inmóvil, que posee actividad de catalasa y coagulasa, convirtiéndolo en un agente agresivo para el huésped. Algunas especies de estafilococos son productoras de una familia de proteínas no glicosiladas de bajo peso molecular (masa molecular 22-31.000 kDa), conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SE) que poseen termoresistencia, incluso a 100 °C. *S. aureus* produce alrededor de 11 serotipos distintos de SE, enterotoxinas que son causantes de intoxicaciones alimentarias. Se han descrito 8 cepas de *S. aureus* productoras de las enterotoxinas A-H, que son responsables de las intoxicaciones alimentarias más comunes.

La ingestión de toxinas de *S. aureus* es conocida como estafiloenterotoxiosis o estafiloenterotoxemia y destaca por su período de incubación menor a tres horas. Las manifestaciones clínicas por la ingesta de toxinas de *S. aureus* son náuseas, vómitos intensos, espasmo abdominal y diarrea. Generalmente, la intoxicación es de evolución favorable entre 24 y 48 h, aun cuando pueden producirse formas graves con hipotensión, hipotermia y shock. Entre los motivos que explican la presencia de estafilococos destacan,

en términos generales, su elevada resistencia a las condiciones de sequedad de las superficies y su presencia en cantidad y variedad en la piel de las personas y de los animales domésticos.



Fundamento de acuerdo con la NOM 210-SSA1-2014

Para el propósito del presente método, la confirmación de *S. aureus* está basada en una fuerte reacción de coagulasa, pero se reconoce que hay algunas cepas de *S. aureus* que producen una reacción débil. Estas últimas cepas se pueden confundir con otras bacterias, por lo cual es de igual importancia someter a la par la prueba de termonucleasa y por medio del uso de pruebas adicionales, como son la producción de ácido a partir del manitol, entre otras. Este método permite hacer una estimación del contenido de *S. aureus* en los productos de consumo, se efectúa directamente en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante las pruebas de coagulasa/termonucleasa como determinante y pruebas auxiliares.

Prince, S. (s.f.). *Una imagen de una bonita escena de laboratorio* [Fotografía]. Shutterstock. <https://www.shutterstock.com/es/image-photo/image-nice-laboratory-scene-165058787>



Equipo

- Horno Pasteur que alcance 180 °C
- Autoclave
- Balanza granataria
- Incubadora 36 °C + 1 °C
- Homogenizador Stomacher o licuadora
- Baño María 35 °C + 1 °C

Materiales

- Pinzas
- Tijeras
- Espátulas
- Cuchillos
- Tubos de cultivo 16 x 150 mm o frascos lecheros de 125 mL a 250 mL de capacidad
- Tubos de cultivo 10 x 75 mm
- Cajas de Petri de 90 a 100 mm de diámetro x 15 mm de grosor, pueden emplearse de vidrio o desechables
- Pipetas 1 ml graduadas en 0.1 ml
- Pipetas 10 ml graduadas en 1 ml
- Pipetas Pasteur
- Probetas
- Varillas de vidrio de 3.5 mm de diámetro aproximadamente y 20 cm de largo dobladas en ángulo recto
- Matraz Erlenmeyer con capacidad de 2000 mL.
- Filtros y membranas de 0.45 micras

Medios de cultivo y reactivos

- Agar Baird Parker
- Solución de telurito de potasio (trioxotelurito dipotásico)
- Emulsión de yema de huevo (se puede comprar preparada, o preparar previo a su uso)
- Caldo Infusión cerebro corazón (BHI – CICC)
- Solución reguladora de fosfatos (fosfato monopotásico)
- Agua peptonada
- Peptona de caseína
- Solución salina al 0.85 %
- Agar azul de toluidina-ADN
- Agar Trypticase Soya
- Plasma de conejo con EDTA
- Agua peptonada amortiguada
- Peróxido de hidrógeno al 3 %
- Tinción de Gram
- Caldo rojo de fenol (glucosa y manitol)
- Solución de rojo de fenol
- Aceite de parafina o aceite mineral esteril

NOTA: La preparación de los medios se puede consultar en la NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice B normativo: método de referencia para la estimación de la cuenta de *S. aureus*.

Cepas

- *S. aureus* ATCC 6538
- *S. aureus* ATCC 25923
- *S. epidermidis* ATCC 12228

En el **diagrama 3.1**, se muestran los pasos a seguir, para la determinación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en leche y derivados lácteos. Después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 3.1. Aislamiento de *Staphylococcus aureus*



I. Preparación de la muestra

- Tomar diferentes porciones del alimento, transferir 25 g o mL a frascos de dilución con 225 mL de solución reguladora de fosfatos o agua peptonada amortiguada, para preparar una dilución 1:10.
- Transferir por medio de una pipeta estéril, 0.1 mL de la muestra directa si es líquida, o 0.1 mL de la suspensión inicial (dilución 10^{-1}) en el caso de otros productos, por duplicado a cajas de agar Baird Parker. Repetir el procedimiento para las diluciones siguientes si son necesarias 10^{-2} , 10^{-3} .
- Cuidadosamente distribuir el inóculo tan pronto como sea posible, sobre la superficie del agar con varillas estériles de vidrio en ángulo recto, utilizando una para cada placa y dilución.
- Mantener las placas con las tapas hacia arriba hasta que el inóculo sea absorbido totalmente por el agar.

- Invertir las placas e incubar por 44-48 horas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, buscar colonias con morfología colonial típica: colonias negras, circulares, brillantes, convexas, lisas, de diámetro de 1 mm a 2 mm y muestran una zona opaca, húmedas y con un halo claro (debido a la actividad de la lecitinasa) alrededor de la colonia (**imagen 3.1**).
- Seleccionar las placas que tengan entre 15 y 150 colonias típicas y atípicas de *S. aureus*; si no es posible, seleccionar las placas de las diluciones más altas que tengan más de 150 colonias. Seleccionar por muestra 5 colonias típicas para su confirmación o 5 colonias atípicas, para la realización de la tinción de Gram, en el caso de observar bacilos positivos, la colonia se tomará como negativa para *S. aureus*, por lo contrario, si se observan cocos se seguirá con su confirmación (**imagen 3.2**).
- Cuando las placas tengan menos de 15 colonias típicas se debe agregar la nota de “valor estimado” al reporte de los resultados.

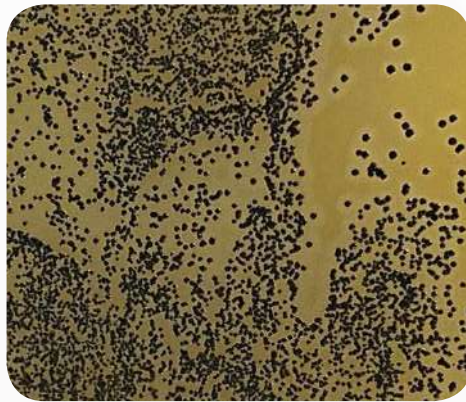


Imagen 3.1 Colonias típicas de *S. aureus* en agar Baird-Parker
(colonias negras con un halo claro debido a la actividad de lecitinasa)

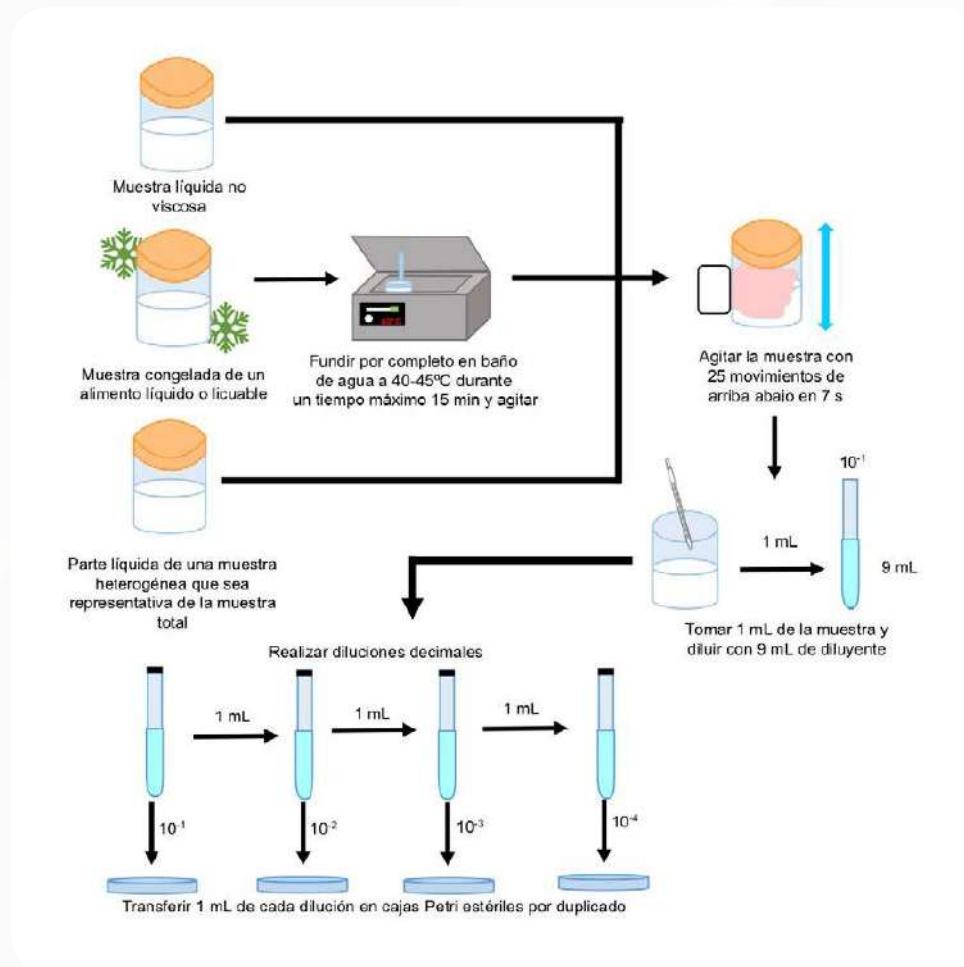


Imagen 3.2 Placa de agar Baird-Parker con colonias típicas de *S. aureus*

Muestras líquidas

En el **esquema 3.1** se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras líquidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la **NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**

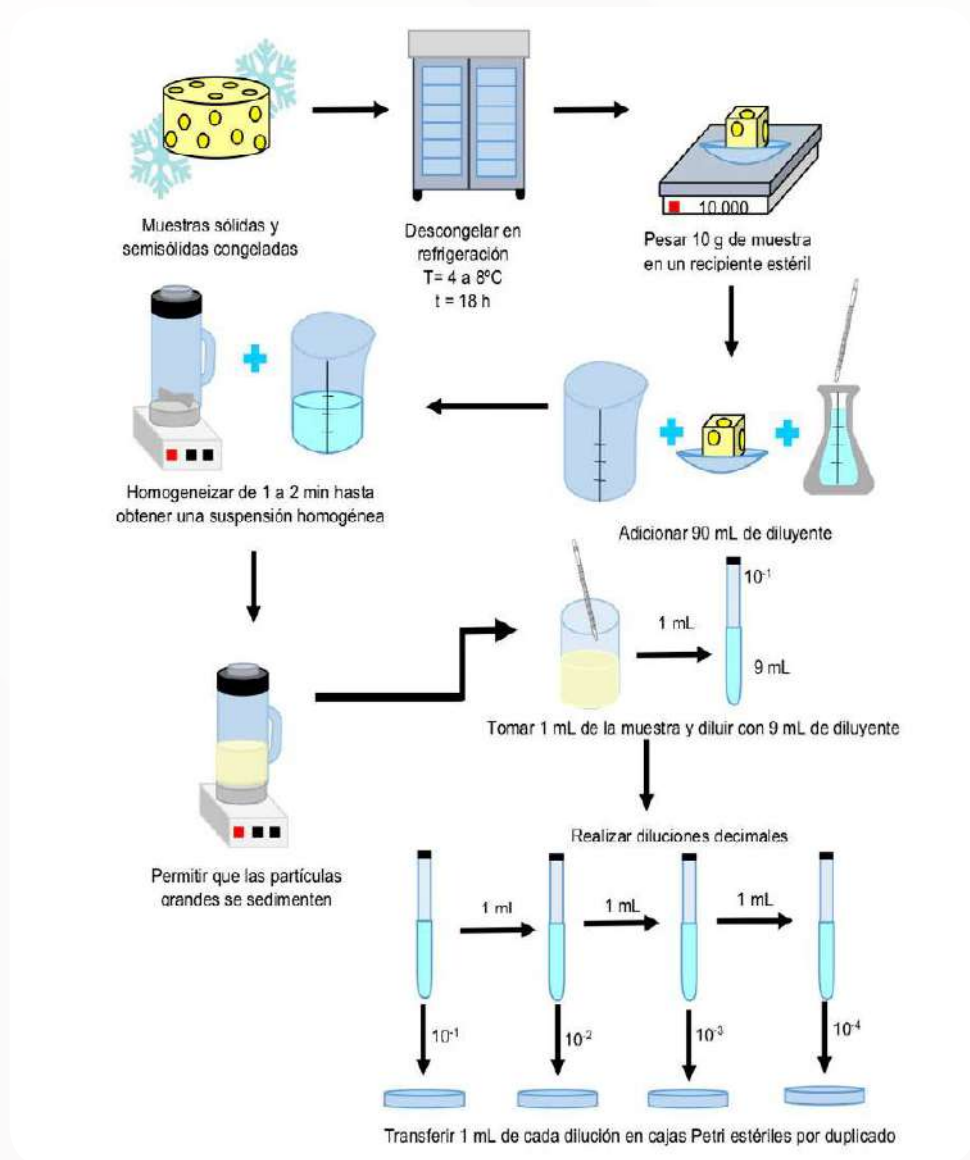
Esquema 3.1 Preparación de muestras líquidas



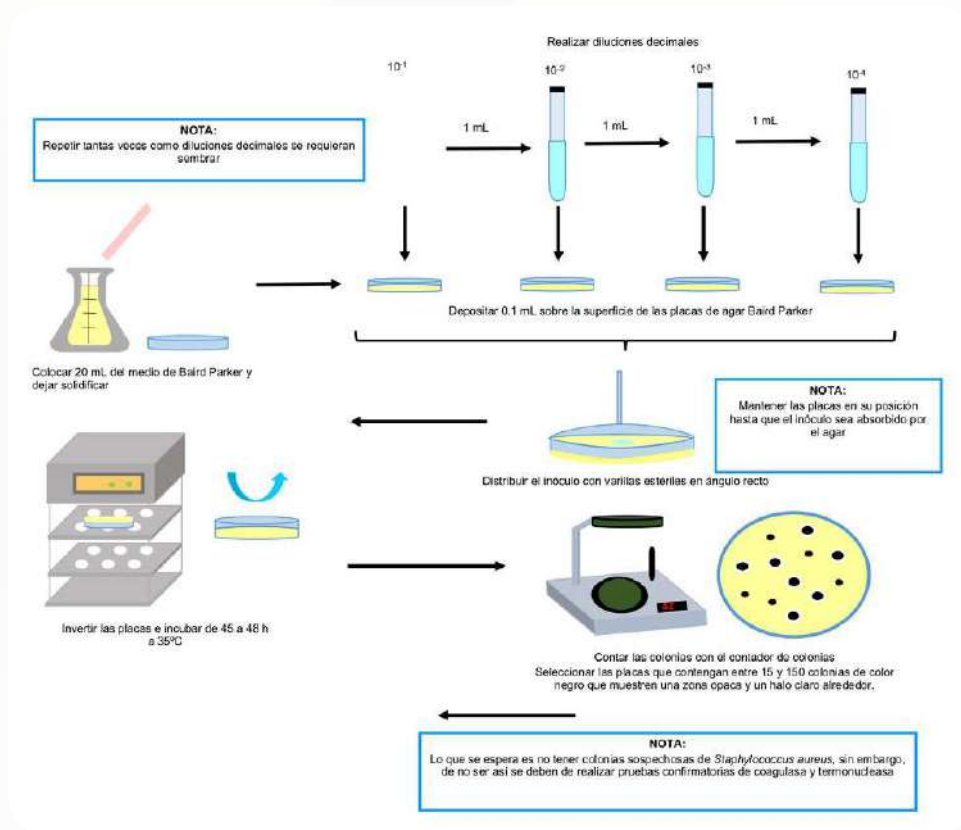
Muestras sólidas o semisólidas

En el **esquema 3.2** se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras sólidas o semisólidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la **NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**

Esquema 3.2 Muestras sólidas o semisólidas



En el **esquema 3.3** se muestra la secuencia correspondiente al método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.

Esquema 3.3 Determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos

II. Pruebas confirmatorias

Para confirmar la presencia de *S. aureus*, se sugiere la realización de las siguientes pruebas:

1. Prueba de coagulasa

- Seleccionar y sembrar cada colonia típica en tubos con 0.5 mL de caldo infusión cerebro-corazón (BHI) y en tubos con agar tripticosa soya (AST). Utilizar simultáneamente un control positivo de *S. aureus* y un control negativo de *S. epidermidis*.
- Incubar a 35 °C ± 1 °C en baño de agua, durante 20 a 24 h.
- Mantener los cultivos en AST a no más de 27 °C ± 1 °C para pruebas posteriores.
- Agregar a 0.1 mL del cultivo anterior a 0.3 mL de plasma de conejo con EDTA (a menos que el fabricante indique otras cantidades).

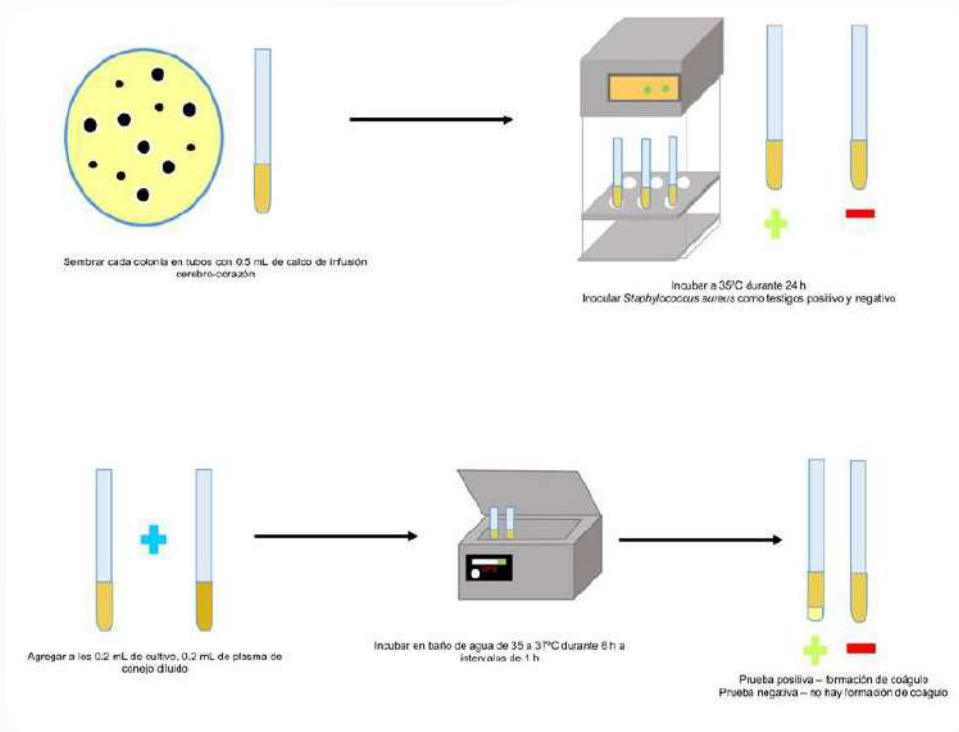
- Incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño de agua y observar periódicamente a intervalos de 1 h durante las primeras 4 h a 6 h; si no hay formación de coágulo, observar hasta las 24 h. Considerar la prueba positiva cuando el coágulo se forma completamente y es firme al invertir el tubo. En otro caso se deberán realizar las pruebas auxiliares (**imagen 3.3**).



Imagen 3.3 Prueba de coagulasa

A continuación en el **esquema 3.4**, se muestra la manera de realizar la prueba de coagulasa:

Esquema 3.4 Prueba de coagulasa



2. Prueba de termonucleasa

- Preparar portaobjetos con 3 mL de agar azul de toluidina-ADN.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur hacer orificios equidistantes en el agar.
- En un baño de agua hirviendo calentar durante 15 min, 0.3 mL de cultivo en BHI.
- Utilizando una pipeta Pasteur transferir una gota del cultivo a un orificio del medio, repetir para cada cepa incluyendo testigos positivo y negativo.
- Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en cámara húmeda de 4 h a 24 h.
- La aparición de un halo color rosa extendido de por lo menos 1 mm alrededor de la perforación califica como positiva la prueba.

III. Pruebas auxiliares

Realizar una tinción de Gram a cada cultivo y observar al microscopio la presencia de cocos Gram positivos, agrupados en racimos (**imagen 3.4**).

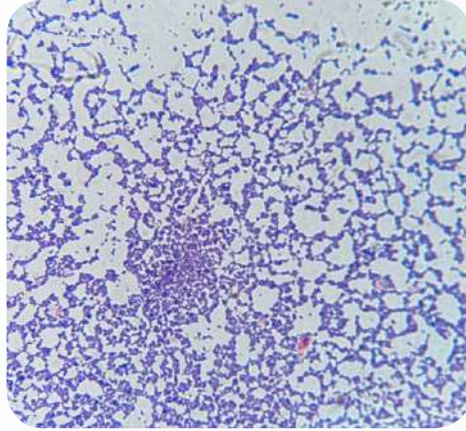


Imagen 3.4 Tinción de Gram de *S. aureus*
(cocos Gram positivos agrupados en racimos)

Si se dispone de un sistema de bioquímicas miniaturizado, este puede ser utilizado como alternativa de las siguientes pruebas bioquímicas, con excepción de la tinción de Gram, coagulasa y termonucleasa.

2.1 Prueba de catalasa

A partir de un cultivo en AST realizar la prueba de la catalasa en un portaobjetos, emulsificar una porción del cultivo con una gota de peróxido de hidrógeno al 3 %. Observar la producción de burbujas de gas (**imagen 3.5**).



Imagen 3.5 Prueba de catalasa

2.2 Utilización anaeróbica del manitol

- Inocular abundantemente un tubo con caldo para la fermentación adicionado de manitol al (0.5 %).
- Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25 mm. Incubar hasta 5 días a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

- Un cambio en la coloración del indicador significa la utilización anaeróbica del manitol y la presencia *S. aureus*.
- Incluir los controles positivos y negativos (**imagen 3.6**).



Imagen 3.6 Utilización anaeróbica de manitol (la coloración amarilla indica un cambio positivo)

3. Utilización anaeróbica de la glucosa

- Inocular un tubo con caldo para la fermentación adicionado de glucosa al (0.5 %), con un inóculo abundante.
- Cubrir el caldo con una capa de aceite de parafina o aceite mineral de al menos 25 mm. Incubar hasta 5 días a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Un cambio en la coloración del indicador significa la utilización anaeróbica de la glucosa y la presencia *S. aureus*.
- Incluir los controles positivos y negativos.

En el **cuadro 3.1**, se muestran las características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus*.

Cuadro 3.1. Características de *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Micrococcus*

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Micrococcus</i>
Actividad de catalasa	+	+	+
Producción de coagulasa	+	-	-
Producción de termonucleasa	+	-	-
Utilización anaeróbica de: Glucosa	+	+	-
Utilización anaeróbica de: Manitol	+	-	-

+ La mayoría de las cepas son positivas (más del 90%).

- La mayoría de las cepas son negativas (más del 90%).

IV. Interpretación de los resultados

- Las pruebas de termonucleasa o coagulasa positiva son consideradas como resultados confirmatorios de *S. aureus*.
- Si al menos el 80 % de las colonias típicas seleccionadas fueron coagulasa positiva y/o termonucleasa positiva, tomar el número total de las colonias contadas como presuntivas de *S. aureus*.
- En otros casos, calcular el número de colonias presuntivas de *S. aureus* a partir del porcentaje obtenido de colonias coagulasa y/o termonucleasa positivas confirmadas.
- Promediar los resultados de los duplicados.
- Cuando en dos diluciones consecutivas se obtienen cuentas entre 15 y 150 colonias (típicas o atípicas) calcular el número de *S. aureus* para cada dilución como se especifica en los puntos anteriores, calcular la cuenta de *S. aureus* considerando el factor de dilución, calcular el logaritmo en base diez de cada dilución y realizar la resta de estos, si la diferencia entre los logaritmos de las dos diluciones es menor a 0.3, reportar el promedio de las dos diluciones. Si por el contrario la diferencia entre los logaritmos es mayor a 0.3, reportar el valor más bajo.

Ejemplo para realizar el cálculo

Dilución en donde se obtuvieron entre 15 y 150 colonias: **DILUCIÓN 10-2**

Se realizaron diluciones por duplicado, obteniendo en cada caja:

Caja 1: 20 colonias

Caja 2: 25 colonias

- Supongamos que en la caja 1, tres de las cinco colonias seleccionadas fueron positivas a *S. aureus*, por lo que el 60 %, es decir 12 colonias son consideradas *S. aureus*.
- Supongamos que en la caja 2, dos de las cinco colonias seleccionadas fueron positivas a *S. aureus*, por lo que el 40 %, es decir, 10 colonias son consideradas *S. aureus*.

$12+10/2= 11$ colonias

11 colonias por el factor de dilución ($1/10^{-2}$)= **1100 (agregar 2 ceros)**

Inóculo 0.1 mL (multiplicar por 10 para obtener el resultado por mL=

11 000 UFC/mL

Por lo tanto se reporta el resultado como 11 000 UFC/mL.

En el **cuadro 3.2**, se muestra la forma de reportar cuando no se tenga crecimiento en las diluciones.

Cuadro 3.2. Cuando no se tenga crecimiento reportar como:

DILUCIÓN DE LA MUESTRA	VOLUMEN INOCULADO	RESULTADO
MUESTRA DIRECTA	1mL (0.4mL, 0.3mL Y 0.3 mL)	< 1 UFC/mL
MUESTRA DIRECTA	0.1 mL	< 10 UFC/mL
10 ⁻¹	1mL (0.4, 0.3 Y 0.3 mL)	< 10 UFC/mL
10 ⁻¹	0.1 mL	< 100 UFC/mL

Literatura citada

1. Secretaría de Salud. (2014). *Productos y Servicios. Métodos de Prueba Microbiológicos. Determinación de Microorganismos Indicadores. Determinación de Microorganismos Patógenos.* (NOM-210-SSA1-2014). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0
2. Alarcón, M., Oyarzo, C., Escudero, C., Cerda, F. y Valenzuela F. (2017). Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico Tipo A, en Frotis Nasofaríngeos en Manipuladores de Alimentos. *Revista médica de Chile*, 145(12), 1559-1564. <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017001201559>

A continuación, en el **video 3.1**, se muestra la técnica para la estimación de la cuenta de *Staphylococcus aureus*.



Capítulo 4

Método de referencia para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* de acuerdo con el apéndice c normativo de la Norma Oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos



Seventyfourimages. (s.f.). *Investigación Bacteriana en Laboratorio* [Fotografía].

Envatoelements. <https://elements.envato.com/es/bacterial-research-in-laboratory-ZAWE237>

Introducción

La listeriosis es una infección grave causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*. Se trata de una bacteria que puede causar una enfermedad transmitida por los alimentos denominada **listeriosis**, que es relativamente poco frecuente pero grave, con tasas de letalidad altas (entre el 10 % y el 30 %). Los síntomas más comunes de la listeriosis son gastroenteritis con fiebre, dolor de cabeza, malestar estomacal y vómitos, aunque esta infección no tiene mucha repercusión en los adultos sanos, no sucede lo mismo con las personas que tienen el **sistema inmunológico debilitado** (ancianos, niños y enfermos), a estos individuos les afecta de un modo más severo, pudiendo llegar a ocasionarles la muerte.

La *Listeria* spp también es muy problemática cuando afecta a **mujeres embarazadas**, puesto que pueden transmitírsela al feto y causarle diversos perjuicios, como aborto espontáneo, muerte fetal intraútero o nacimiento prematuro. Las personas pueden sufrir listeriosis después de comer alimentos contaminados¹.

Los alimentos de mayor riesgo de estar contaminados con Listeria son los siguientes: leche cruda (directa de vaca, oveja o cabra sin tratar ni hervir), quesos blandos hechos con leche no pasteurizada, germinados crudos, pescado ahumado, carnes y derivados no cocinados o rebanados, frutas y verduras troceadas con antelación al consumo (se tienen que lavar, pelar y trocear justo en el momento del consumo) y verduras crudas que no han sido limpiadas y desinfectadas correctamente, hay todo un conjunto de medidas que hay que tomar para prevenir la listeriosis¹.



Mstandret. (s.f.). *Cierre del microscopio en el laboratorio* [Fotografía]. Envatoelements. <https://elements.envato.com/es/close-up-of-microscope-at-the-laboratory-Q9LEDFP>

Fundamento de acuerdo con la NOM-210-SSA1-2014

Este método permite determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en los productos de consumo, se efectúa por medio de sembrado en un medio de pre-enriquecimiento selectivo y después su aislamiento en placas de medio de cultivo selectivo y diferencial, con la confirmación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas².

L. monocytogenes es una bacteria que se desarrolla intracelularmente, el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* provoca listeriosis. Es uno de los patógenos más virulentos causantes de infecciones alimentarias, con una tasa de mortalidad entre un 20 % a 30 %, más alta que casi todas las restantes toxoinfecciones alimentarias.

L. monocytogenes es un bacilo corto Gram (+), que presenta diploformas dispuestas en "V" y anaerobio facultativo capaz de proliferar en un amplio intervalo de temperaturas (1 °C a 45 °C). Es un microorganismo catalasa positiva y no presenta cápsula, ni produce esporas, posee flagelos peritricos, es decir, los flagelos son apéndices que le confieren motilidad a la bacteria y estos se encuentran rodeando el perímetro de la bacteria, gracias a estos, *Listeria* spp presenta movilidad a 30 °C o menos, pero es inmóvil a 37 °C, temperatura a la cual sus flagelos se inactivan².



Wavebreakmedia. (s.f.). Vasos numerados en laboratorio [Fotografía].

Envatoelements. <https://elements.envato.com/es/numbered-beakers-in-laboratory-PMSQEU8>

Advertencia: con la finalidad de proteger la salud del personal de laboratorio, se debe considerar al manejar un alimento que se sospeche está contaminado con *Listeria*, lo siguiente²:

- Las pruebas para la determinación de *L. monocytogenes* deberán ser realizadas en laboratorios debidamente equipados y por microbiólogos expertos, cuidando la eliminación de los desechos potencialmente contaminados.

- Las mujeres embarazadas no deberán manipular los cultivos de *L. monocytogenes* bajo ninguna circunstancia.
- Establece el método microbiológico para determinar la presencia de *L. monocytogenes* a partir de alimentos para consumo humano nacionales o de importación.

Equipo

- Autoclave
- Estufa de laboratorio que alcance los 180 °C
- Balanza con sensibilidad de 0.1 g
- Incubadoras a diferentes temperaturas 25 °C, 30 °C y 36 °C
- Potenciómetro
- Licuadora con vaso de vidrio esterilizable controlada por reóstato
- Microscopio
- Baño María 45 °C + 2 °C

Materiales

- Asas de platino o níquel de 3 mm de diámetro o 10 µL
- Pipeta de 10 mL (divisiones de 0.5 mL y 0.1 mL respectivamente y protegidas con tapón de algodón)
- Pipetas 5 mL (divisiones de 0.5 mL y 0.1 mL respectivamente y protegidas con tapón de algodón)
- Pipetas 1 mL (divisiones de 0.5 mL y 0.1 mL respectivamente y protegidas con tapón de algodón)
- Pipetas de 1 mL con graduaciones de 0.1 mL
- Matraces de Erlenmeyer de 500 mL
- Cajas de Petri desechables de 90 mm de diámetro x 15 mm de grosor
- Cajas de Petri desechables de 100 mm de diámetro x 15 mm de grosor
- Cucharas
- Bisturís
- Cuchillos
- Pinzas
- Tubos de ensayo 16 * 150 mm
- Tubos de ensayo 10*75 mm
- Gradillas para tubos de ensayo
- Mecheros Bunsen o Fisher, de preferencia Fisher
- Algodón

Medios de cultivo

- Caldo Fraser medio (Demi-Fraser), con reducción de la concentración de agentes selectivos
- Caldo Fraser con la concentración completa de agentes selectivos
- Suplemento base para caldo Fraser
- Agar Oxford
- Agar PALCAM
- ASTEL (Agar tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura)
- CSTEL (caldo tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura)
- Agar sangre
- Caldo ramnosa
- Caldo xilosa
- Agar movilidad

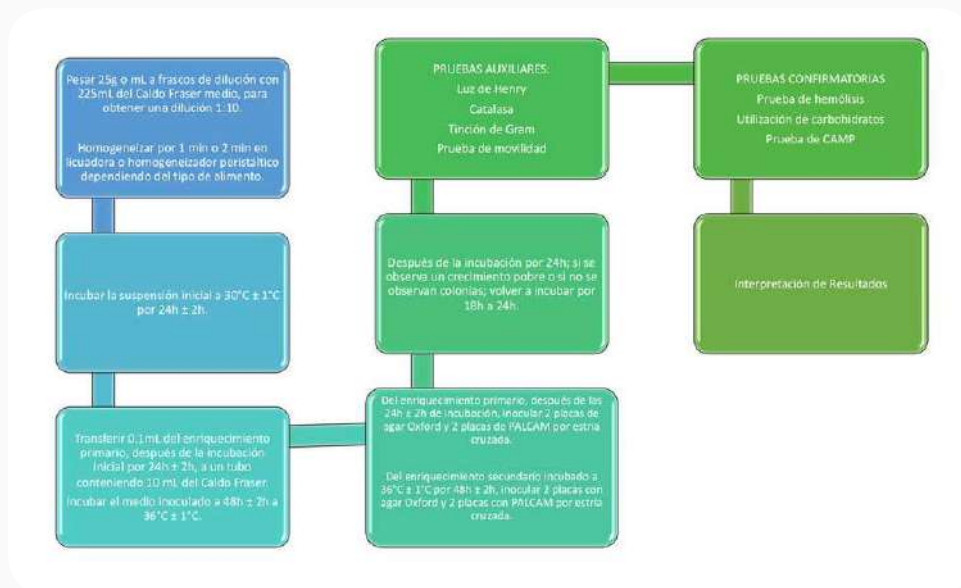
Nota: la preparación de los medios se puede consultar en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Método de referencia para el aislamiento de *L. monocytogenes* de acuerdo con el apéndice C normativo.

Cepas

- *S. aureus* ATCC 49444
- *S. aureus* ATCC 25923 CIP 5710
- *R. equi* ATCC 6939
- *R. equi* NCTC 1621
- *L. monocytogenes* ATCC 19115
- *L. innocua* ATCC 33092
- *L. ivanovii* ATCC 19119

En el diagrama 4.1, se muestra los pasos a seguir, para la determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en leche y derivados lácteos. Después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 4.1. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*



I. Preparación de la muestra



Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa y que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento, para lo cual se deberán tener las precauciones de envío de material y medios estériles y el transporte en frío de las muestras para evitar proliferación de microorganismos.

Pre-enriquecimiento:

1. Al preparar la suspensión inicial, tomar diferentes porciones del alimento. Transferirlo al Caldo Fraser medio, a fin de obtener una relación 1:10. Pesar 25 g o mL a frascos de dilución con 225 mL del Caldo Fraser medio, para obtener una dilución 1:10 (masa-volumen o volumen-volumen).
2. Homogeneizar por 1 min o 2 min en licuadora u homogeneizador peristáltico dependiendo del tipo de alimento.

Enriquecimiento Primario:

3. Incubar la suspensión inicial a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Nota: Durante la incubación, puede aparecer una coloración oscura.

Enriquecimiento Secundario:

4. Transferir 0.1 mL del enriquecimiento primario, después de la incubación inicial por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, a un tubo conteniendo 10 mL del Caldo Fraser.
5. Incubar el medio inoculado a $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Siembra en medios selectivos e identificación:

6. Del enriquecimiento primario, después de las 24 h \pm 2 h de incubación, inocular 2 placas de agar Oxford y 2 placas de PALCAM por estría cruzada (**Apéndice 4.1**).
7. Del enriquecimiento secundario incubado a 36 °C \pm 1 °C por 48 h \pm 2 h, inocular 2 placas con agar Oxford y 2 placas con PALCAM por estría cruzada.
8. Invertir las placas e incubar un juego de agar Oxford y PALCAM a 30 °C \pm 1 °C y el otro a 36 °C \pm 1 °C.

Nota: Las placas con agar PALCAM se pueden incubar en condiciones de microaerofilia (CO₂ 5 %-12 %, O₂ 5 %-15 %).

9. Después de la incubación por 24 h, si se observa un crecimiento pobre o si no se observan colonias, volver a incubar por 18 h a 24 h. Observar las placas para detectar la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp.
10. Colonias típicas de *Listeria* spp, en agar Oxford; por lo general crecen a las 24 h, se observan pequeñas (1 mm), grisáceas, rodeadas por un halo oscuro. Después de las 48 h de incubación, las colonias se tornan oscuras con posible brillo verdoso de aproximadamente 2 mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos.
11. Colonias típicas de *Listeria* spp en agar PALCAM; para placas incubadas en anaerobiosis dejarlas expuestas al aire por 1 h, para que recuperen su color de rosa a púrpura. Después de 24 h se observa a *Listeria* spp como colonias muy pequeñas, grisáceas o un verde olivo de aproximadamente 1.5 mm a 2 mm de diámetro, a veces con centros negros, pero siempre con halos oscuros. Después de 48 h las colonias de *Listeria* spp se observan de color verde de aproximadamente 1.5 mm a 2 mm de diámetro, con el centro hundido y rodeadas de un halo negro.

II. Pruebas auxiliares confirmatorias de *Listeria* spp

1. Selección de colonias para su confirmación

- Tomar de cada placa de agares selectivos, cinco colonias sospechosas de *Listeria* spp. Si alguna de las placas tiene menos de cinco colonias presuntivas, tomar para su confirmación todas las colonias que hayan crecido.

2. Aislamiento

- Sembrar por estría cruzada, para obtener colonias aisladas en cajas con ASTEL.
- Incubar estas placas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h a 24 h o hasta que el crecimiento sea satisfactorio (no más de 72 h).
- Las colonias típicas se observan de 1 mm a 2 mm de diámetro, convexas, incoloras y opacas con borde entero. Si no se obtiene un buen aislamiento, proceder a sembrar nuevamente otra colonia sospechosa de los medios selectivos.

3. Luz de Henry

- Esta prueba tiene carácter informativo. Examinar las placas de ASTEL con colonias típicas, con el sistema óptico de Henry se trata de hacer incidir luz transmitida oblicuamente con una lámpara de luz blanca lo suficientemente potente como para iluminar la placa en un ángulo de 45° como se muestra en la figura 4.1.

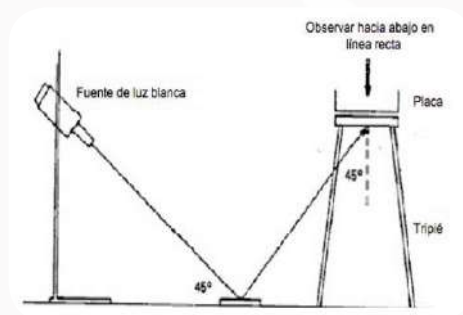


Figura 4.1

- Las colonias aparecen de color azul-gris a azul.
- Se recomienda el uso de cepas (positivo y negativo).
- La placa puede ser observada a simple vista, pero es preferible el uso de un microscopio de disección o lupa.

Nota: la luz de Henry puede ser mejor percibida si ASTEL es delgado, aproximadamente 15 mL/placa.

4. Reacción de catalasa

- Tomar una colonia aislada y suspenderla en una gota de solución de peróxido de hidrógeno. Una reacción positiva, se indica por la formación inmediata de burbujas.
- **Precaución:** la agitación del reactivo con la suspensión del microorganismo debe hacerse con un asa de plástico o palillo de madera estéril, evitando el contacto con el reactivo.

5. Tinción de Gram

- Realizar la tinción de Gram a una colonia aislada obtenida en ASTEL.
- Se deberán observar bacilos cortos Gram Positivos (**Apéndice 4.2**).

6. Prueba de movilidad

- Tomar 1 colonia aislada de ASTEL, y suspenderla en un tubo conteniendo caldo tripticasa soya con extracto de levadura.
- Incubar a $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 8 h a 24 h o hasta que se observe el medio turbio.
- Depositar una gota de este cultivo entre un portaobjetos y cubreobjetos, y examinar en el microscopio.
- *Listeria* spp se observan como bacilos cortos con un movimiento giratorio (*trumbling*). Cultivos incubados a la temperatura de $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pueden ser falsos positivos al exhibir dicho movimiento: se recomienda siempre comparar el cultivo de prueba con cepas conocidas de cocos, bacilos largos o cortos con una movilidad rápida de nado y que no es característico de *Listeria* spp.

7. Prueba alternativa de movilidad

- Utilizando un asa recta, inocular agar de movilidad picando una colonia obtenida en ASTEL. Incubar por 48 h a 25 °C ± 1 °C.
- Examinar el crecimiento alrededor de la picadura.
- Debido al típico movimiento de *Listeria* spp, se obtiene como resultado un crecimiento característico en forma de sombrilla.
- Si el crecimiento no es suficiente, incubar por cinco días adicionales y observar la picadura al término de ese tiempo.



Stevanovicgor. (s.f.). *Cristalería de laboratorio de Ciencia Medicina* [Fotografía].

Envatoelements. <https://elements.envato.com/es/medical-science-laboratory-glassware-7XQBUCF>

III. Confirmación de *L. monocytogenes*

Se sugiere realizar las siguientes pruebas para confirmar la presencia de *L. monocytogenes*:

1. Prueba de hemólisis

- Si las características morfológicas y fisiológicas, así como la catalasa son indicativos de *Listeria* spp, inocular una placa con agar sangre de carnero al 5 % para determinar la actividad hemolítica.
- Las placas de agar sangre no deben presentar agua de condensación en la superficie del medio.
- Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el anverso de la placa de agar sangre de carnero al 5 %.
- Tomar una colonia aislada obtenida en ASTEL e inocular por picadura un cuadro por cada cultivo a probar.

- Simultáneamente, utilizar cepas control positivas (*L. monocytogenes*) y negativas (*L. innocua*).
- Después de la incubación a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, examinar las cepas de prueba y los controles.
- *L. monocytogenes* produce una zona ligeramente clara alrededor del punto de la picadura (β -hemólisis).
- *L. innocua* no muestra una zona clara alrededor de la picadura.
- *L. ivanovii* usualmente se observa una zona ancha, clara y delimitada de β -hemólisis. Examinar las placas con una luz brillante para poder comparar las cepas de prueba con los controles.

2. Utilización de carbohidratos (Ramnosa y Xilosa)

- Utilizando un asa bacteriológica, inocular cada uno de los caldos de carbohidratos a probar usando colonias aisladas en ASTEL.
- Incubar a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por cinco días. Una reacción positiva se caracteriza por la producción de ácido y cambio de color a amarillo cuando se utiliza base caldo púrpura de bromocresol adicionado con cada uno de los carbohidratos, que ocurre dentro de las primeras 24 h a 48 h.
- Si después de 48 h de incubación no se observa una reacción positiva clara, dejar incubar hasta cinco días (alternativamente pueden utilizarse sistemas de bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular).



3. Prueba de camp

- En una placa de agar sangre de carnero al 5 % sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y otra línea paralela de *R. equi*, de tal forma que queden paralelas y diametralmente opuestas para que entre estas pueda estriarse la cepa sospechosa de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse entre sí.
- Simultáneamente probar cepas control: *L. monocytogenes*, *L. innocua* y/o *L. ivanovii*. Incubar las placas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h a 18 h.
- Observar el sinergismo entre las hemólisis de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica intensa.
- La **figura 4.2**, muestra la disposición de las estrías de los cultivos en una placa de la prueba de CAMP.
- La hemólisis de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* se incrementa cerca de la estría de *S. aureus* y la hemólisis de *L. ivanovii* se aumenta cerca de la estría de *R. equi*. Las especies restantes de *Listeria* no son hemolíticas en esta prueba.

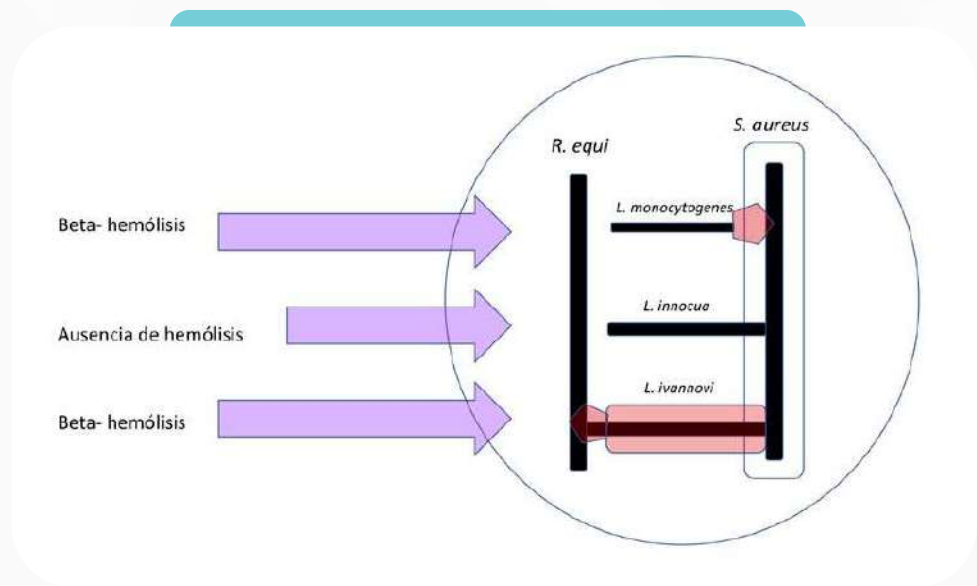


Figura 4.2. Prueba de Camp

IV. Interpretación de los resultados

Interpretación de las propiedades morfológicas y fisiológicas de las reacciones bioquímicas de *Listeria monocytogenes*

- Todas las especies de *Listeria* spp son colonias pequeñas, bacilos Gram positivos con movilidad rotativa y catalasa positiva.
- *L. monocytogenes* se distingue de otras especies por las características enlistadas en el **cuadro 4.1**.
- Para fines de vigilancia sanitaria, los aislamientos que sean considerados como *L. monocytogenes* deben ser enviados al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para realizar la tipificación.

Cuadro 4.1. Pruebas para la identificación de *Listeria* spp

Especies	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi subs. murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reacción variable
 (+): relación débil
 +: > 90% de reacción positiva
 -: sin reacción

Nota: Existen cepas extrañas de *L. monocytogenes* las cuales no muestran β -hemólisis o una reacción positiva a la prueba de CAMP, bajo las condiciones descritas en este documento.

Cultivos control

Con el fin de comprobar la habilidad del preenriquecimiento y la identificación de *Listeria* spp, se recomienda analizar junto con la prueba cepas control negativo como *S. aureus* y positivo como *L. monocytogenes*.

Expresión de resultados

De acuerdo con la interpretación de los resultados, informar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes*, especificando la masa en g o el volumen en mL de la muestra ensayada.

Apéndice 4.1

A continuación, se muestran la técnica de siembra por estría cruzada como se muestra en la figura 4.3.

- Depositar el inóculo en el cuadrante 1.
- Flamear y enfriar el asa entre cada cuadrante para realizar el aislamiento.
- Asegurarse que exista contacto entre las estrías de cada cuadrante (1 con 2, 2 con 3 y 3 con 4).
- En el caso de siembra de muestras se realiza la técnica de primoaislamiento, sembrando en los cuatro cuadrantes sin flamear el asa entre cada uno de ellos.



Figura 4.3. Técnica de siembra por estría cruzada

Apéndice 4.2

A continuación, se describe el procedimiento a seguir para la tinción de Gram, que se muestra gráficamente en la figura 4.4.

Tinción de Gram³

En el diagnóstico microbiológico, la visualización del agente patógeno o su efecto en el material biológico remitido al laboratorio de diagnóstico, constituye el primer

paso hacia su identificación (demostración). Esto puede realizarse mediante el examen directo de una preparación húmeda o bien, de un frotis fijo teñido con colorantes específicos.

Elaboración de frotis fijos para tinciones

- Utilizar laminillas limpias y con un lápiz graso delinear el área donde se va a colocar la muestra.
- Con el asa microbiológica se coloca una pequeña gota del cultivo que se va a teñir si esta proviene de un medio líquido. Cuando se toma a partir de un medio sólido, se coloca una gota de agua destilada en la laminilla y se mezcla bien con un poco del crecimiento del cultivo.
- Extender la gota sobre la laminilla formando una capa fina. Debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso.
- Dejar secar las laminillas a temperatura ambiente.
- Cuando se haya secado el frotis pasar la laminilla tres veces por la llama del mechero con la capa del frotis hacia arriba, teniendo cuidado de no aplicar calor en forma excesiva.

Tinción de Gram

La tinción de Gram es aplicada en forma universal como primer paso en la identificación de bacterias. Este método divide a las bacterias en dos grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo con los componentes predominantes de su pared celular.

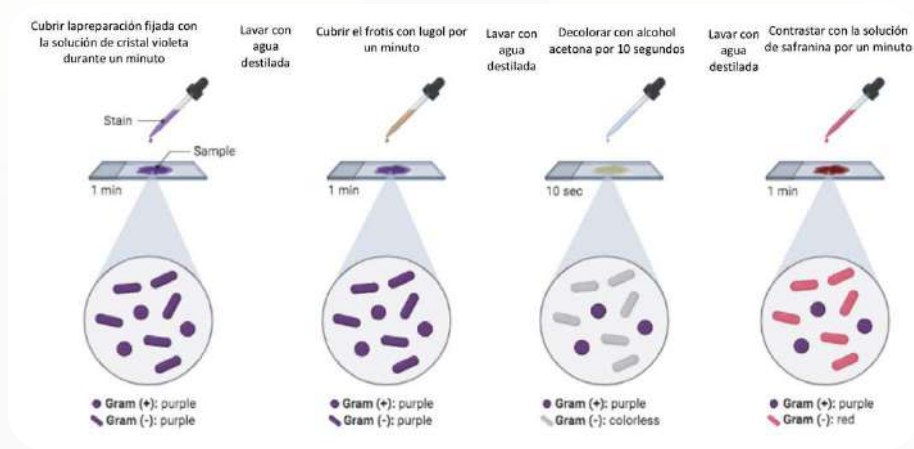
Al colorear los microorganismos con cristal violeta o violeta de genciana (colorante primario) y añadirles una solución débil de yodo (mordente) se combinan estos con algunos componentes de la célula bacteriana y son retenidos por la pared celular.

Posteriormente, cuando se tratan con alcohol acetona (decolorante) la pared de las bacterias sufre una deshidratación que impide la salida del colorante. En

consecuencia, la safranina (colorante de contraste) es incapaz de penetrar en la pared celular.

Procedimiento

- Preparar el frotis: se coloca una gota de agua destilada estéril en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco del crecimiento del cultivo.
- Extender la gota sobre el portaobjetos formando una capa fina. Debe evitarse preparar un frotis demasiado grueso.
- Dejar secar las laminillas a temperatura ambiente.
- Cuando se haya secado el frotis pasar la laminilla tres veces por la llama del mechero con la capa del frotis hacia arriba, teniendo cuidado de no aplicar calor en forma excesiva, ya que estropearía la morfología normal y la estructura de los microorganismos que se van a teñir.
- Cubrir la preparación fijada con la solución de cristal violeta durante un minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Cubrir el frotis con lugol por un minuto.
- Lavar con agua destilada.
- Decolorar con alcohol acetona.
- Lavar rápidamente con agua destilada.
- Contrastar con la solución de safranina por un minuto.
- Lavar con agua, secar al aire y examinar con el objetivo de inmersión (100x).



Prueba de Koh al 3 %
para corroborar la
Tinción de Gram

Esta prueba consiste en colocar sobre una laminilla una gota de KOH al 3 % y con el asa hacer en ella una suspensión de colonias de la bacteria mezclando con movimientos giratorios durante 1 a 3 minutos. Si al separar el asa de la mezcla se forma una hebra viscosa, esto indica que se trata de bacterias Gram negativas, si la hebra no se forma, entonces se trata de Gram positivas.

Figura 4.4. Procedimiento para realizar la tinción de Gram

Literatura citada

1. Muñoz, A., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G. y Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Revista Biomédica*, 31(3), 428-439. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.394>
2. Secretaría de Salud. (2014). *Productos y Servicios. Métodos de Prueba Microbiológicos. Determinación de Microorganismos Indicadores. Determinación de Microorganismos Patógenos.* (NOM-210-SSA1-2014). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0
3. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. (2014). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Bacteriología y Micología Veterinarias. Cultivo de Bacterias y Hongos in vitro.* Universidad Nacional Autónoma de México.

Capítulo 5

Método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp. De acuerdo con el apéndice a normativo: método de referencia para el aislamiento de *Salmonella* spp de la Norma Oficial Mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos



Archer, J. (2019). *Salmonella* sp. [Ilustración].
Public Health Image Library (PHIL). <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=23250>

Introducción

Los miembros del género *Salmonella* spp han sido muy estudiados como patógenos cuando se encuentran presentes en los alimentos. El control de este microorganismo depende en cierta medida del método analítico utilizado para su detección.

Este microorganismo fue inicialmente identificado en muestras clínicas y los métodos empleados para estos casos se adaptaron posteriormente para su detección en alimentos. Las modificaciones a los métodos consideraron dos aspectos principales, el primero es el debilitamiento o daño a las células bacterianas presentes en un alimento debido al proceso al que está sujeto (por ejemplo: tratamiento térmico, secado, etc.) y segundo, la variabilidad inherente a la naturaleza del producto bajo estudio.

La determinación de la presencia o ausencia de *Salmonella* spp, en cierta cantidad de masa o volumen específico de producto, se lleva a cabo acorde a lo descrito en el presente método, requiriendo cuatro etapas sucesivas, las cuales son:

- Etapa de preenriquecimiento
- Enriquecimiento selectivo
- Aislamiento en medios de cultivos selectivos y diferenciales
- Identificación bioquímica y confirmación serológica de los microorganismos



NOTA: *Salmonella* spp. puede presentarse en concentraciones bajas y en algunas ocasiones ir acompañada de una gran cantidad de biota microbiana, de otras enterobacterias y otros géneros bacterianos. Es por lo que se hace necesario el preenriquecimiento para permitir la detección de un número bajo de bacterias o células estresadas de *Salmonella* spp.

Equipo

- Autoclave
- Horno que alcance 180 °C
- Incubadora capaz de operar a 36 °C ± 1 °C
- Baño de agua capaz de operar a 41.5 °C ± 1 °C o incubadora capaz de trabajar a 41.5 °C ± 1 °C
- Baño de agua capaz de operar a 45 °C ± 2 °C
- Baño de agua capaz de operar a 37 °C ± 1 °C
- Potenciómetro
- Balanza granataria con sensibilidad de 0.1g verificada el día de uso
- Homogeneizador peristáltico o licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato, con vasos esterilizables (vidrio, aluminio o acero inoxidable)
- Equipo de filtración con trampa
- Bomba de vacío

Materiales

Importante: todo el material de sembrado a emplear debe estar estéril.

- Asa de platino, níquel o desechables de aproximadamente 3 mm de diámetro o 10 µL (microlitros)
- Pipetas graduadas o pipetas automáticas, de diferentes capacidades 10 mL, 5 mL, graduadas respectivamente en divisiones de 0.5 mL y 0.1 mL protegidas con tapón de algodón, estériles
- Pipetas de 1 mL, con graduaciones de 0.1 mL, estériles
- Matraces de Erlenmeyer de 500 mL y/o capacidad apropiada
- Cajas Petri estériles de vidrio o desechables de 90 mm y/o 100 mm y/o de un diámetro mayor a 100 mm x 15 mm de grosor
- Cucharas, bisturíes, cuchillos y pinzas, estériles
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm y de 20 x 100 mm o de capacidades adecuadas (30 y 50 mL respectivamente), estériles
- Gradillas para tubos de ensayo
- Mecheros Fisher
- Papel Indicador de pH
- Pinzas estériles para membrana
- Matraces Kitazato de 1000 mL
- Filtros de membranas estériles de tamaño de poro de 0.45 µm
- Manguera de hule para equipo de filtración

Nota: el material desechable puede utilizarse como alternativa aceptable a la cristalería reutilizable si cumple las especificaciones adecuadas.

Medios de cultivo

- Agua Peptonada amortiguada
- Caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS)
- Base de Caldo Muller-Kauffmann con Verde Brillante y Novobiacina (MKTTn)
- Agar de xilosa, lisina, desoxicolato (XLD)
- Hektoen Enteric Agar (EH)
- Agar Bismuto-sulfito (ASB)
- Agar Verde Brillante (BGA)
- Agar nutritivo
- Triple azúcar hierro (TSI)
- Agar Lisina hierro (LIA)
- Agar Urea de Christensen
- Agar *Salmonella Shigella* (ASS)
- Medio L-Lisina descarboxilasa
- Solución salina fisiológica
- Caldo Tripton al 1 %
- Caldo tetrionato (CTT)
- Caldo soya tripticaseina (CST)
- Caldo Nutritivo
- Caldo Dey-Engley
- Leche descremada
- Caldo lactosado

Nota: la preparación de los medios se puede consultar en la NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Apéndice A normativo: Método de referencia para para el aislamiento de *Salmonella* spp.

Reactivos

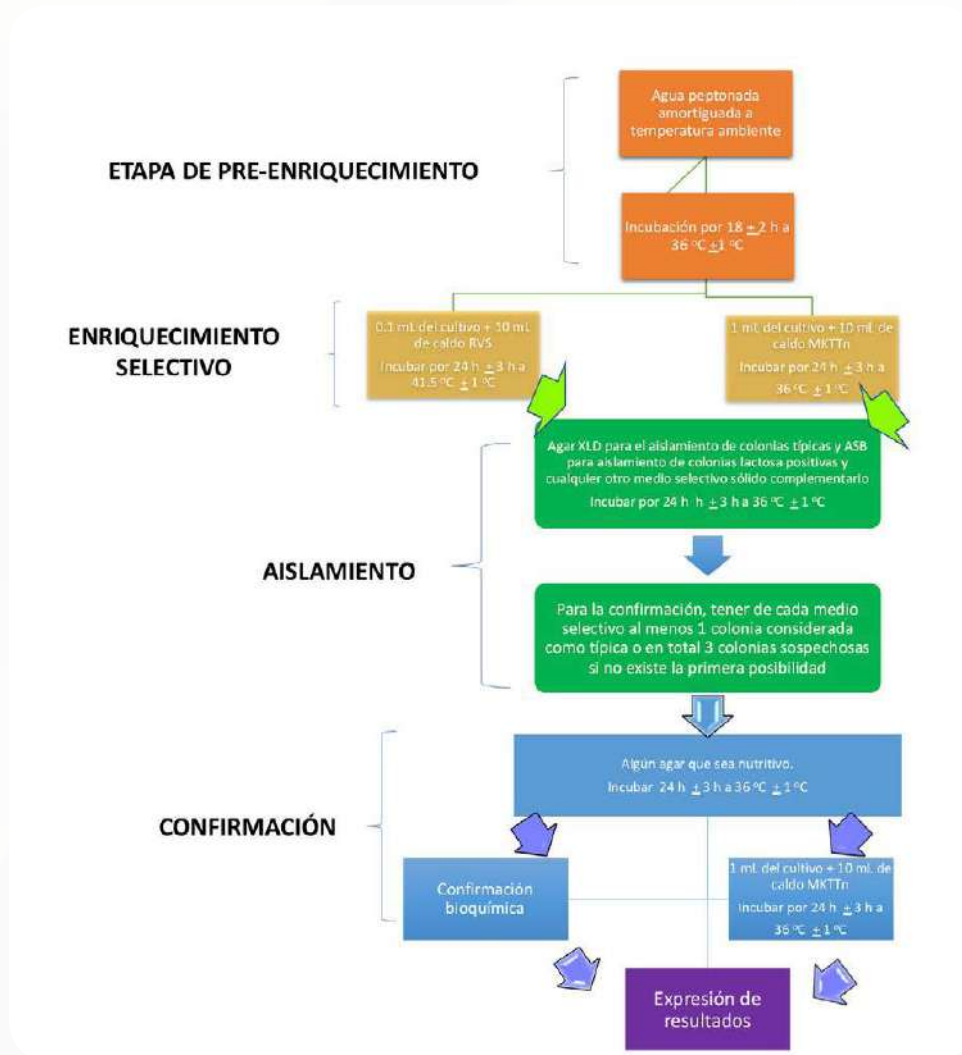
- Reactivos para la reacción VP (α -naftol y KOH)
- Reactivos para la reacción de indol
- Reactivo de Kovac o Erlich
- Antisuero somático (O) polivalente de *Salmonella* spp
- Tolueno
- α -naftol
- Solución de creatina
- KOH
- ONPG (orto-nitrofenil- β -galactósido)
- Novobiocina (sal sódica)
- Yodo
- Yoduro de Potasio
- Alcohol etílico 96 %
- 4-Dimetilaminobenzaldehído
- HCl, r = 1.18 g/mL a 1.19 g/mL
- 2-metilbutan-2-ol
- Cloruro de sodio
- Monohidrato de creatina
- Solución acuosa de verde brillante al 1 %
- Tergitol/Aniónico
- Tritón X-100
- NaOH 1N
- Alcohol al 70 %
- Sulfato Ferroso
- K₂ SO₃ Sulfato de Potasio

Cepas

- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (*S. typhimurium*)
- *Salmonella diarizonae* ATCC 12325. (*S. diarizonae*)
- *Salmonella abortus equi* ATCC 9842. (*S. abortus equi*)

En el **diagrama 5.1**, se muestra los pasos a seguir, para la determinación de la presencia de *Salmonella* spp en alimentos, después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 5.1. Aislamiento de Salmonella spp.



Condiciones de prueba

Muestreo

Es importante que el laboratorio se cerciore de recibir una muestra representativa, homogénea y suficiente, que no haya tenido daños o cambios durante el transporte y/o almacenamiento. Que haya sido envasada en envase estéril y transportada en refrigeración o de aquella forma adecuada, para evitar su alteración.

El muestreo no es parte del método especificado aquí, es recomendable que las partes involucradas en este punto lleguen a un acuerdo al respecto, pueden utilizarse diversos estándares internacionales tales como los planes de muestreo del CODEX Alimentarius o las guías del ICMSF.

Preparación de la muestra de ensayo general

- La preparación de la suspensión inicial requiere 25 g de la muestra en 225 mL del medio de preenriquecimiento, para obtener una dilución 1:10.
- En una situación atípica y justificada, si la porción de muestra utilizada en el ensayo es distinta a 25 g, se deberá utilizar la cantidad necesaria de medio de preenriquecimiento para obtener una dilución 1:10.
- En casos excepcionales, cuando es necesario analizar más de una porción de 25 g de un lote específico de alimento y teniendo evidencia de que si hay mezcla de tales porciones no afecta el resultado, las muestras pueden ser compuestas; es decir, si 10 muestras de 25 g serán examinadas, combinar las 10 porciones para obtener 250 g y adicionar 2.25 L del caldo de preenriquecimiento precalentado a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Sin embargo, se debe tomar en cuenta que para inocular el caldo selectivo RVS y MKTTn aumentarán las porciones de 10 mL a 100 mL teniendo que inocular 1 mL y 10 mL respectivamente.

Procedimiento analítico**1. Preenriquecimiento**

En caso de uso general utilizar como medio de preenriquecimiento agua peptonada amortiguada, incubar la dilución inicial a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

2. Enriquecimiento selectivo

- Transferir 0.1 mL del cultivo de preenriquecimiento a un tubo de 10 mL de caldo RVS y 1 mL a un tubo conteniendo 10 mL de caldo MKTTn.
- Incubar el caldo RVS a $41.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ y el caldo MKTTn a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

3. Aislamiento e identificación

Para el aislamiento, inocular a partir de los cultivos obtenidos en el punto anterior, tres medios selectivos en placa como sigue:

- a. Agar XLD para el aislamiento de colonias típicas y ASB para aislamiento de colonias lactosa positivas y cualquier otro medio selectivo sólido complementario. El laboratorio puede seleccionar que medio utilizar, por ejemplo, se pueden elegir el EH, Agar Verde Brillante (BGA), Agar *Salmonella Shigella* (ASS), entre otros incluidos agares cromogénicos.
- b. El agar XLD se incubaba a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$, el segundo y tercer agar selectivo incubar de acuerdo con las recomendaciones contenidas en los manuales de medios de cultivo de los fabricantes.

Morfología colonial típica de Salmonella spp.

Seleccionar una o más colonias de *Salmonella* spp de acuerdo con las características siguientes, en cada agar selectivo:

XLD: colonias rosas con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras (**imagen 5.1**).

EH: colonias azul-verdes o azules, con o sin centro negro. Muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras, después de haber sido incubadas a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$.

ASB: colonias cafés, grises o negras; algunas veces pueden presentar brillo metálico y el medio circundante a la colonia generalmente es café al principio y a medida que se prolonga el tiempo de incubación, pueden aparecer de color negro. Después de haber sido incubadas a $36\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ durante $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ o hasta 48 h (**imagen 5.2**).

Agar BGA: las bacterias fermentadoras de la lactosa dan colonias amarillas (**imagen 5.3**).

Agar *Salmonella Shigella* (ASS): los organismos que fermentan lactosa producen ácido que, en presencia del indicador rojo neutro, propicia la formación de colonias de color rojo. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras, este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidas *Salmonella* y *Shigella*.

Si se presentan colonias típicas en ASB después de $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$ de incubación, seleccionar al menos 1 colonia. Si, por el contrario, no se observan colonias típicas a las $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$, reincubar las placas de ASB, otras $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Después de $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ de incubación, seleccionar si están presentes, al menos una colonia típica. Si las colonias seleccionadas, no dan reacciones típicas en TSI y LIA, el cultivo se considera como negativo a *Salmonella* spp.



5.1 Colonias típicas de *Salmonella* spp en agar XLD (muchos cultivos de *Salmonella* spp pueden producir colonias con un centro negro muy grande o completamente negras)



5.2 Colonias típicas de *Salmonella* spp en agar ASB (colonias café, grises o negras)



5.3 Colonias típicas de *Salmonella* spp en agar VB (colonias incoloras rosadas o fiusha, transparentes u opacas, sobre el medio coloreado de rosado a rojo)

Morfología colonial atípica de *Salmonella* spp.

En ausencia de colonias típicas sospechosas de *Salmonella* spp, buscar colonias atípicas con las características siguientes:

Agares EH y XLD: muy pocos cultivos atípicos de *Salmonella* spp, producen colonias rosa salmón o amarillas respectivamente con o sin centro negro. En ausencia de colonias típicas, en EH y XLD, seleccionar dos o más colonias atípicas.

Nota: existen algunas cepas de *Salmonella* spp con un comportamiento bioquímico diferente al resto del género, por ejemplo *S. paratyphi* A al crecer en XLD genera colonias rosas con el centro más oscuro y no produce H_2S . Otras salmonelas atípicas producen ácido a partir de la

lactosa y al crecer en XLD dan colonias amarillas con o sin el centro negro.

ASB: algunos cultivos producen colonias verdes con un halo oscuro muy pequeño. Si después de 48 h de incubación (como se explicó anteriormente), no hay colonias típicas sospechosas en ASB, seleccionar 2 o más colonias atípicas.

Cultivos control sugeridos

Además de los cultivos control positivos (*Salmonella typhimurium* ATCC14028), deben usarse controles adicionales para ayudar a la selección de colonias atípicas, se recomiendan: *S. diarizonae* (ATCC 12325) lactosa positivo, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

Selección de colonias para su confirmación

- Para la confirmación, tomar de cada agar selectivo al menos una colonia considerada como típica o en total tres colonias sospechosas si no existe la primera posibilidad.
- En casos epidemiológicos, identificar al menos cinco colonias sospechosas, si en una placa se encuentran menos de cinco colonias típicas o sospechosas, confirmar todas las colonias que se encuentren en el medio.
- Estriar cada colonia seleccionada en cualquier agar nutritivo, preferiblemente sin agua de condensación, de tal manera que permita el aislamiento de colonias. Incubar las placas inoculadas a 36 °C ± 1 °C durante 24 h ± 3 h.
- Utilizar cultivos puros para la confirmación por pruebas bioquímicas y serología.

I. Confirmación bioquímica

Para confirmar la presencia de *Salmonella* spp, se sugiere realizar las siguientes pruebas bioquímicas.

- A partir del agar nutritivo, con un asa recta estéril, tocar ligeramente el centro de la colonia seleccionada e inocular en tubos de agar inclinado de TSI y LIA. Sembrar por picadura en el fondo y estría en la superficie inclinada. Debido a que la reacción de descarboxilación de la lisina es estrictamente anaerobia, el fondo del medio de LIA, debe medir 4 cm y el bisel de al menos 2.5 cm.
- Mantener las placas de agares selectivos y nutritivos entre 2 °C - 8 °C, hasta la conclusión del análisis.
- Incubar los tubos de TSI y LIA a 36 °C ± 1 °C por 24 h ± 3 h. Dejar los tapones flojos de los tubos para mantener condiciones de aerobiosis mientras se incuban evitando excesiva producción de H₂S. Interpretar los cambios de color como se describe a continuación:

TSI: Fondo del medio

- Amarillo, glucosa positiva.
- Rojo o sin cambio de color, glucosa negativa.
- Negro, formación de sulfuro de hidrógeno.
- Burbujas o grietas en el medio, formación de gas debido a la fermentación de la glucosa.

TSI: Superficie inclinada

- Amarillo, lactosa y/o sacarosa positivos.
- Rojo o sin cambio de color, lactosa y/o sacarosa negativa.

Las colonias típicas de *Salmonella* spp, producen alcalinidad (color rojo) en la parte inclinada del medio y ácido (color amarillo) en el fondo; con producción de gas y cerca del 90 %

de los casos producen H_2S (ennegrecimiento del agar). Cuando alguna *Salmonella* spp lactosa positiva es aislada, el agar de TSI se torna completamente amarillo (**imagen 5.4**).



Imagen 5.4 Agar TSI (Las colonias típicas de *Salmonella* spp, producen alcalinidad (color rojo) en la parte inclinada del medio y ácido (color amarillo) en el fondo; con producción de gas y cerca del 90 % de los casos producen H_2S (ennegrecimiento del agar).

En LIA, *Salmonella* spp produce reacción alcalina (color púrpura) considerar como negativos los cultivos que produzcan claramente un color amarillo en el fondo del tubo. La mayoría de los cultivos de *Salmonella* spp producen H_2S en LIA (**imagen 5.5**).

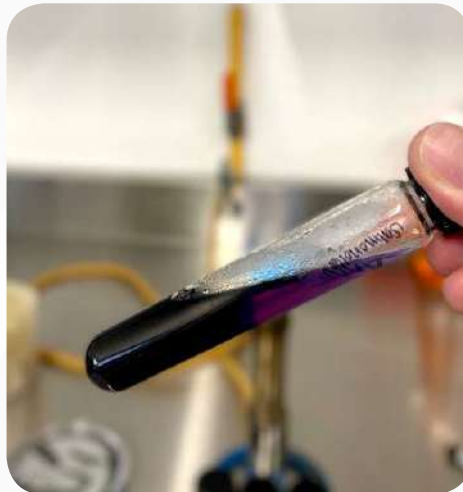


Imagen 5.5 Agar LIA (*Salmonella* spp produce reacción alcalina (color púrpura), la mayoría de los cultivos de *Salmonella* spp producen H_2S en LIA.

Todos los cultivos que den reacción alcalina en el fondo del medio de LIA, independientemente de la reacción que hayan dado en TSI, deben retenerse como

aislamientos presuntivos de *Salmonella* spp, para someterlos a pruebas bioquímicas adicionales y pruebas serológicas.

Para los cultivos de TSI que se consideren presuntivos para *Salmonella* spp, continuar como se indica en Identificación de *Salmonella* spp para determinar la especie, incluyendo *Salmonella arizonae*.

a) Prueba de ureasa (convencional)

Con un asa estéril inocular tubos de agar urea de Christensen. Debido a que algunas veces los tubos de agar urea de Christensen sin inocular, pueden virar a rojo púrpura (prueba positiva), debe incluirse, un tubo de este agar sin inocular como control en una prueba negativa. Para *Salmonella* spp no se produce cambio en la coloración (amarillo anaranjado). Incubar $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$.

b) Caldo l-lisina descarboxilasa

Si la prueba de lia fue satisfactoria, no es necesario repetirla. Si la reacción de lia fue dudosa, utilizar caldo lisina descarboxilasa para la determinación final de lisina descarboxilasa. Inocular el caldo con pequeña cantidad de cultivo, cerrar la tapa fuertemente e incubar a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. Las especies de *Salmonella* spp dan reacción alcalina por descarboxilación de la lisina (color púrpura del medio), la prueba negativa se interpreta por un color amarillo del medio. Si el medio aparece descolorido (ni púrpura, ni amarillo), agregar unas gotas de colorante púrpura de bromocresol al 0.2 % y leer nuevamente la reacción.

c) Detección de β -galactosidasa

Colocar la colonia seleccionada en un tubo conteniendo 0.25 mL de solución salina, agitar para obtener una suspensión homogénea, adicionar una gota de tolueno y agitar. colocar el tubo en un baño de agua a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ dejar reposar por aproximadamente 5 min. Adicionar 0.25 mL del agente de detección de la β -galactosidasa (onpg) y mezclar, colocar nuevamente el tubo en el baño de agua a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ y dejar por $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$, examinar el tubo a intervalos de tiempo.

Un color amarillo es indicativo de reacción positiva, la cual se hace evidente en aproximadamente 20 min. Si se utilizan discos comerciales, seguir las instrucciones del fabricante.

d) Prueba de indol

Inocular un tubo conteniendo 5 mL del caldo triptona con una suspensión homogénea de la colonia sospechosa. Incubar a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$ después de la incubación adicionar de 0.2 mL a 0.3 mL de reactivo de Kovac, sin agitar y resbalando por las paredes.

La formación de un anillo de color rojo indica una reacción positiva. Un anillo de color amarillo indica una reacción negativa.

e) Prueba de vp

Resuspender una asada de la colonia seleccionada en un tubo estéril conteniendo 3 mL del medio VP. Incubar $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$. Después de la incubación adicionar dos gotas de solución de creatina, tres gotas de solución α -naftol y al final dos gotas de solución de KOH, agitar después de cada reactivo, una reacción positiva tiene una coloración roja.

f) Identificación presuntiva del género Salmonella spp

Alternativamente se pueden utilizar pruebas bioquímicas miniaturizadas o métodos de biología molecular disponibles en el mercado para la identificación presuntiva de género *Salmonella* spp, se deberá utilizar un sistema adecuado basado en el sistema bioquímico descrito en esta sección. Estos sistemas bioquímicos deberán contar con validación y no deben ser usados como sustitutos de las pruebas serológicas. Inocular e incubar estos sistemas de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Interpretación de pruebas bioquímicas

Con los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas se puede consultar el **cuadro 5.1** para identificar a las colonias sospechosas.

Cuadro 5.1. Resultados de las distintas pruebas bioquímicas para la identificación de *Salmonella* spp

Pruebas	Cepas de <i>Salmonella</i>									
	<i>S. typhi</i>		<i>S. paratyphi A</i>		<i>S. paratyphi B</i>		<i>S. paratyphi C</i>		Otras cepas	
	Reacción	% ^b	Reacción	% ^b	Reacción	% ^c	Reacción	% ^c	Reacción	% ^b
TSI producción de ácido de la glucosa	+	100	+	100	+		+		+	100
TSI formación de gas de la glucosa	- ^d	0	+	100	+		+		+	92
TSI producción de ácido de la lactosa	-	2	-	100	-		-		-	1
TSI producción de ácido de sacarosa	-	0	-	0	-		-		-	1
TSI producción de sulfuro de hidrogeno	+	97	-	10	+		+		+	92
Hidrólisis de urea	-	0	-	0	-		-		-	1
Descarboxilación de la lisina	-	98	-	0	+		+		+	95
Reacción de b-galactosidasa	-	0	-	0	-		-		-	2 ^e
Reacción Voges-Proskauer	-	0	-	0	-		-		-	0
Producción de indol	-	0	-	0	-		-		-	1

^a Ewing, W.h. y Ball, M. M. The biochemical reactions of the genus *Salmonella*. National Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA, 1996.
^b este porcentaje indica que no todas las cepas de *Salmonella* muestran la reacción indicada puede ser más o menos. Estos porcentajes pueden variar dependiendo de los serotipos de intoxicación alimentaria y su lugar de procedencia.
^c los porcentajes no han sido encontrados en la literatura.
^d *Salmonella typhi* es anaerobio.
^e La *Salmonella* entérica subespecie *arizonae* puede ser positiva o negativa a la lactosa, pero siempre será b-galactosidasa positiva.

S. diarizonae (ATCC 12325) lactosa positivos, H₂S positivo y *S. abortus equi* (ATCC 9842), lactosa-negativo, H₂S-negativo; o *S. diarizonae* (ATCC 29934) lactosa-positivo, H₂S-negativo.

II. Pruebas serológicas

General

La aglutinación con el antisuero polivalente Poly A-I & Vi, puede usarse como resultado confirmatorio de la presencia de *Salmonella* spp para las cepas probadas por TSI y LIA, existen cepas que no aglutinan con el polivalente, pero que dan

reacciones típicas en TSI y LIA, para estas es necesario confirmar usando la batería completa de bioquímicas.

Eliminación de las cepas autoaglutinables

Deposite una gota de solución salina en un portaobjetos perfectamente limpio. Disperse con un asa, parte de la colonia a probar en la gota, de manera que se obtenga una suspensión homogénea y turbia, rote suavemente la lámina por 30 s a 60 s, observe el resultado sobre un fondo oscuro, preferiblemente con la ayuda de una lupa. Si las bacterias se agrupan en grumos de diferentes tamaños, la cepa se considera como autoaglutinable, deberán identificarse por pruebas bioquímicas complementarias y no someterse a la serotipificación.

Nota: también es posible dispersar parte de la colonia a analizar en una gota de agua y luego mezclar esta solución con una gota de la solución salina.

Detección de los antígenos Poly A-I & VI

Empleando una colonia pura no autoaglutinable, proceda, empleando una gota de la solución salina en una lámina de vidrio, disperse con el asa hasta obtener una suspensión homogénea y agregue una gota del antisuero O. Si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva del antisuero O en lugar de la solución salina, si se produce aglutinación, la reacción se considera positiva.

Para fines de vigilancia sanitaria, enviar el cultivo al laboratorio de referencia CCAyAC de la COFEPRIS para su identificación serológica o molecular.

Interpretación de los resultados

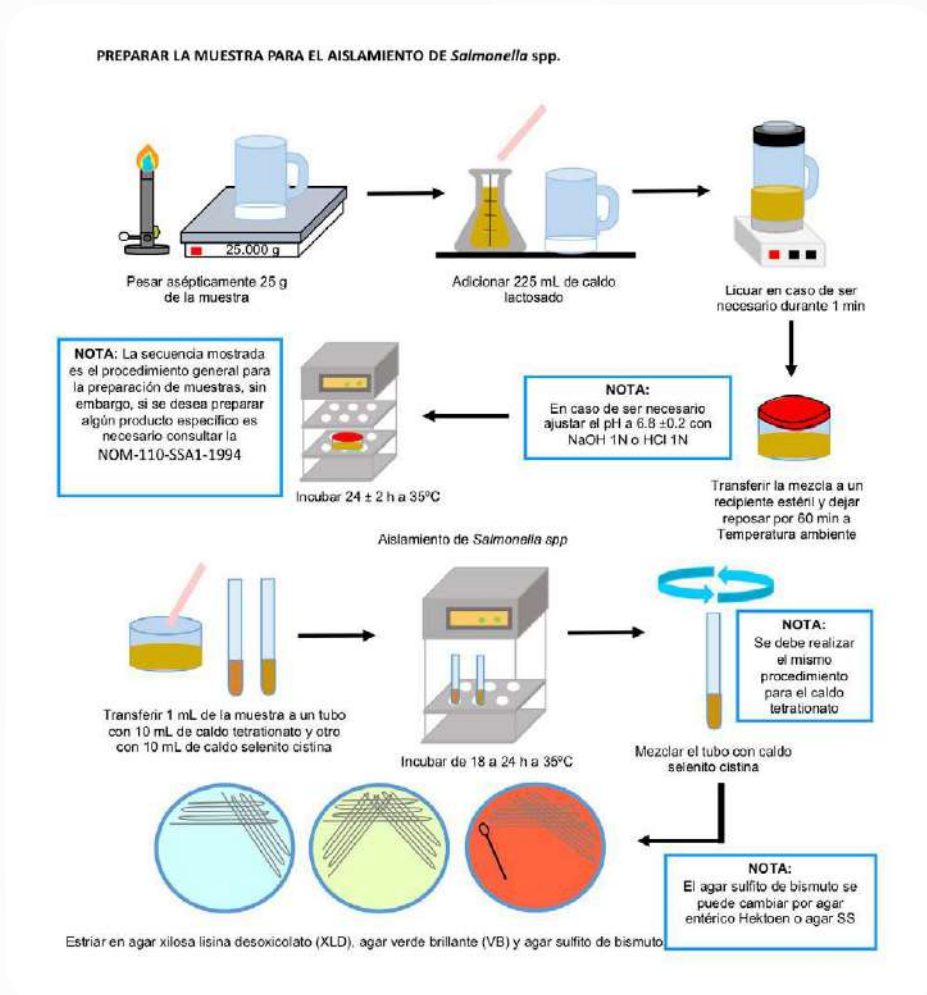
El informe de los resultados obtenidos se realiza de la siguiente manera:

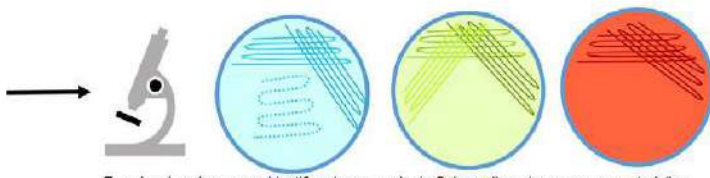
- a) Los cultivos determinados como presuntivos con las pruebas bioquímicas y confirmados por la serología, informar como: ***Salmonella spp* en 25 g: PRESENCIA.**

- b) Descartar los cultivos con resultados atípicos a partir de las pruebas bioquímicas miniaturizadas clasificadas como no *Salmonella* spp, informar: **Salmonella spp en 25 g: AUSENCIA.**
- c) Placas con agar XLD, ASB y el tercer medio selectivo sin desarrollo y/o colonias atípicas, informar: **Salmonella spp en 25 g: AUSENCIA.**
- d) En caso de que la cantidad sea menor a 25 g se debe reportar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp en la porción de ensayo (g o mL) de producto utilizado.
- e) Para los casos en los que se analiza una pieza de producto reportar como presencia o ausencia por piezas analizadas.

En el **esquema 5.1**, se muestra la metodología para realizar el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.

Esquema 5.1. Pasos para realizar el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp





Examinar las placas para identificar la presencia de *Salmonella* en base a sus características

Agar XLD:
Colonias rosas o rojas con o sin centro negro

Agar VB:
Colonias rojas o rosas rodeadas por medio enrojecido

Agar entérico Hektoen: Colonias verdes o azulverdes con o sin centro negro enrojecido

Agar sulfito de bismuto: Colonias café, grises o negras; con o sin brillo metálico y rodeadas de un halo café

Agar SS:
Colonias translúcidas



Agar XLD



Agar VB



Agar entérico Hektoen



Agar sulfito de bismuto



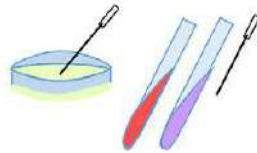
Agar SS

NOTA:

Lo más deseable es no tener presencia de colonias típicas de *Salmonella*, sin embargo, de no ser así se debe realizar una identificación bioquímica de la(s) colonias típicas como se indica a continuación:

Identificación bioquímica

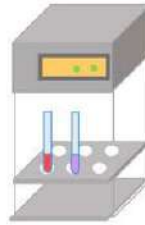
Seleccionar al menos dos colonias típicas bien aisladas de cada medio selectivo



Inocular dos tubos

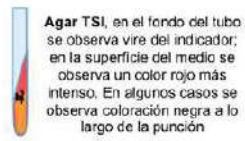
- Agar triple azúcar hierro (TSI)
- Agar hierro lisina (LIA)

Por estría en la superficie inclinada



Incubar por 24 ± 2h a 35°C

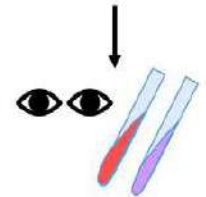
Tubos presuntamente positivos para *Salmonella*



Agar TSI, en el fondo del tubo se observa vire del indicador; en la superficie del medio se observa un color rojo más intenso. En algunos casos se observa coloración negra a lo largo de la punción



Agar LIA, se observa intensificación del color púrpura, coloración negra a lo largo de la punción
Negativo
Presencia de coloración amarilla en el fondo del agar

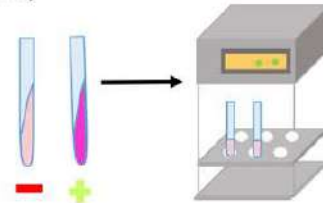


Observar el crecimiento en los tubos

Prueba de Ureasa (convencional)



Inocular tubos de caldo urea



Prueba positiva – Color de medio original
Prueba negativa – Vire púrpura

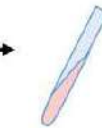
Prueba de Ureasa (rápida)



Inocular tubos de caldo urea (rápida)



Incubar 2 h a $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ en baño de agua

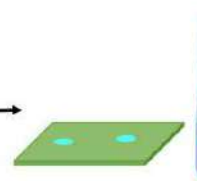


IDENTIFICACIÓN SEROLÓGICA

Ensayo de los antígenos somáticos de *Salmonella* (Antisero polivalente O)



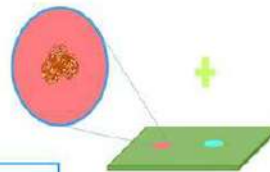
Colocar dos gotas de solución salina estéril



Suspender en cada gota, una porción del cultivo en TSI



Agregar a una de ellas una gota del antisuero polivalente somático (O) y mezclar



Cualquier grado de aglutinación se considerará positivo



Agitar inclinando la lamina hacia atras y adelante durante aprox 1 min

NOTA:
En caso de que ambas gotas presenten aglutinación la prueba no es definitiva y se deben realizar pruebas bioquímicas complementarias indicadas en la NOM-243-SSA1-2010

Literatura citada

1. Secretaría de Salud. (2014). *Productos y Servicios. Métodos de Prueba Microbiológicos. Determinación de Microorganismos Indicadores. Determinación de Microorganismos Patógenos.* (NOM-210-SSA1-2014). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0
2. Secretaría de Salud. (2010). *Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.* (NOM-243-SSA1-2010). <https://dof.gob.mx/normasOficiales/4156/salud2a/salud2a.htm>

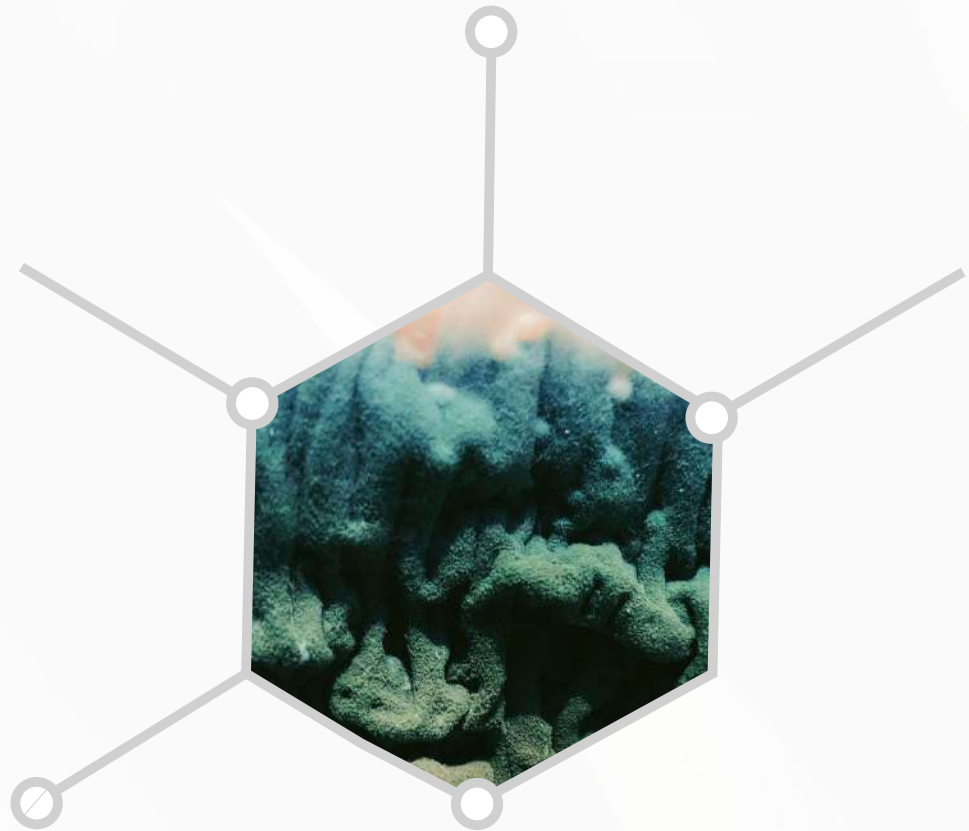
A continuación, en el **video 5.1**, se muestra la técnica para el aislamiento e identificación de *Salmonella* spp.



Video 5.1

Capítulo 6

Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimento de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994



Figueiredo, B. (2019). *Coral gris* [Fotografía].
Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/coral-gris-X4P6B5dKJ1Y>

Introducción



Millar, S. (2020). *Textil floral blanco y azul* [Fotografía]. Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/textil-floral-blanco-y-azul-6tF2unOGK1c>

El moho produce uno de los cambios más visibles de la descomposición de alimentos, vive en la materia vegetal o animal y contiene esporas que pueden ser transportadas por el aire, el agua o los insectos. Muchos mohos son especies microscópicas del reino fungi, que suelen crecer en formas de filamentos. Los mohos se encuentran sobre todo en alimentos como la fruta, verdura, pan, quesos y mermeladas abiertas, pueden diferenciarse en distintos tipos en función de cómo se comportan.

Los mohos son, igual que las bacterias y las levaduras, un agente causante de deterioro de alimentos, si las condiciones ambientales son cálidas y húmedas, el crecimiento de mohos se ve favorecido a través de las esporas. *Aspergillus* spp, *Mucor* spp o *Penicillium* spp son algunos de los tipos de mohos más comunes; los filamentos que se forman, las hifas, fabrican enzimas que descomponen las moléculas más duras.

Debe tenerse en cuenta que, cuando se aprecian los mohos en un alimento, significa que está seriamente afectado en su interior, pero no todos los mohos son iguales; de la misma manera que unos son perjudiciales y tóxicos, otros tienen una finalidad fundamental en la producción de alimentos como el queso.

Los mohos perjudiciales aparecen por lo general, en forma de manchas verdes, negras o rojas, muchos están provocados por *Penicillium digitatum* que, en la cáscara de los cítricos, aparecen con sus características esporas verdeazuladas que se desarrolla sobre todo a temperaturas de unos 20 °C y humedad alta y suele introducirse en la fruta a través de heridas. Este tipo de mohos son grandes expertos de la reproducción.

En el caso del que afecta al pan, *Rhizopus stolonifer*, este se percibe porque aparecen puntitos negros que se llaman esporangios, es decir, cápsulas con esporas.

En el caso particular del pan de caja, los mohos suelen aparecer si se sobrepasa la fecha de caducidad, motivo suficiente para no consumirlo. A medida que los mohos crecen, se forman esporas, pequeñas partículas visibles que le confieren el color verdoso, blanco o grisáceo al alimento. Esto es sinónimo de que los mohos han penetrado muy en el interior del alimento, estos alimentos no son aptos para el consumo.

Para minimizar el crecimiento de este tipo de hongos en los alimentos, la limpieza es fundamental, esto es la elaboración de los mismos bajo las Buenas Prácticas de Manufactura. En el hogar y en la industria, las esporas pueden acumularse en la nevera, los utensilios de cocina, el famoso trapo de cocina, por tanto, es muy importante mantenerlos limpios y secos, para evitar al máximo el riesgo de contaminación cruzada.

Algunos mohos son productores de sustancias tóxicas, como las micotoxinas, estas sustancias aparecen sobre todo en cereales y frutos secos. Según datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), “el 25 % de los cultivos de todo el mundo están afectados por las micotoxinas”. En alimentos vegetales, los mohos pueden formar toxinas de elevada actividad patogénica, por lo que, si se aprecian las colonias características algodonosas de mohos, los alimentos afectados deberán ser rechazados, al no ser ya aptos para consumo humano. Algunas de las principales micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por hongos del género de *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son:

- **Aflatoxinas:** se encuentran sobre todo en cereales, oleaginosas, algodón, frutos secos y productos lácteos, el consumo de granos o alimentos contaminados afecta al ser vivo que los consume, como es el caso de ganado porcino, bovino, ovino y aves. Cuando en un alimento, se dan las condiciones para que un hongo productor de aflatoxinas las produzca, su eliminación por proceso es difícil, aún no se ha diseñado un proceso efectivo de descontaminación de un alimento contaminado, las toxinas son estables al calor, lo cual hace que su eliminación sea compleja.

- **Fumonisinias:** presentes en los cereales, chiles secos y en animales como cerdos.
- **Ocratoxinas:** se detectan en granos de cereales, café y uvas, también afecta al ganado porcino.
- **Tricotecenos:** afectan al trigo, cebada, avena y maíz, así como ganado lechero, aves de corral y cerdos. Los mohos del género *Fusarium*, que suelen estar presentes en el suelo, pueden producir dos tipos de toxinas, las estrogénicas (zearalenona y zearalenol) y las no estrogénicas (tricótecos y deoxinivalenol), que afectan sobre todo al maíz y otros cereales.

El control y prevención de micotoxinas pasa, en la mayoría de los casos, al fijar las mejores condiciones de almacenamiento óptimas: buena ventilación y controles de temperatura y humedad en el alimento a ser almacenado.

En el caso de alimentos procesados, las Buenas Prácticas de Manufactura durante el proceso de elaboración, el empleo de antimicrobianos en algunas formulaciones, al igual que condiciones de almacenamiento recomendadas para el producto debe tenerse en cuenta que las micotoxinas suelen crecer en ambientes con temperaturas templadas (entre los 24 °C y los 28 °C) y una tasa de humedad elevada. En el ámbito doméstico, la prevención pasa por eliminar el agua de cocción de la pasta, por ejemplo, y seguir unas correctas condiciones de higiene durante la preparación de alimentos.

Micotoxinas

Las micotoxinas son pequeñas moléculas orgánicas de bajo peso, bioactivas, derivadas del metabolismo secundario de numerosas especies de hongos filamentosos, es importante señalar que estos compuestos regularmente no son esenciales para el crecimiento del hongo, pero se hipotetiza que en determinadas circunstancias le confieren ventajas al microorganismo que las secreta, las condiciones para que estas sustancias se produzcan pueden variar, dependiendo del tipo de sustrato, temperatura, humedad y disposición de nutrientes, pero se sabe que durante la fase de crecimiento logarítmica tardía es cuando se secretan en mayor cantidad. Los mohos son capaces de producir más de una micotoxina, y algunas micotoxinas son producidas por más de una especie.

La mayoría de estos compuestos se ingieren en alimentos como cereales, semillas, frutas, verduras, especias, carne, leche, jugos e incluso productos fermentados como el vino, sin que el consumidor pueda notar cambios en el aspecto u olor de los mismos cuando se encuentran contaminados por estas moléculas, pues no necesariamente los hongos estarán presentes o viables en ellos. Los efectos de las micotoxinas son diversos, algunas actúan como inmunosupresores, carcinogénicos, mutágenos, teratogénicos, otras llaman la atención por su actividad parecida a la de ciertas hormonas como los estrógenos.

La concentración de micotoxinas que consume un individuo por día generalmente es baja, el problema radica cuando estos compuestos suelen acumularse en diferentes órganos y tejidos, por lo que las concentraciones que se pueden alcanzar con el tiempo en el organismo tienden a ser elevadas, y el daño se manifiestan después un periodo prolongado de consumo.

Se han descrito más de 400 tipos de micotoxinas, sin embargo, las más estudiadas son las aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisinas, zearalenona y patulina.

Las aflatoxinas son producidas por *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*, como ya se mencionó, son metabolitos secundarios de estos hongos y presentan una estructura termoestables, es decir, no se destruyen por aplicación de calor, se les ha nombrado como B₁, B₂ G₁ y G₂ por la fluorescencia que presentan en capa fina de gel (B por *blue*, azul en inglés, ya que fluorescen azul bajo la luz ultravioleta) y G por *green* (verde en inglés, ya que fluorescen verde bajo la luz ultravioleta), además la M₁ (M por haber sido detectada en leche, *milk* en inglés), conocida como la aflatoxina de la leche, es un compuesto metabólico hidroxilado derivado de la aflatoxina B₁. La toxicidad de estos compuestos se ha relacionado con cáncer hepático.

En cuanto a las ocratoxinas, las producen sobre todo *Aspergillus ochraceus* y *Penicillium verrucosum*, estas micotoxinas como otras, se pueden encontrar de forma

abundante en diversidad de alimentos, por lo que el consumo por animales y personas es frecuente, este compuesto se conoce por su capacidad cancerígena, inmunotóxica, neurotóxica y de forma particular por ser altamente nefrotóxica.

Las fumonisinas son secretadas por varias especies de *Fusarium*, como *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, también las produce *Aspergillus niger*, regularmente se han detectado en maíz y otros granos como el trigo, centeno, arroz, cebada, así como las harinas elaboradas a partir de estos. Se conocen más de quince homólogos de fumonisinas caracterizadas como A, B, C y P, siendo las fumonisinas B₁ las más tóxicas.

La patulina es una micotoxina producida por especies de los géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys* y especialmente por la especie *P. expansum*. Dentro de los efectos que la patulina produce está su capacidad mutágena, neurotóxica, inmunotóxica, genotóxica, además de que ocasiona problemas gastrointestinales.

La contaminación por micotoxinas en los alimentos, es un problema de salud pública que no debe ser subestimado, se requiere atender las recomendaciones de los organismos internacionales que se encargan de regular y estandarizar los límites máximos permisibles para cada tipo de micotoxinas, así como apearse a los protocolos o metodologías para su detección en los alimentos destinados para consumo humano y animal, lo cual puede consultarse en la regulación vigente en la *Norma general para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos y piensos* contenido en el Codex Alimentarius de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. En México, su contenido en alimentos como cereales, semillas y leche está normado en las Normas Oficiales Mexicanas correspondientes y en la Norma Mexicana de nuez pecanera:

- 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.

- NOM-243-SSA1-2010, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.
- NMX-FF-093-SCFI-2011 Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – nuez pecanera [*Carya illinoensis*, (Wangenh) K. Koch] sin cáscara – Especificaciones y métodos de prueba (CANCELA A LA NMX-FF-093-1996-SCFI).

Fundamento de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994

El método de cuantificación de mohos y levaduras en alimentos se basa en inocular una cantidad conocida de muestra de prueba en un medio selectivo específico, acidificado a un pH 3,5 e incubado a una temperatura de 25 ± 1 °C, dando como resultado el crecimiento de colonias características para este tipo de microorganismos (**imagen 6.1**).



Imagen 6.1 Agar dextrosa papa

Materiales, reactivos y equipos medios de cultivo

- Agar dextrosa papa
- Agua peptonada
- Ácido tartárico al 10 %

Nota: la preparación de los medios se puede consultar en la **NOM-111-SSA1-1994, Bienes y Servicios.**

Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimento.

Materiales

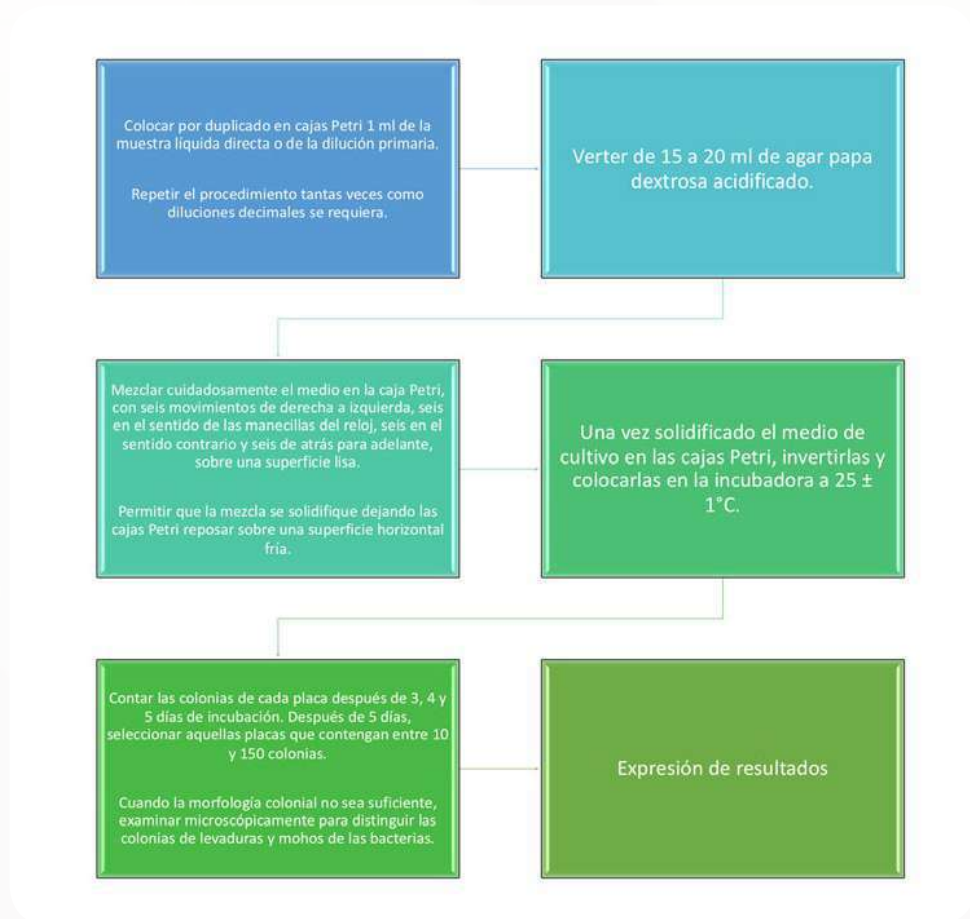
- Pipetas 10 mL
- Pipetas 1 mL
- Pipetas 2 mL
- Cajas de Petri de 90 o 100 mm de diámetro x 15 mm de espesor
- Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca
- Cuchillos
- Pinzas
- Tijeras
- Cucharas
- Espátula

Aparatos

- Horno que alcance los 170 °C
- Incubadora 25 °C
- Autoclave
- Baño María que alcance los 45 °C
- Contador de colonias de campo oscuro, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador
- Registrador mecánico o electrónico
- Microscopio óptico
- Potenciómetro con escala mínima de 0.1 unidades de pH a 25 °C
- Licuadora de alimentos

En el **diagrama 6.1**, se muestra los pasos a seguir, para el aislamiento de mohos y levaduras, después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 6.1. aislamiento de mohos y levaduras



I. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo con lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico (**Anexo 6.1**).

Procedimiento

- Colocar por duplicado en cajas Petri 1 mL de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril o punta de pipeta volumétrica estéril (**imagen 6.2**).

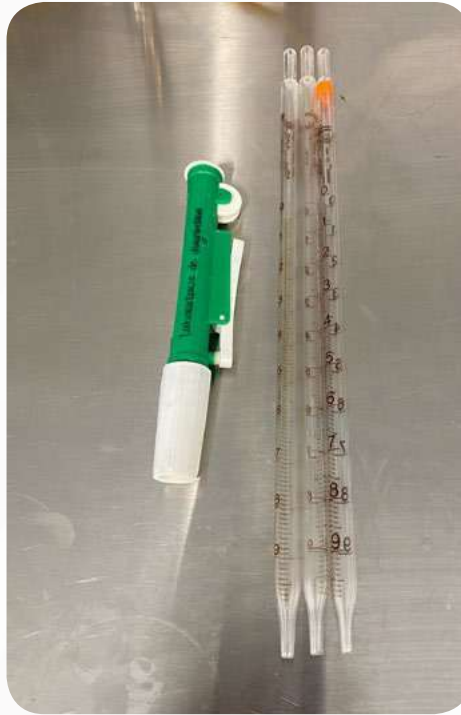


Imagen 6.2 Pipetas de vidrio estériles

- Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución. Normalmente se preparan tres o cuatro diluciones (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}).
- Verter de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado, (cantidad suficiente de agar para cubrir la caja Petri y que esta tenga aproximadamente 0.5 cm de profundidad) el agar debe estar fundido y mantenerse a 45 ± 1 °C en un baño de agua, se debe realizar en un ambiente estéril, para evitar que el medio de cultivo se contamine; después de verter el medio, tapar la caja Petri. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que es vertido el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos (para evitar que el medio de cultivo se solidifique en el matraz Erlenmeyer).
- Mezclar cuidadosamente el medio en la caja Petri, con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en el sentido contrario y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa, esto se realiza con el objeto de que el grosor en la caja Petri, sea homogéneo en la caja. Permitir que la mezcla se solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
- Preparar una caja control con 15 mL de medio, para verificar la esterilidad.

- Una vez solidificado el medio de cultivo en las cajas Petri, invertirlas y colocarlas en la incubadora a 25 ± 1 °C.
- Contar las colonias de cada placa después de **tres, cuatro y cinco días** de incubación. Después de **cinco días**, seleccionar aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, considerar los conteos de cuatro días de incubación y aun de tres días. En este caso, informar el periodo de incubación de tres o cuatro días en los resultados del análisis (**imagen 6.3**).

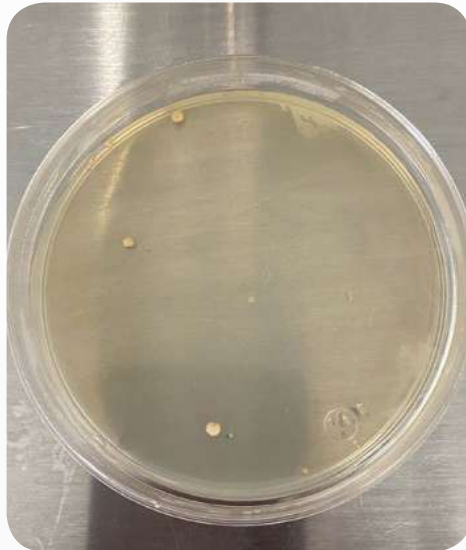


Imagen 6.3 Colonias de levaduras después de 5 días de incubación

- Si es necesario, cuando la morfología colonial no sea suficiente, examinar microscópicamente para distinguir las colonias de levaduras y mohos de las bacterias (**imagen 6.4**).

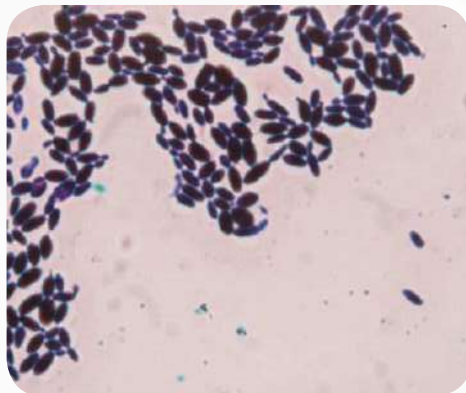
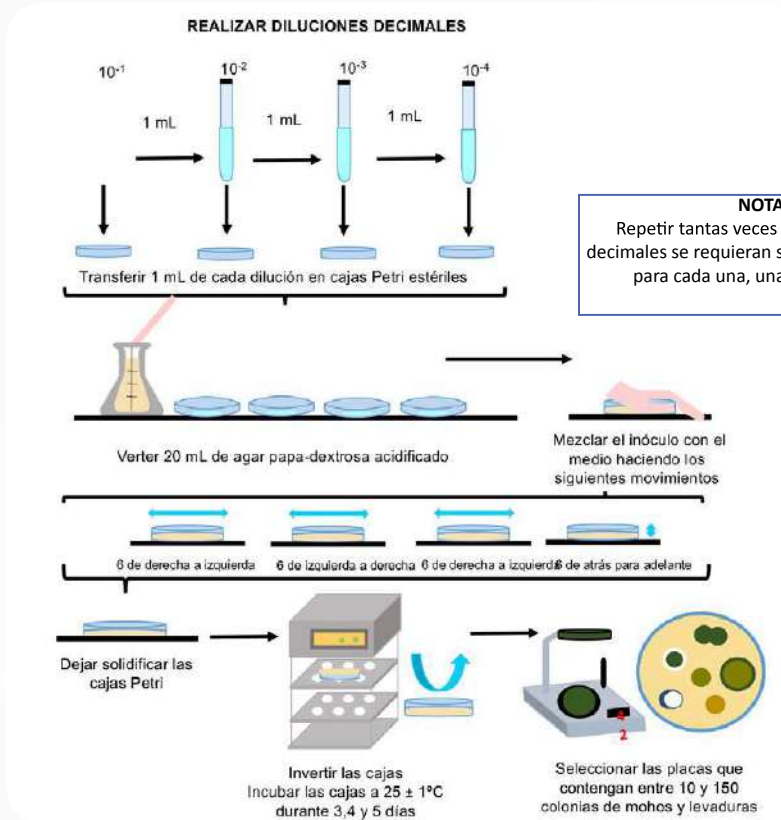


Imagen 6.4 Levaduras teñidas con tinción de Gram

En el **esquema 6.1** se muestra la secuencia correspondiente al método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Esquema 6.1 cuenta de mohos y levaduras en alimento



II. Expresión de resultados

Cálculo del método

Considerar las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución, tomando en consideración los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados (**Anexo 6.2**).

III. Informe de la prueba

Informar:

- Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de mohos en agar papa - dextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante cinco días.
- Unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o mL) de levaduras en agar papa-dextrosa acidificado, incubadas a 25 ± 1 °C durante cinco días.

Anexo 6.1

Preparación de la muestra de acuerdo con lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico.

I. Preparación de la dilución primaria

1. A partir de muestras líquidas

- Para muestras líquidas no viscosas (agua, leche, refrescos, etc.) en las cuales la distribución de microorganismos es homogénea o fácilmente homogeneizable por medios mecánicos (agitación, etc.).
- Para muestras congeladas de un alimento originalmente líquido o licuable, fundir por completo en baño de agua de 40 °C a 45 °C un tiempo máximo de 15 minutos y homogeneizar agitando vigorosamente.
- Para la parte líquida de una muestra heterogénea la cual sea considerada suficientemente representativa de la muestra total (por ejemplo, la fase acuosa de grasas animales y vegetales).

- Agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de siete segundos. Tomar 1 mL de la muestra y diluir con 9 mL del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a esta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- Siempre que la cantidad de muestra lo permita, tomar alícuotas mayores, por ejemplo, volúmenes de 10 u 11 mL, diluidos con 90 u 89 mL, de la misma forma que se describió anteriormente.

Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados, ya que se está diluyendo la muestra y el no considerarlo, dará un dato equivocado de la cuenta de microorganismos).

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado solo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

II. Preparación de las diluciones decimales adicionales

- Transferir 1 mL o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 mL de la dilución primaria 1 + 9 (10⁻¹), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera que se describe en inciso a) del apartado de la preparación de la dilución primaria a partir de muestras líquidas del anexo 1.

- La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base en los resultados de análisis previos y de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.
- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10 % de la capacidad total de la pipeta.
- Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.
- Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.

En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0.1 mL o 0.1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.

El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado es:

- Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 mL de la dilución más alta.
- Para la técnica de cuenta en placa, considerar

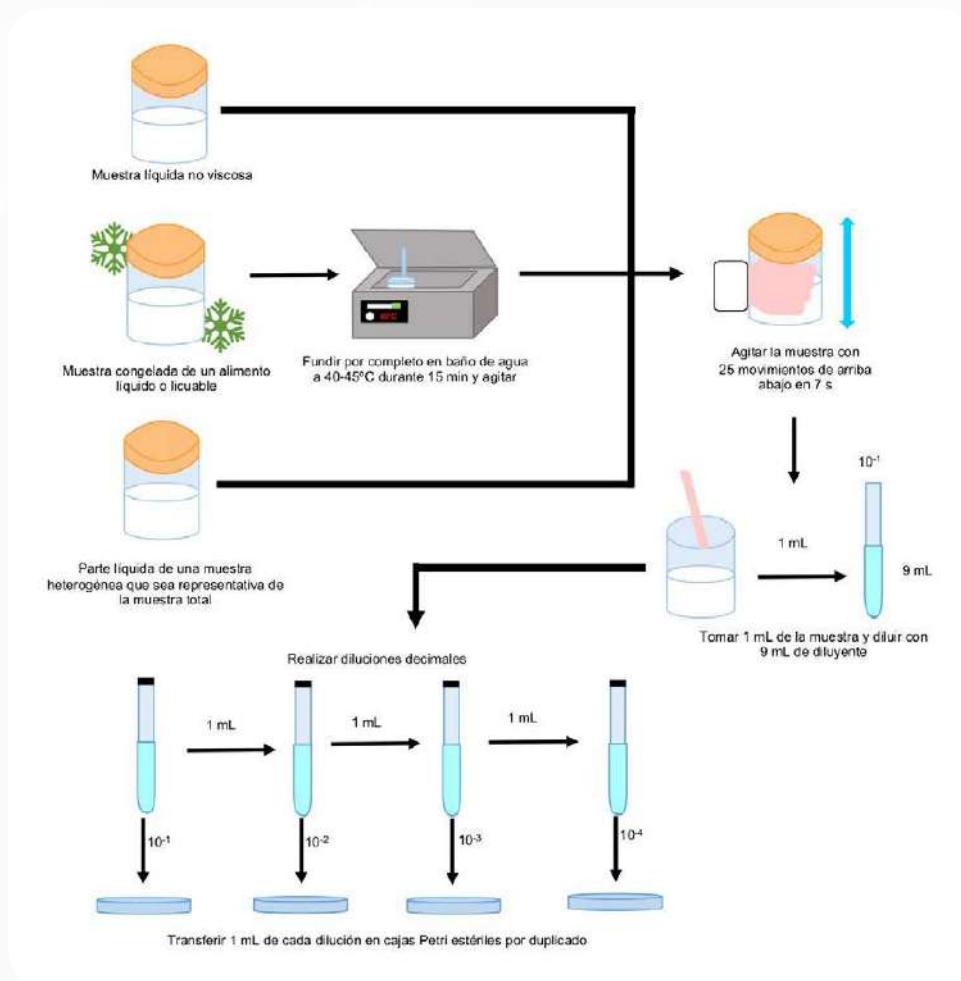
aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

III. Duración del procedimiento

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

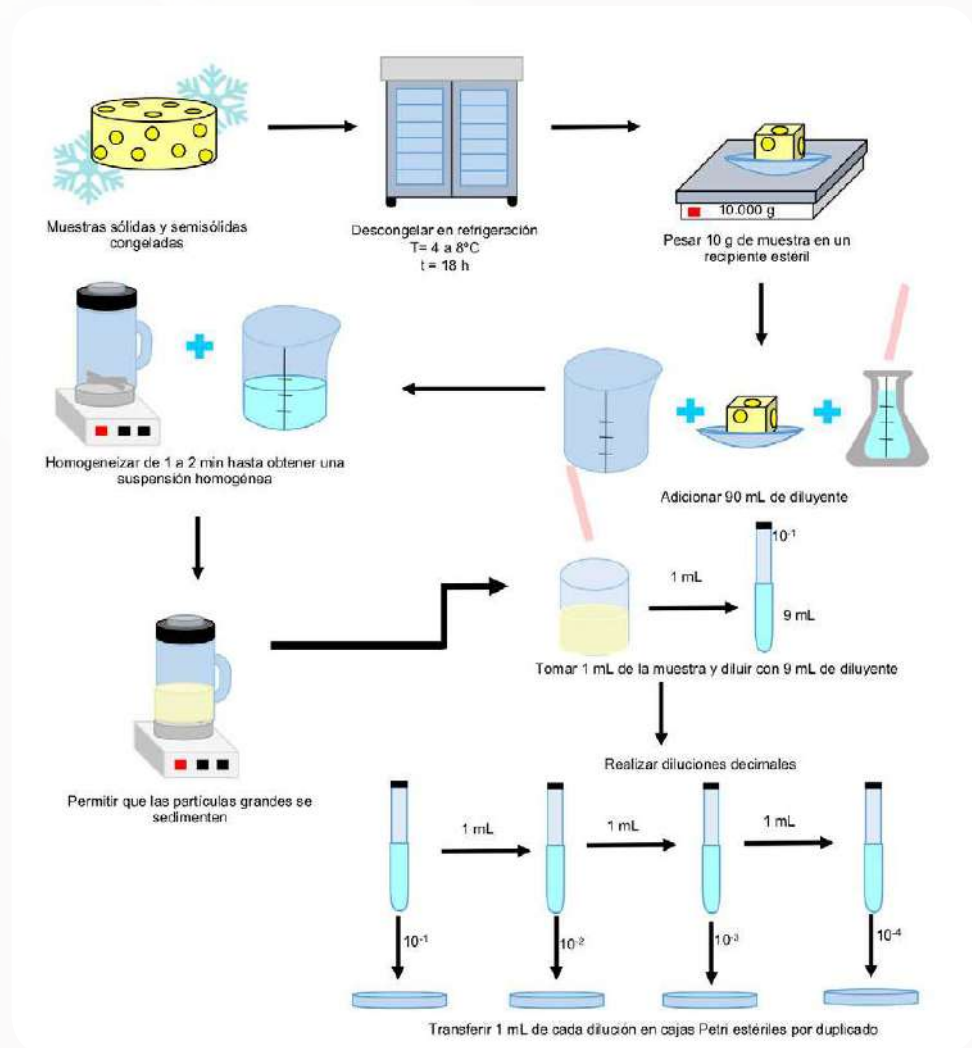
En el **esquema 6.2**, se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras líquidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la **NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico**.

Esquema 6.2. Preparación de muestras líquidas



En el **esquema 6.3**, se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras sólidas o semisólidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la **NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**

Esquema 6.3. Preparación de muestras sólidas o semisólidas



Anexo 6.2

Cálculo del método con base en los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa, para la expresión de resultados, este conteo también se realiza para mohos y levaduras.

Expresión de resultados

I. Cálculo del método

Después de la incubación, contar las placas que se encuentren en el intervalo de 25 a 250 colonias, usando el contador de colonias y el registrador. Las placas de al menos una de tres diluciones deben estar en el intervalo de 25 a 250. Cuando solo una dilución está en el intervalo apropiado, (ejemplo 1), calcular la cuenta promedio por gramo o mililitro de dicha dilución y reportar.

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
1	>250 ^a >250	178 190	16 17	180 000

^a Cuenta por arriba de 250 colonias.

Cuando dos diluciones están en el intervalo apropiado, determinar la cuenta promedio dada por cada dilución antes de promediar la cuenta de las dos diluciones para obtener la cuenta en placa por gramo o mililitro, (ejemplo 2).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
2	>250	220 238	25 28	250 000

Con el fin de uniformar los criterios para el reporte de las cuentas en ensayos donde las placas presenten situaciones no contempladas en los ejemplos anteriores, se presentan las siguientes guías:

Placas con menos de 25 colonias. - Cuando las placas corridas para la menor dilución muestran cuentas de menos de 25 colonias, contar el número de colonias presentes en dicha dilución, promediar el número de colonias y multiplicar por el factor de dilución para obtener el valor estimado de cuenta en placa. Aclarar en su informe esta situación agregando la leyenda "valor estimado", (ejemplo 3).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
3	18 14	2 0	0 0	1600 ^b

^b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

Placas con más de 250 colonias. - Cuando el número de colonias por placa exceda de 250, contar las colonias en aquellas porciones de la placa que sean representativas de la distribución de colonias.

Contar, por ejemplo, una cuarta parte o una mitad del área de la caja y multiplicar el valor obtenido por 4 o 2, respectivamente. Si solamente pueden contarse algunos cuadros, considerar que el fondo de una caja Petri de 100 mm de diámetro contiene 65 cuadros de la cuadrícula del contador. Aclarar en el informe esta situación agregando la leyenda “valor estimado”, (ejemplo 4).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
4	>250	>250	512	5 000 000 ^b 290 000
	>250	>250	495	
	>250	240	32	

b Debe aclararse “valor estimado” por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

Colonias extendidas. - Las colonias extendidas pueden presentarse en las siguientes formas:

- Colonias de cadenas de colonias no separadas claramente entre sí, que parecen ser causadas por la desintegración de un cúmulo de bacterias.
- Colonias que se desarrollan en película entre el agar y el fondo de la caja.
- Colonias que se desarrollan en película en la orilla de la caja sobre la superficie del agar.
- Colonias de crecimiento extendido y en algunas ocasiones acompañadas de inhibición del crecimiento, que en conjunto exceden el 50 % de la caja o represión del crecimiento que por sí mismo excede el 25 % de la superficie de la caja.
- Cuando es necesario contar en cajas que contienen colonias extendidas que no están incluidas en el punto 10 contar cualquiera de los tipos a), b) o c), como provenientes de una sola fuente. En el caso de las colonias del tipo a), si la caja contiene una sola cadena, contar como una sola colonia; si la caja contiene varias cadenas que parecen originarse de fuentes separadas, contar cada cadena como colonia individual. No contar cada colonia de la cadena individualmente. Las colonias del tipo b) y c) generalmente se observan como crecimiento diferenciable de otras colonias y se cuentan como tales. Los crecimientos tipo d), reportarlos como crecimiento extendido.

En caso de que una dilución se encuentre dentro del rango y otra dilución presente colonias de crecimiento extendido, reportar la dilución en la que se pueden contar las colonias, (ejemplo 5).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
5	>250	235	Crecimiento extendido	

Placas sin colonias. - Cuando las placas de todas las diluciones no muestran colonias, reportar la cuenta en placa como menor que una vez el valor de la dilución más baja usada, (ejemplo 6).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
6	0	0	0	<100 c

c. Debe informarse de acuerdo a la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

Placas corridas por duplicado, una con crecimiento dentro del intervalo adecuado y otra con más de 250 colonias. - Cuando una placa tiene entre 25 y 250 colonias y su duplicado más de 250 colonias, contar ambas placas incluyendo la que está fuera del intervalo para determinar la cuenta en placa, (ejemplo 7).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
7	>250	240	24	250 000
	>250	268	19	

Placas corridas por duplicado, una placa de cada dilución dentro del intervalo de 25 a 250 colonias. - Cuando una placa dentro de diferentes diluciones contiene el número de colonias especificadas en el intervalo, contar el número de colonias de las cuatro placas para calcular la cuenta en placa, (ejemplo 8).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
8	>250	216	23	280 000
	>250	262	42	

Placas corridas por duplicado, ambas placas de una dilución dentro del intervalo de 25 a 250 y solo una de la otra dilución dentro del mismo. Contar las cuatro cajas incluyendo aquella con menos de 25 o más de 250 colonias, para calcular la cuenta en placa, (ejemplo 9).

EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
9	>250	215	20	230 000
	>250	235	26	

Después de contabilizar las colonias en las placas seleccionadas, multiplicar por la inversa de la dilución para obtener el número de UFC por mililitro o gramo de la muestra. Redondear la cifra obtenida en la cuenta de manera que solo aparezcan dos dígitos significativos al inicio de esta cifra. Para redondear, elevar el segundo dígito al número inmediato superior cuando el tercer dígito de la derecha sea cinco o mayor (por ejemplo: 128 redondear a 130). Si el tercer dígito es cuatro o menos, reemplazar el tercer dígito con cero y el segundo dígito mantenerlo igual (Por ejemplo: 2417 a 2400).

En el **cuadro 6.1** se muestra el cálculo de los valores de la cuenta en placa.

Cuadro 6.1 Cálculo de los valores de la cuenta en placa

CÁLCULO DE LOS VALORES DE LA CUENTA EN PLACA (ENSAYOS POR DUPLICADO)				
EJEMPLO NÚMERO	COLONIAS CONTADAS			UFC/g o mL
	1:100	1:1000	1:10000	
1	>250 ^a	178	16	180 000
	>250	190	17	
2	>250	220	25	250 000
		238	28	
3	18	2	0	1600 ^b
	14	0	0	
4	>250	>250	512	5 000 000 ^b
	>250	>250	495	
	>250	240	32	
5	>250	235	Crecimiento extendido	
6	0	0	0	<100 ^c
7	>250	240	24	250 000
	>250	268	19	
8	>250	216	23	280 000
	>250	262	42	
9	>250	215	20	230 000
	>250	235	26	
10	>250	275	32	270 000
	>250	225	26	

^a Cuenta por arriba de 250 colonias.

^b Debe aclararse "valor estimado" por encontrarse los valores fuera del intervalo de 25 a 250.

^c Debe informarse de acuerdo con la menor dilución ensayada y contada, en este caso 1:100.

Literatura citada

1. Mouyna, I & Latgé, P. (2002). Cell wall of aspergillus fumigatus: structure, biosynthesis, and role in host-fungus interactions in A. Calderone y L. Cihlar (Eds.), *Fungal pathogenesis: principles and clinical applications* (Vol. 14, pp. 15-532). Marcel Dekker.
2. De Almeida, J. & Figueiredo, L. (2018). The role of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in production of fermented products -Mini Review. *Annals of Nutrition and Food Science*, 1, 1-2. <https://www.remedypublications.com/open-access/the-role-of-the-yeast-saccharomyces-cerevisiae-in-production-of-fermented-products-mini-review-569.pdf>
3. Sanzani, M., Reverberi, M. & Geisen, R. (2016). Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tolos to manage postharvest contamination. *Postharvest biology and technology*, 122, 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.07.003>
4. Scharf, D., Heinekamp, T. & Brakhage, A. (2014). Human and plant fungal pathogens: The role of secondary metabolites. *Plos Pathogens*, 10, 1-3. <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.ppat.1003859>
5. Hof, H. (2016). Mycotoxins in milk for human nutrition: cow, sheep and human breast milk. *Infectious Diseases*, 4, 1-5. <https://www.egms.de/static/en/journals/id/2016-4/id000021.shtml>
6. Assunção, R. & Viegas, S. (2020). Mycotoxin exposure and related Diseases. *Toxins*, 12(3), 172. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7150930/>
7. Claeys, L., Romano, C., De Ruyck, K., Wilson, H., Fervers, B., Korenjak, M., Zavadil, J., Gungter, M., De Saeger, S., De Boevre, M. & Huybrechts, I. (2020). Mycotoxin exposure and human cancer risk: A systematic review of epidemiological studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(4), 1449-1464. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12567>

8. Paterson, R. & Lima, N. (2017). Thermophilic Fungi to Dominate Aflatoxigenic/Mycotoxigenic Fungi on Food under Global Warming. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(2), 199. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020199>
9. Martínez, M., Vargas, L. y Gómez, V. (2013). Aflatoxinas: incidencia, impactos en la salud, control y prevención. *Biosalud*, 12(2), 89-109. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502013000200008
10. Kamle, M., Mahato, D., Devi, S., Lee, K., Kang, S. & Kumar, P. (2019). Fumonisin: Impact on agriculture, food, and human health and their management strategies. *Toxins*, 11(6), 328. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6628439/>
11. Hammami, W., Al-Thani, R., Fiori, S., Al-Meer, S., Atia, F., Rabah, D., Migheli, Q. & Jaoua, S. (2017). Patulin and patulin producing *Penicillium* spp. Occurrence in apples and apple-based products including baby food. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 11(4), 343-349. <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/28459226>
12. Secretaría de Salud. (1994). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos*. (NOM-111-SSA1-1994). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881226&fecha=13/09/1995#gsc.tab=0
13. Secretaría de Salud. (1994). *Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. (NOM-110-SSA1-1994). <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf>

14. Secretaría de Salud, Comité Consultivo Nacional de Normalización de Regulación y Fomento Sanitario. (1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. (NOM-111-SSA1-1994). https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4728921&fecha=15/08/1994&print=true

A continuación, en el video 6.1 se muestra la técnica para el aislamiento e identificación de mohos y levaduras



Capítulo 7

Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios



Freepik. (s.f.). *Close up hands holding petri dish* [Fotografía].
https://www.freepik.com/free-photo/close-up-hands-holding-petri-dish_12892371.htm

Introducción

El grupo de los microorganismos coliformes es el más utilizado en la microbiología de los alimentos como indicador de prácticas higiénicas inadecuadas. El uso de los coliformes como indicador sanitario puede aplicarse para:

- La detección de prácticas sanitarias deficientes en el manejo y en la fabricación de los alimentos.
- La evaluación de la calidad microbiológica de un producto, aunque su presencia no necesariamente implica un riesgo sanitario.
- Evaluación de la eficiencia de prácticas sanitarias e higiénicas del equipo.
- La calidad sanitaria del agua y hielo utilizados en las diferentes áreas del procesamiento de alimentos.

La demostración y la cuenta de microorganismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivos líquidos o sólidos con características selectivas o diferenciales.



This is Engineering RAEng. (2020). *Disco de vinilo azul y negro* [Fotografía].
Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/disco-de-vinilo-azul-y-negro-bcqDxjddPGk>

Fundamento

El método permite determinar el número de microorganismos coliformes presentes en una muestra, utilizando un medio selectivo (agar rojo violeta bilis) en el que se desarrollan bacterias a 35 °C en aproximadamente 24 h, dando como resultado la producción de gas y ácidos orgánicos, los cuales viran el indicador de pH y precipitan las sales biliares.

Reactivos y materiales

- Solución reguladora de fosfatos (solución concentrada)
- Agua peptonada

Medio de cultivo

- Agar-rojo-violeta-bilis-lactosa (RVBA)

Nota: La preparación de los medios se puede consultar en la NOM-113-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Materiales

- Pipetas bacteriológicas para distribuir 10 y 1 mL (o si es necesario de 11 y 2 mL), con tapón de algodón. Las pipetas pueden ser graduadas en volúmenes iguales a una décima de su volumen total.
- Frascos de vidrio de 250 mL con tapón de rosca.
- Tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca.
- Utensilios esterilizables para la obtención de muestras: cuchillos, pinzas, tijeras, cucharas y espátulas.
- Cajas Petri de 90 mm o 100 mm de diámetro x 15 mm de espesor.
- Todo el material e instrumentos que tengan contacto con las muestras bajo estudio debe esterilizarse empleando:
 - Horno, durante 2 h a 170 – 175 °C, o 1 h a 180 °C
 - Autoclave, durante 15 minutos, como mínimo a $121 \pm 1,0$ °C.

Importante: Todo el material de sembrado que se emplee debe estar estéril.

El material de vidrio puede sustituirse por material desechable que cumpla con las especificaciones deseadas. No debe usarse material de vidrio dañado por las esterilizaciones repetidas y este debe ser químicamente inerte, es decir, las pipetas deben estar íntegras y libres de cualquier daño que provoque que los volúmenes no sean medidos correctamente (por ejemplo, puntas dañadas).

Aparatos e instrumentos

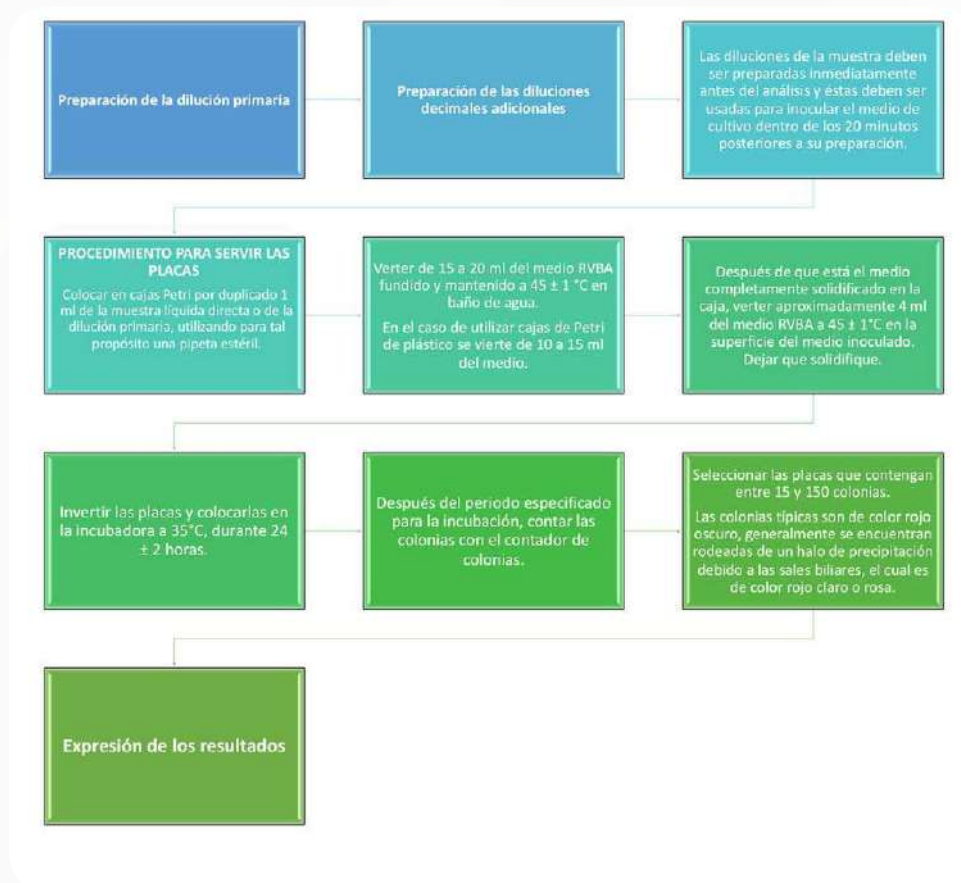
- Horno para esterilizar que alcance una temperatura mínima de 170 °C o autoclave con termómetro y manómetro, calibrada con termómetro de máximas y mínimas.
- Baño de agua con control de temperatura y circulación mecánica, provista con termómetro calibrado con divisiones de 0.1 °C y que mantenga la temperatura a 45 ± 1.0 °C.
- Licuadora de una o dos velocidades controladas por un reóstato o bien un homogeneizador peristáltico (Stomacher).
- Vasos para licuadora con tapa esterilizables o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Incubadora que funcione correctamente en temperaturas de entre 10 °C y 50 °C con termostato que evite variaciones mayores de ± 1 °C, provista con termómetro calibrado.
- Contador de colonias de campo oscuro, con luz adecuada, placa de cristal cuadrículada y lente amplificador.
- Registrador mecánico o electrónico.
- Microscopio óptico.
- Potenciómetro con una escala mínima de 0,1 unidades de pH a 25 °C.

Mat Napo, M. (2021). *Mujer con camisa blanca sosteniendo un juguete de plástico azul y blanco* [Fotografía]. Unsplash. <https://unsplash.com/es/fotos/mujer-con-camisa-blanca-sosteniendo-un-juguete-de-plastico-azul-y-blanco-At-LUvX6Eto>



En el **diagrama 7.1** se, muestran los pasos a seguir, para la determinación de la presencia de Cuenta de Microorganismos Coliformes Totales en placa en alimentos. Después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 7.1. Cuenta de microorganismos coliformes totales en placa



I. Preparación de la muestra

La preparación de la muestra debe ser de acuerdo con lo establecido en la NOM-110-SSA1-1994 “Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico”, que se realiza de la siguiente manera:

1. Preparación de la dilución primaria a partir de muestras sólidas o semisólidas

- Las muestras sólidas y semisólidas congeladas deben descongelarse en refrigeración de 4 a 8 °C durante 18 horas y no más de 24 horas antes de proceder a su análisis.
- Pesar una cantidad de 10 u 11 g de la muestra por analizar en un recipiente o bolsa plástica estériles de tamaño adecuado.
- Adicionar un volumen de 90 a 99 ml del diluyente llevado a una temperatura similar a la de la muestra.
- Operar la licuadora o el homogeneizador peristáltico de 1 a 2 minutos hasta obtener una suspensión completa y homogénea según se indique en la técnica correspondiente para cada alimento. Aun en los equipos más lentos, este tiempo no debe exceder de 2.5 minutos.
- Permitir que las partículas grandes se sedimenten, y transferir la cantidad deseada tomando de las capas superiores de la suspensión.
- Cuando la dilución primaria es muy viscosa o pegajosa, adicionar más diluyente, lo cual debe tomarse en cuenta para las operaciones subsecuentes o expresión de resultados.

El homogeneizador peristáltico (Stomacher) puede no ser adecuado para algunos productos (por ejemplo, aquellos con partículas agudas o constituyentes que no se dispersen fácilmente). Debe ser utilizado solo cuando exista evidencia (publicada o por ensayos comparativos) de que los resultados obtenidos no difieren significativamente con aquellos obtenidos con licuadora.

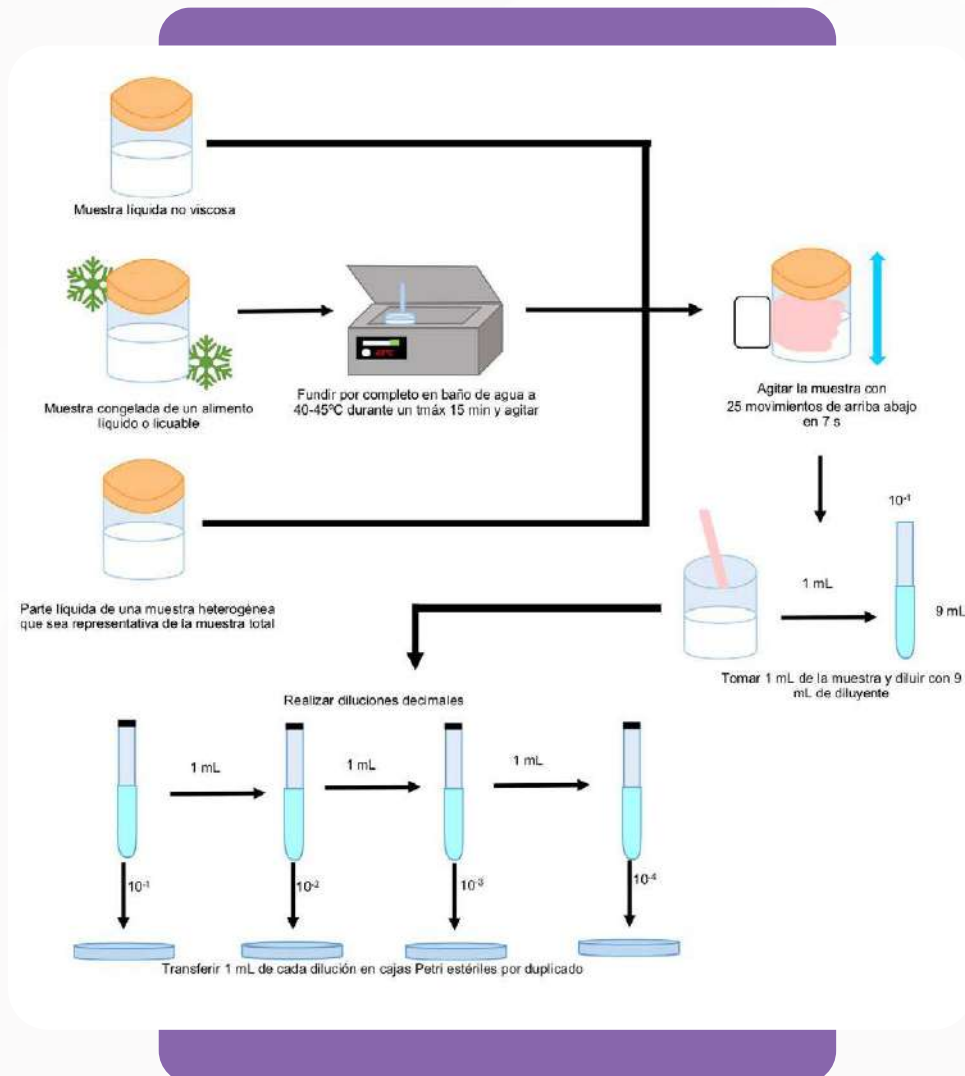
2. Preparación de las diluciones decimales adicionales

- Transferir 1 ml o un múltiplo, por ejemplo, 10 u 11 mL de la dilución primaria 1 + 9 (10^{-1}), en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- Mezclar cuidadosamente cada botella de diluyente siempre de la misma manera: agitar la muestra manualmente con 25 movimientos de arriba a abajo en un arco de 30 cm efectuados en un tiempo de 7 segundos. Tomar 1 mL de la muestra y diluir con 9 ml del diluyente el cual debe encontrarse a una temperatura similar a esta, evitando el contacto entre la pipeta y el diluyente.
- La selección de las diluciones que se vayan a preparar y de aquellas que se van a inocular, dependen del número esperado de microorganismos en la muestra, con base en los resultados de análisis previos, de la información que se obtenga del personal de inspección que la haya colectado y se puede tomar en cuenta el valor del límite máximo permisible de la normatividad vigente. En ausencia total de información, trabajar con las diluciones de la primera a la sexta.
- Utilizar pipetas diferentes para cada dilución inoculando simultáneamente las cajas que se hayan seleccionado. El volumen que se transfiera nunca debe ser menor al 10 % de la capacidad total de la pipeta, el significado es una velocidad rápida de trabajo y no detenerse en medir con exactamente el volumen indicado.
- Si la pipeta es terminal y se transfiere un volumen de líquido equivalente a su capacidad total, escurrir aplicando la punta de la pipeta una sola vez en un área de la caja Petri sin líquido.

- Mientras se afora el líquido de la pipeta, la punta de esta debe apoyarse en el interior del cuello del frasco y mantenerla en posición vertical, para lo cual este último debe inclinarse lo necesario.
- En estudios donde se busca la presencia o ausencia de una determinada especie de microorganismos en 0,1 ml o 0,1 g, no es necesario preparar diluciones mayores.
- El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperados es:
 - a. Para la técnica del número más probable utilizar tres tubos: donde sea posible demostrar el microorganismo en 10 ml de la dilución más alta.
 - b. Para la técnica de cuenta en placa, considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa. En el caso de otros grupos microbianos, considerar el número especificado de colonias en la Norma Oficial Mexicana correspondiente.

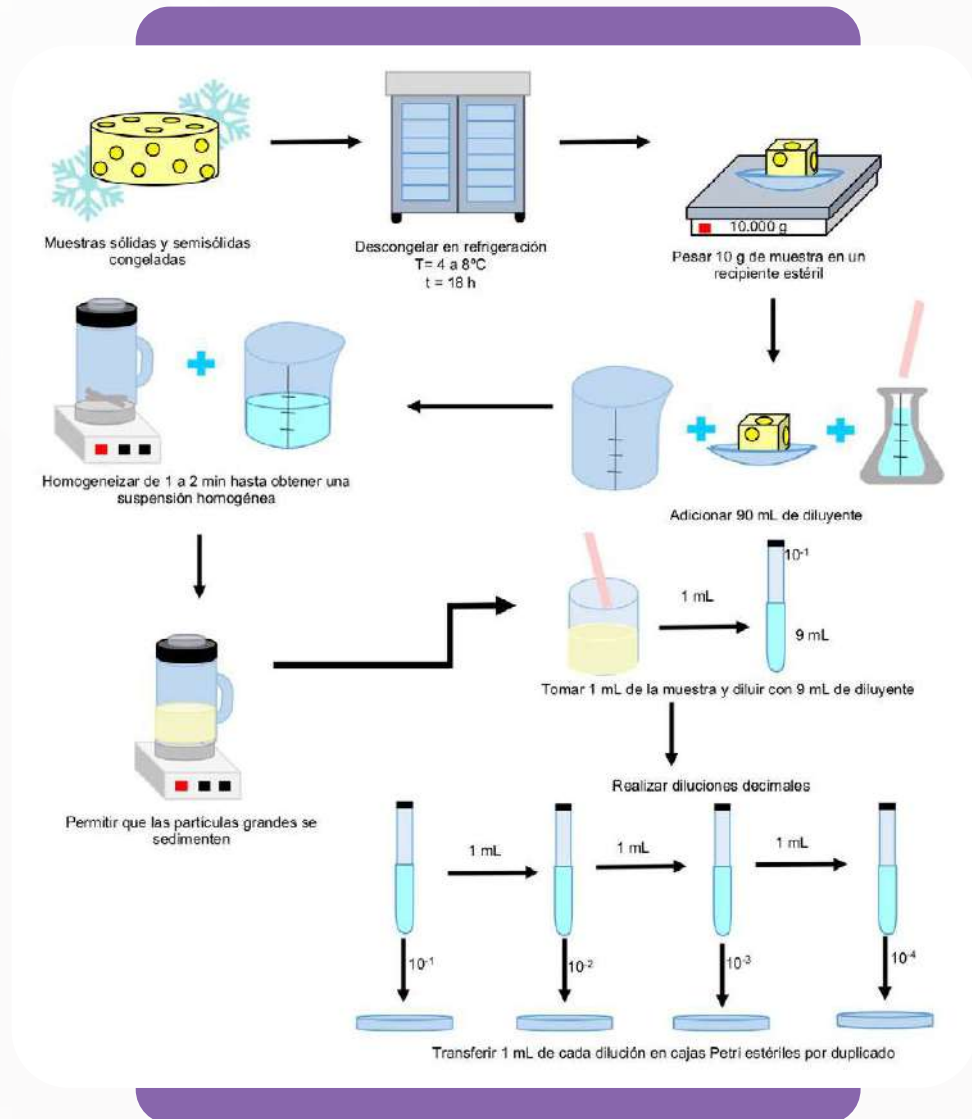
En el **esquema 7.1**, se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras líquidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la **NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.**

Esquema 7.1. Preparación de muestras líquidas



En el **esquema 7.2**, se muestra la secuencia correspondiente a la preparación de muestras sólidas o semisólidas para su posterior análisis microbiológico, dicho procedimiento está basado en la NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.

Esquema 7.2. Preparación de muestras sólidas o semisólidas



3. Duración del procedimiento

En general, las diluciones de la muestra deben ser preparadas inmediatamente antes del análisis y éstas deben ser usadas para inocular el medio de cultivo dentro de los 20 minutos posteriores a su preparación.

4. Procedimiento para servir las placas

- Colocar en cajas Petri por duplicado 1 mL de la muestra líquida directa o de la dilución primaria, utilizando para tal propósito una pipeta estéril.
- Repetir el procedimiento tantas veces como diluciones decimales se requiera sembrar, utilizando una pipeta estéril diferente para cada dilución.
- Verter de 15 a 20 mL del medio RVBA fundido y mantenido a $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en baño de agua. En el caso de utilizar cajas de Petri de plástico se vierte de 10 a 15 mL del medio. El tiempo transcurrido entre la preparación de la dilución primaria y el momento en que se vierte el medio de cultivo, no debe exceder de 20 minutos (**imagen 7.1**).

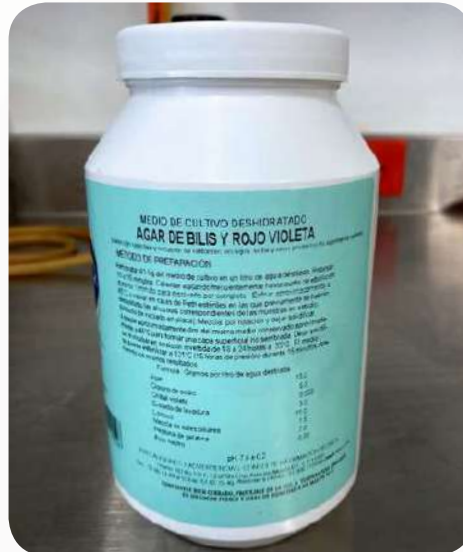


Imagen 7.1 Agar-rojo- violeta-bilis-lactosa (RVBA)

- Mezclar cuidadosamente el inóculo con el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis movimientos en el sentido de las manecillas del reloj, seis movimientos en el sentido contrario al de las manecillas del reloj y seis de atrás para adelante, sobre una superficie lisa y nivelada. Permitir que la mezcla solidifique dejando las cajas Petri reposar sobre una superficie horizontal fría.
- Preparar una caja control con 15 mL de medio para verificar la esterilidad.
- Después de que está el medio completamente solidificado en la caja, verter aproximadamente 4 mL del medio RVBA a $45 \pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la superficie del medio inoculado. Dejar que solidifique.

- Invertir las placas y colocarlas en la incubadora a 35 °C, durante 24 ± 2 horas.
- Después del periodo especificado para la incubación, contar las colonias con el contador de colonias.
- Seleccionar las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. 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 (**imagen 7.2**).

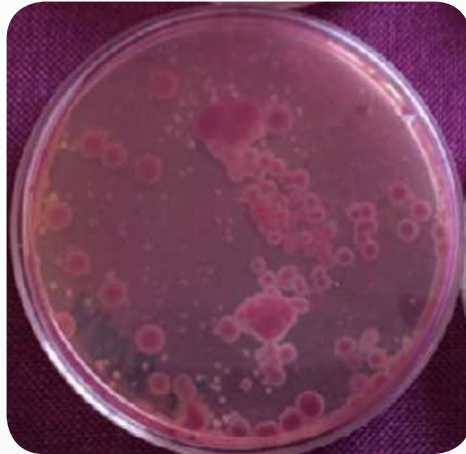
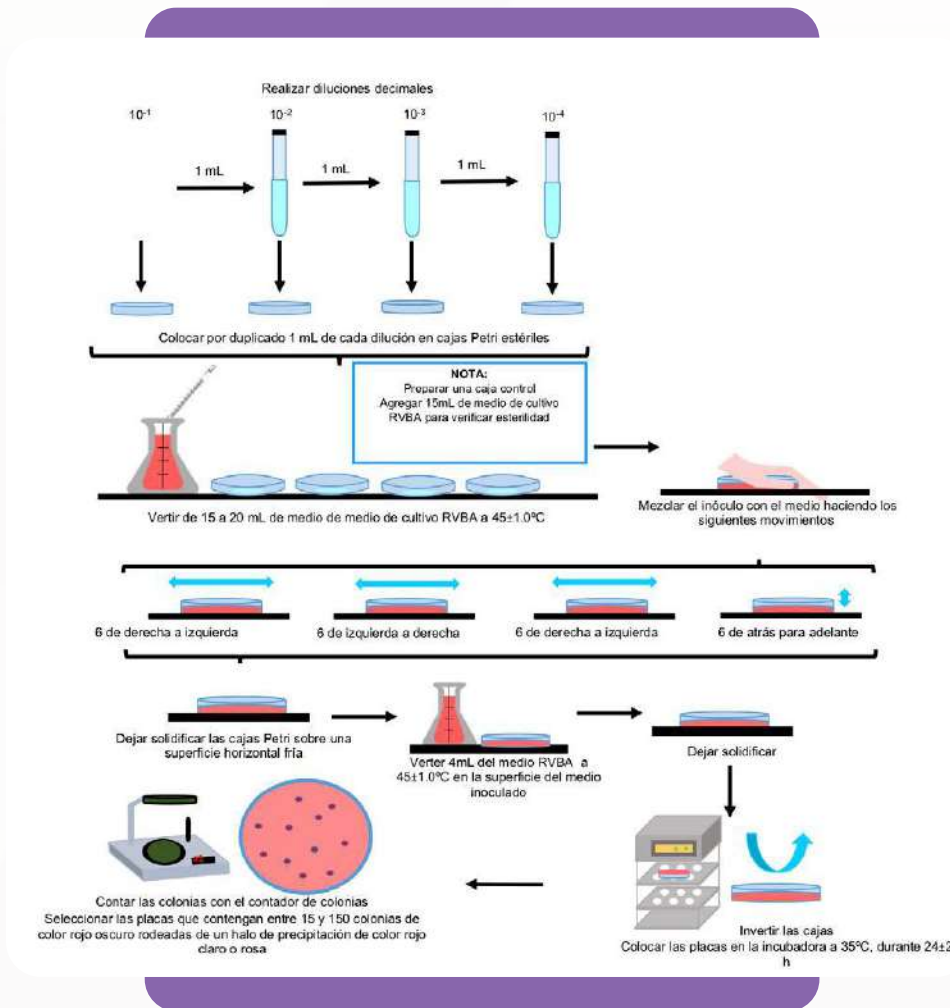


Imagen 7.2 Colonias típicas de coliformes en agar RVBA

En el **esquema 7.3**, se muestra la secuencia correspondiente al método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.

Esquema 7.3. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa



II. Expresión de los resultados

1. Cálculo del método

Placas que contienen entre 15 y 150 colonias características

- Separar las placas que contienen el número antes mencionado de colonias características en dos diluciones consecutivas.
- Contar las colonias presentes.
- Calcular el número de coliformes por mililitro o por gramo de producto, multiplicando el número de colonias por el inverso de la dilución correspondiente, tomando los criterios de la NOM-092-SSA1-1994. Método para la Cuenta de Bacterias Aerobias en Placa.

Placas que contienen menos de 15 colonias características

Si cada una de las placas tiene menos de 15 colonias características, reportar el número obtenido seguido de la dilución correspondiente.

Placas con colonias no características

Si en las placas no hay colonias características, reportar el resultado como: menos de un coliforme por 1/d por gramo, en donde "d" es el factor de dilución.

III. Informe de la prueba

Informar: UFC/g o mL en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35 °C durante 24 ± 2 h. En caso de emplear diluciones y no observar crecimiento, informar utilizando como referencia la dilución más baja utilizada, por ejemplo, dilución 10-1. En caso de no observar crecimiento en la muestra sin diluir se informa: "no desarrollo de coliformes por mL".

Ejemplo para realizar el cálculo

Dilución en donde se obtuvieron entre 15 y 150 colonias:
DILUCIÓN 10⁻⁶

Se realizaron diluciones por duplicado, obteniendo en cada caja:

Caja 1: 134 UFC

Caja 2: 126 UFC

$$134 + 126 = 260$$

$$260/2 = 130$$

130 UFC por el factor de dilución (1x10⁻⁶) = 130 000 000 (agregar 6 ceros)

130 000 000 unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) en placa de agar rojo violeta bilis, incubados a 35 °C durante 24 + 2 h.

Literatura citada

1. Secretaría de Salud. (1994). *Bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.* (NOM-113-SSA1-1994). <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69536.pdf>
2. Secretaría de Salud. (1994). *Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico.* (NOM-110-SSA1-1994). <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69533.pdf>

A continuación, en el **video 7.1**, se muestra la técnica para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.



Capítulo 8

Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del nmp presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua, de acuerdo con el Apéndice h normativo de la norma oficial mexicana NOM-210-SSA1-2014, productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos



Eckert, A. (2013). *Extended-spectrum β -lactamase-producing (ESBLs) Enterobacteriaceae* [Ilustración].

Public Health Image Library (PHIL). <https://phil.cdc.gov/Details.aspx?pid=16869>

Introducción

Este método es aplicable para la estimación de la densidad de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* (*E. coli*) por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Este método es aplicable para la detección de coliformes fecales y *E. coli*, especialmente en productos que se encuentran en bajas concentraciones de microorganismos.

Actualmente se utilizan tres grupos de indicadores microbianos con diferentes aplicaciones. La detección de bacterias del grupo coliforme se usa como indicador de la calidad sanitaria del agua o como indicador de las condiciones sanitarias en el procesamiento de alimentos. Los coliformes totales, fecales y *E. coli* continúan siendo el indicador de elección que manifiesta contaminación fecal reciente o condiciones higiénicas inadecuadas. El método del NMP consiste en una prueba presuntiva y confirmativa. El uso de las series de tres, cinco o diez tubos va a depender de la contaminación esperada y el grado de exactitud deseada.

El principio de la técnica se basa en la dilución de la muestra en tubos múltiples, de tal forma que todos los tubos de la menor dilución sean positivos y todos los tubos de la dilución mayor sean negativos. El resultado positivo se demuestra por la presencia de gas y crecimiento microbiano propiedad de los microorganismos coliformes para producir gas a partir de la fermentación de lactosa a $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para alimentos) $44.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (para agua) dentro de las 48 h de incubación (coliformes fecales y *E. coli*).

Para obtener el NMP en los resultados se aplica la teoría de la probabilidad, lo cual tiene como condición lo siguiente:

- Una distribución aleatoria de las bacterias que existen en la muestra.
- Las bacterias se encuentran como entidades no agrupadas.
- Los microorganismos presentes en la muestra crecerán en el medio cuando sean incubados y se mantengan en las condiciones adecuadas para su desarrollo.

Alrededor del 96 % de las cepas de *E. coli*, incluso las cepas anaerogénicas producen la enzima beta-glucuronidasa (GUD), la cual rompe el sustrato específico 4-metilumbelliferyl-beta-Dglucurónido (MUG) en 4-metilumbelliferona (MU), que al ser expuesto a una fuente de luz UV de onda larga (365nm) produce una fluorescencia azul, fácil de observar cuando el MUG es incorporado al caldo EC o al caldo lauril.

Una excepción es la *E.coli* enterohemorrágica serotipo O157:H7, que es GUD negativa; por lo que es común que esta prueba se utilice para diferenciar este serotipo de las demás *E. coli*.

La producción de GUD por otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* es rara. Algunas cepas o especies de *Shigella* (44 %-58 %) y *Salmonella* spp (20 %-29 %) son GUD positivas, sin embargo, no se considera una desventaja de esta prueba para su uso en salud pública.

Si se espera una cuenta microbiana alta, la muestra deberá diluirse para dar cumplimiento a las condiciones. La forma más común de realizar esta prueba es mediante diluciones decimales y usando un inóculo en series de tubos. A medida que el número de tubos inoculados para cada dilución aumenta, se reducen los límites de confianza.

Equipo

- Baño de agua con cubierta y recirculación constante que alcance una temperatura de 44.5 °C, 45.5 °C ± 0.2 °C.
- Lámpara de luz UV de 365 nm longitud de onda.
- Incubadora de aire que mantenga una temperatura de 35 °C ± 0.5 °C.
- Balanza con capacidad adecuada y sensibilidad de 0.1 g.
- Motor de licuadora u homogenizador peristáltico.
- Potenciómetro con sensibilidad de 0.1 de unidad de pH.
- Autoclave que mantenga una temperatura interna de 121 °C bajo una presión de 15 psi (1 bar), equipado con termómetro calibrado y manómetro de presión calibrado, previamente calificada.

Materiales

- Tubos de cultivo de 18 x 150 mm, 18 x 200 mm, 16 x 150 mm, 16 x 160 mm, 22 x 175 mm con tapón de rosca.
- Tubos de fermentación (campanas de Durham).
- Gradillas de plástico y metal.
- Asas bacteriológicas.
- Lentes protectores.
- Termómetro de máximas para autoclave con división mínima de 0.5 °C calibrado. Se deberá registrar la inspección trimestral de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de esta, si se observa, este deberá salir de uso.
- Termómetro de inmersión total de 379 mm de longitud de 25 °C a 55 °C, una escala auxiliar a 0 °C con subdivisiones de 0.1 °C con una precisión y exactitud de ± 0.1 °C. Se deberá registrar la inspección anual de la columna de mercurio del termómetro con una lupa en búsqueda de rupturas de esta, si se observa, este deberá salir de uso.
- Cinta testigo para procesos de esterilización por calor húmedo (si no se cuenta con ella, se deben controlar perfectamente las condiciones de esterilización).
- Vasos de licuadora estéril o bolsas estériles para homogeneizador peristáltico.
- Pipetas graduadas bacteriológicas de 0.1 mL, 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL.
- Probetas de 100 mL, 500 mL y 1000 mL.
- Frascos de dilución de vidrio de borosilicato con tapón esmerilado.
- Frascos con capacidad 500 mL con tapa de rosca.
- Espátulas, cucharas, cuchillos, pinzas.
- Campana Durham 6x35 mm.

Importante: Todo el material de sembrado que se emplee debe estar estéril.

Medios de cultivo

- Caldo A-1 (LACTOSADO)
- Caldo Lauril Triptosa
- Caldo EC (caldo *Escherichia coli*)
- EMB-L (agar Levine eosina-azul de metileno)
- Caldo triptona al 1 %
- Caldo RMVP
- Caldo Citrato de Koser
- Citrato de Simmon
- Caldo Lauril triptosa con MUG
- Caldo Verde Brillante Lactosa Bilis
- Agar Mc Conkey
- Agar Nutritivo
- Agar Cuenta Estándar
- Caldo Lauril con MUG

Nota: la preparación de los medios se puede consultar en la NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos. Método aprobado para la estimación de la densidad de coliformes totales, fecales y *E. coli* por la técnica del NMP presentes en muestras de alimentos para consumo humano y agua.

Reactivos

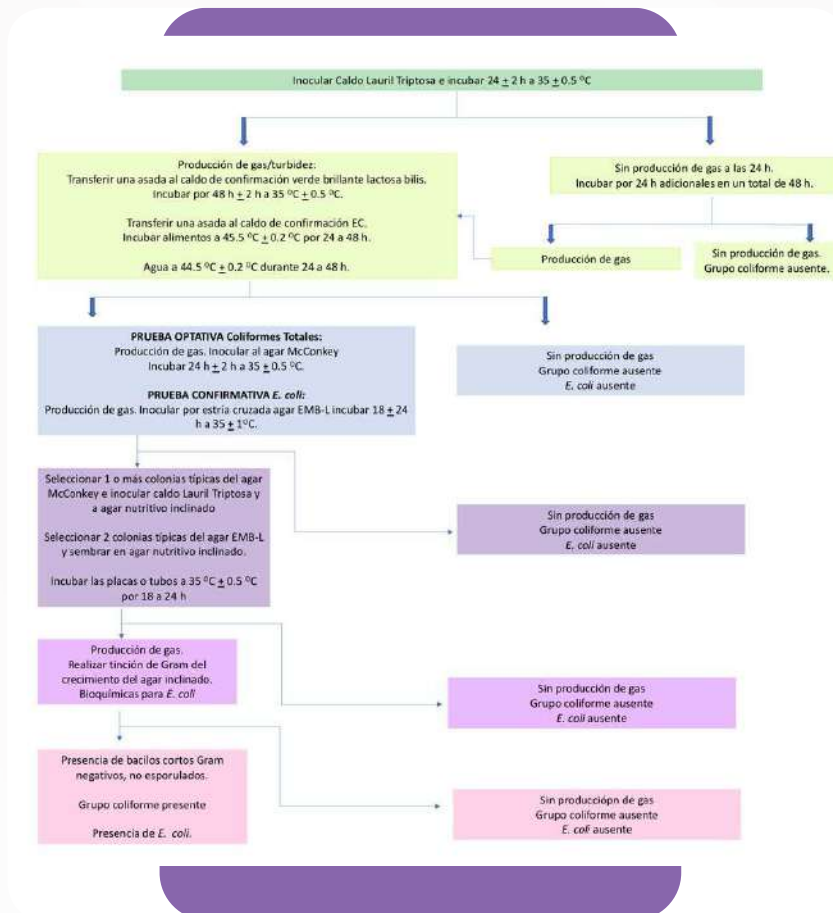
- Regulador de fosfatos solución concentrada
- Diluyente de peptona al 0.1 %
- Reactivo de Kovac
- Reactivo de VP
- Indicador rojo de metilo
- Reactivos para la coloración de Gram

Cepas de referencia

- *E. coli* ATCC 25922
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048

En el **diagrama 8.1** se muestran los pasos a seguir para la determinación de la presencia de Coliformes Totales en alimentos. Después del diagrama, se detalla la técnica a seguir.

Diagrama 8.1. Determinación de la presencia de coliformes totales en alimentos



Procedimiento analítico

Prueba para detectar E. Coli en alimentos refrigerados o congelados

1. Prueba presuntiva

- Pesar 25 g del alimento en 225 mL de solución amortiguadora o regulador de fosfatos o diluyente de peptona y moler por 2 minutos en vaso de licuadora u homogeneizador peristáltico, el volumen total en el vaso debe cubrir totalmente las aspas. Las muestras congeladas deben mantenerse en refrigeración (2 °C-5 °C) un máximo de 18 horas antes de su análisis, sin llegar a la descongelación. En caso de que la cantidad de muestra disponible sea menor a 25 g y el análisis necesite ser efectuado (por denuncia o queja ante la autoridad), utilizar una cantidad de muestra que represente una proporción 1:10.
- Preparar diluciones decimales con regulador de fosfatos. La cantidad de diluciones dependerá de la densidad (cantidad) de coliformes esperada. Agitar las diluciones veinticinco veces en un arco de 30 cm por 7 segundos transferir volúmenes de 1 mL a tres tubos con 10 mL de caldo lauril triptosa, por cada dilución por lo menos tres diluciones consecutivas (el volumen que se transfiera nunca debe ser menor del 10 % de la capacidad total de la pipeta). Mantener la pipeta en ángulo de tal manera que descansa sobre el borde del tubo. El tiempo entre la homogeneización de la muestra y la inoculación de los tubos no debe exceder de 15 a 20 minutos.
- Utilizar como medio de enriquecimiento caldo lauril triptosa con MUG, inocular un tubo con una cepa de *E. coli* GUD positiva como control (ATCC 25922). Además, inocular otro tubo con una cepa de *Enterobacter aerogenes* (ATCC13048) como control negativo, para facilitar la diferenciación entre los tubos que presenten solo crecimiento y crecimiento con fluorescencia. Inocular los tubos por 24 horas

a 48 horas \pm 2 horas a 35 °C. Examinar cada tubo con crecimiento (turbiedad y gas), después, observar los tubos en la oscuridad con una lámpara de luz UV. Una prueba positiva para *E. coli* es la presencia de fluorescencia en el tubo. La lectura a las 24 horas de incubación identifica a *E. coli* en un 83 %-95 %, mientras que a las 48 horas de incubación la identifica en un 96 %-100 % (imagen 8.1).



Imagen 8.1 Cultivo de *E. coli* y *Enterobacter aerogenes* en caldo lauril triptosa con MUG: *E. coli* (fluorescencia positiva), A *Enterobacter aerogenes* (fluorescencia negativa) B

2. Prueba confirmativa para la prueba de coliformes fecales y para la prueba de coliformes totales

- De cada tubo que muestre formación de gas, tomar una asada y sembrar en un número igual de tubos de caldo EC para la prueba confirmativa; inocular en tubos de EC un control positivo de *E. coli* y un control negativo de *Enterobacter aerogenes* e incubar con las muestras.
- Incubar los tubos para prueba de coliformes totales a 35 °C \pm 0.5 °C por 48 h \pm 2 h y para la prueba de coliformes fecales a 45.5 °C \pm 0.2 °C en baño de agua con recirculación continua durante 24 h, observar si hay formación de gas, registrar la lectura, en caso de no haber formación de gas, incubar 24 h más. Utilizar estos resultados para calcular el NMP de Coliformes totales y coliformes fecales respectivamente. Consultar la sección de cálculos (imagen 8.2).

Nota: para todos los alimentos que se les determine coliformes fecales, la incubación debe ser a $45.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h a 48 h.

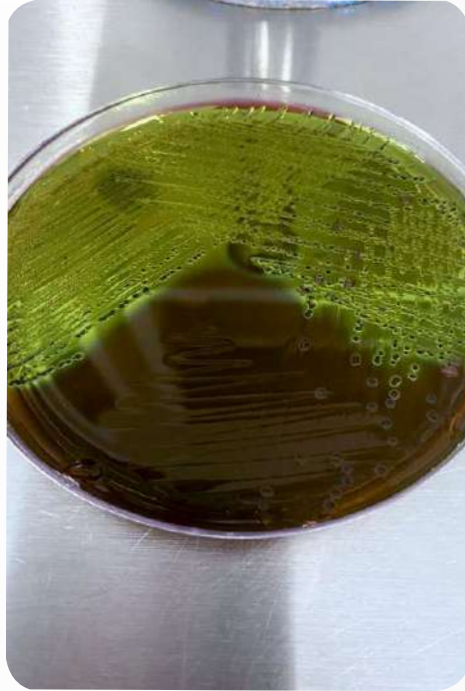


Imagen 8.2 Caldo de confirmación verde brillante lactosa bilis para coliformes

3. Prueba confirmativa para *E. coli* (por identificación bioquímica)

a) Prueba presuntiva

- Confirmar todos los tubos positivos estriando en una placa de agar L-EMB, incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Incubar las placas invertidas a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h - 24 h. Seleccionar 2 colonias de cada placa con la morfología colonial típica: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico y sembrarlas en agar cuenta estándar (placa o agar inclinado), para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas. Incubar las placas o tubos a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h-24 h (**imagen 8.3**).

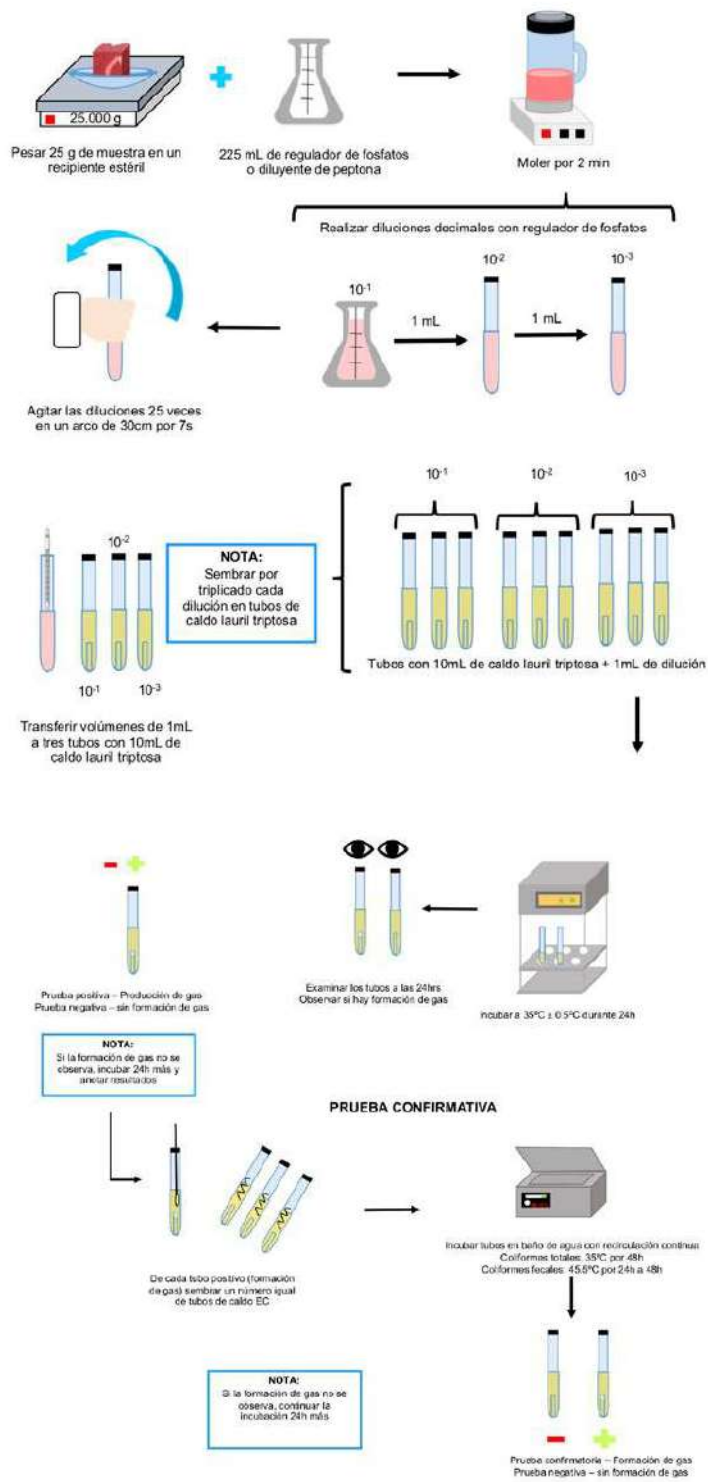


8.3 Colonias de *E. coli* en agar L-EMB

- Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa. Realizar un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos Gram negativos.
- Calcular el NMP de *E. coli* basada en la confirmación de tubos en las tres diluciones consecutivas.

En el **esquema 8.1**, se muestra la secuencia correspondiente a la prueba presuntiva y la prueba confirmativa para la cuenta de microorganismos coliformes totales y fecales por la técnica del NMP.

Esquema 8.1. Prueba presuntiva



b) pruebas bioquímicas: indol, rojo de metilo, vp, citrato

- **Producción de indol**

Inocular un tubo con caldo triptona e incubarlo a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Adicionar 0.2 mL a 0.3 mL de reactivo de Kovac, dejando caer las gotas del reactivo por las paredes del tubo y no agitar los tubos para observación del anillo rojo en la superficie. La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera una prueba positiva.

- **VP (Voges - Proskauer)**

Inocular un tubo con caldo MR-VP e incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$. Transferir 1 mL a un tubo de 13 mm x 100 mm. Adicionar 0.6 mL de solución α -naftol y 0.2 mL de KOH al 40 % y agitar. Cuando se desarrolla un color de rosa a rojo en 15 min a 30 min, se considera una prueba positiva.

- **Rojo de metilo**

A la otra parte del caldo MR-VP inocular y adicionar cinco gotas de solución de rojo de metilo. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo definido es una prueba negativa.

- **Citrato**

Sembrar con inóculo ligero un tubo con caldo citrato de Koser, evitar turbiedad en el tubo. Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 96 h. Una reacción positiva se observa mediante el desarrollo de turbiedad detectable. Se puede utilizar como alternativa citrato de Simmon el cual se debe inocular por estría. Incubar $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Una prueba positiva se observa mediante crecimiento y/o cambio a una coloración azul; la ausencia de crecimiento se considera una prueba negativa.

Interpretación de resultados de las pruebas bioquímicas

Todos los cultivos que fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48 h a 35 °C, sean bacilos o bacilos cortos Gram negativos no esporulados y se obtengan las siguientes combinaciones para el IMViC:

Pruebas	Biotipo 1*	Biotipo 2*
Indol	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Citrato	-	-

* Son consideradas como *E. coli*.

Cálculos

- Con frecuencia es necesario calcular el NMP con cantidades de muestra diferentes de los enlistados en las tablas del **Apéndice 8.1** desde el primer número de la combinación encontrada. Si la cantidad de muestra >0.01 g multiplicar el NMP enlistado en la tabla utilizada dependiendo del procedimiento realizado por 10.
- Una determinación de cinco tubos que dé tres tubos positivos en 0.01 g; dos tubos positivos en 0.001 g y un tubo positivo en 0.0001 g (3-2-1) el resultado obtenido al leer en la **tabla 8.2**, es 17, multiplicar por 10 para así obtener 170 como el NMP final por g de muestra. De igual forma si la cantidad más grande utilizada para la tabla de referencia es 1 g en lugar de 0.1 g, dividir el NMP derivado de la Tabla entre 10. Por ejemplo, el resultado de la determinación del NMP en tres tubos para *E. coli* que dé tres tubos positivos en 1 g; un tubo positivo en 0.1 g y ningún positivo en 0.01 g (3-1-0) el resultado obtenido al leer en la **tabla 8.1** es 43 y dividir entre 10, lo que da 4.3 como el NMP presuntivo por g de muestra.

- Un método alternativo para obtener el NMP es usando la siguiente fórmula: (NMP/g de la tabla - 100) X factor de dilución del tubo de en medio = NMP/g. Para calcular el NMP/100 g multiplicar por 100.

Apéndice 8.1

Tabla 8.1. NMP para 1 g de muestra cuando se usan tres tubos con porciones de 0.1; 0.01 y 0.001 g.

Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos				Tubos Positivos			
0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP	0,1	0,01	0,001	NMP
0	0	0	<3	1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3, pag. 5

Tabla 8.2. NMP para 100 mL de muestra cuando se usan 5 porciones en cada una de tres diluciones con series geométricas

No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos				No. de Tubos positivos			
10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP	10 mL	1 mL	0.1 mL	NMP
0	0	0	<1.8	1	0	0	2.0	2	0	0	4.5	3	0	0	7.8	4	0	0	13	5	0	0	23
0	0	1	1.8	1	0	1	4.0	2	0	1	6.8	3	0	1	11	4	0	1	17	5	0	1	31
0	0	2	3.6	1	0	2	6.0	2	0	2	9.1	3	0	2	13	4	0	2	21	5	0	2	43
0	0	3	5.4	1	0	3	8.0	2	0	3	12	3	0	3	16	4	0	3	25	5	0	3	58
0	0	4	7.2	1	0	4	10	2	0	4	14	3	0	4	20	4	0	4	30	5	0	4	76
0	0	5	9.0	1	0	5	12	2	0	5	16	3	0	5	23	4	0	5	36	5	0	5	95
0	1	0	1.8	1	1	0	4.0	2	1	0	6.8	3	1	0	11	4	1	0	17	5	1	0	33
0	1	1	3.6	1	1	1	6.1	2	1	1	9.2	3	1	1	14	4	1	1	21	5	1	1	46
0	1	2	5.5	1	1	2	8.1	2	1	2	12	3	1	2	17	4	1	2	26	5	1	2	63
0	1	3	7.3	1	1	3	10	2	1	3	14	3	1	3	20	4	1	3	31	5	1	3	84
0	1	4	9.1	1	1	4	12	2	1	4	17	3	1	4	23	4	1	4	36	5	1	4	110
0	1	5	11	1	1	5	14	2	1	5	19	3	1	5	27	4	1	5	42	5	1	5	130
0	2	0	3.7	1	2	0	6.1	2	2	0	9.3	3	2	0	14	4	2	0	22	5	2	0	49
0	2	1	5.5	1	2	1	8.2	2	2	1	12	3	2	1	17	4	2	1	26	5	2	1	70
0	2	2	7.4	1	2	2	10	2	2	2	14	3	2	2	20	4	2	2	32	5	2	2	94
0	2	3	9.2	1	2	3	12	2	2	3	17	3	2	3	24	4	2	3	38	5	2	3	120
0	2	4	11	1	2	4	15	2	2	4	19	3	2	4	27	4	2	4	44	5	2	4	150
0	2	5	13	1	2	5	17	2	2	5	22	3	2	5	31	4	2	5	50	5	2	5	180
0	3	0	5.6	1	3	0	8.3	2	3	0	12	3	3	0	17	4	3	0	27	5	3	0	79
0	3	1	7.4	1	3	1	10	2	3	1	14	3	3	1	21	4	3	1	33	5	3	1	110
0	3	2	9.3	1	3	2	13	2	3	2	17	3	3	2	24	4	3	2	39	5	3	2	140
0	3	3	11	1	3	3	15	2	3	3	20	3	3	3	28	4	3	3	45	5	3	3	180
0	3	4	13	1	3	4	17	2	3	4	22	3	3	4	31	4	3	4	52	5	3	4	210
0	3	5	15	1	3	5	19	2	3	5	25	3	3	5	35	4	3	5	59	5	3	5	250
0	4	0	7.5	1	4	0	11	2	4	0	15	3	4	0	21	4	4	0	34	5	4	0	130
0	4	1	9.4	1	4	1	13	2	4	1	17	3	4	1	24	4	4	1	40	5	4	1	170
0	4	2	11	1	4	2	15	2	4	2	20	3	4	2	28	4	4	2	47	5	4	2	220
0	4	3	13	1	4	3	17	2	4	3	23	3	4	3	32	4	4	3	54	5	4	3	280
0	4	4	15	1	4	4	19	2	4	4	25	3	4	4	36	4	4	4	62	5	4	4	350
0	4	5	17	1	4	5	22	2	4	5	28	3	4	5	40	4	4	5	69	5	4	5	430
0	5	0	9.4	1	5	0	13	2	5	0	17	3	5	0	25	4	5	0	41	5	5	0	240
0	5	1	11	1	5	1	15	2	5	1	20	3	5	1	29	4	5	1	48	5	5	1	350
0	5	2	13	1	5	2	17	2	5	2	23	3	5	2	32	4	5	2	56	5	5	2	540
0	5	3	15	1	5	3	19	2	5	3	26	3	5	3	37	4	5	3	64	5	5	3	920
0	5	4	17	1	5	4	22	2	5	4	29	3	5	4	41	4	5	4	72	5	5	4	1600
0	5	5	19	1	5	5	24	2	5	5	32	3	5	5	45	4	5	5	81	5	5	5	>1600

Referencia: Official Methods of Analysis of AOAC International, 18 ed. 2005. Chapter 17.3.

Tabla 8.3. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando diez tubos con 10 mL de muestra

Tubos positivos	NMP/100mL	Límite de confianza	
		Interior	Superior
0	<1.1	-	3.3
1	1.1	0.05	5.9
2	2.2	0.37	8.1
3	3.6	0.91	9.7
4	5.1	1.6	13
5	9	2.5	15
6	9.2	3.3	19
7	12	4.8	24
8	16	5.9	33
9	23	8.1	53
10	>23	12	-

Referencia: Americana Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition 1998. Washington DC.

Tabla 8.4. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando tres tubos con 0.1 g, 0.01 g y 0.001 g de muestra

Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<3.0	â	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	â

Referencia: Bacteriological Analytical Manual. FDA, 8th Edición, Revisión A, 1998 Actualización Diciembre 2003

Tabla 8.5. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando cinco tubos con 0.1 g, 0.01 g y 0.001 g de muestra

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	<.90	0	3.1	8	2	0	17	7.7	34
0	0	1	0.9	0.04	3.1	8	2	1	19	9	34
0	0	2	1.8	0.33	5.1	8	2	2	21	10	39
0	1	0	0.9	0.04	3.6	8	2	3	23	11	44
0	1	1	1.8	0.33	5.1	8	3	0	19	9	34
0	2	0	1.8	0.33	5.1	8	3	1	21	10	39
0	2	1	2.7	0.8	7.2	8	3	2	24	11	44
0	3	0	2.7	0.8	7.2	8	3	3	26	12	50
1	0	0	0.94	0.05	5.1	8	4	0	22	10	39
1	0	1	1.9	0.33	5.1	8	4	1	24	11	44
1	0	2	2.8	0.8	7.2	8	4	2	26	12	50
1	1	0	1.9	0.33	5.7	8	4	3	29	14	58
1	1	1	2.9	0.8	7.2	8	5	0	24	11	44
1	1	2	3.8	1.4	9	8	5	1	27	12	50
1	2	0	2.9	0.8	7.2	8	5	2	29	14	58
1	2	1	3.8	1.4	9	8	5	3	32	15	62
1	3	0	3.8	1.4	9	8	6	0	27	12	50
1	3	1	4.8	2.1	11	8	6	1	30	14	58
1	4	0	4.8	2.1	11	8	6	2	33	15	62
2	0	0	2	0.37	7.2	8	7	0	30	14	58
2	0	1	3	0.81	7.3	8	7	1	33	17	73
2	0	2	4	1.4	9	8	7	2	36	17	74
2	1	0	3	0.82	7.8	8	8	0	34	17	73
2	1	1	4	1.4	9	8	8	1	37	17	74
2	1	2	5	2.1	11	9	0	0	17	7.5	31
2	2	0	4	1.4	9.1	9	0	1	19	9	34
2	2	1	5	2.1	11	9	0	2	22	10	39
2	2	2	6.1	3	14	9	0	3	24	11	44
2	3	0	5.1	2.1	11	9	1	0	19	9	39
2	3	1	6.1	3	14	9	1	1	22	10	40
2	4	0	6.1	3	14	9	1	2	25	11	44
2	4	1	7.2	3.1	15	9	1	3	28	14	58
2	5	0	7.2	3.1	15	9	1	4	31	14	58
3	0	0	3.2	0.9	9	9	2	0	22	10	44
3	0	1	4.2	1.4	9.1	9	2	1	25	11	46
3	0	2	5.3	2.1	11	9	2	2	28	14	58
3	1	0	4.2	1.4	10	9	2	3	32	14	58
3	1	1	5.3	2.1	11	9	2	4	35	17	73
3	1	2	6.4	3	14	9	3	0	25	12	50
3	2	0	5.3	2.1	12	9	3	1	29	14	58
3	2	1	6.4	3	14	9	3	2	32	15	62
3	2	2	7.5	3.1	15	9	3	3	36	17	74
3	3	0	6.5	3	14	9	3	4	40	20	91
3	3	1	7.6	3.1	15	9	4	0	29	14	58
3	3	2	8.7	3.6	17	9	4	1	33	15	62
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.

Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	2	2	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220

NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando cinco tubos con 0.1g, 0.01g y 0.001 g de muestra.											
Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límites de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	2	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.7	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	∞

Tabla 8.6. NMP por g de muestra e intervalos de confianza del 95 %, utilizando diez tubos con 0.1 g, 0.01 g y 0.001 g de muestra.

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
3	4	0	7.6	3.1	15	9	4	2	37	17	74
3	4	1	8.7	3.6	17	9	4	3	41	20	91
3	5	0	8.8	3.6	17	9	4	4	45	20	91
4	0	0	4.5	1.6	11	9	5	0	33	17	73
4	0	1	5.6	2.2	12	9	5	1	37	17	74
4	0	2	6.8	3	14	9	5	2	42	20	91
4	1	0	5.6	2.2	12	9	5	3	46	20	91
4	1	1	6.8	3	14	9	5	4	51	25	120
4	1	2	8	3.6	17	9	6	0	38	17	74
4	2	0	6.8	3	15	9	6	1	43	20	91
4	2	1	8	3.6	17	9	6	2	47	21	100
4	2	2	9.2	3.7	17	9	6	3	53	25	120
4	3	0	8.1	3.6	17	9	7	0	44	20	91
4	3	1	9.3	4.5	18	9	7	1	49	21	100
4	3	2	10	5	20	9	7	2	54	25	120
4	4	0	9.3	4.5	18	9	7	3	60	26	120
4	4	1	11	5	20	9	8	0	50	25	120
4	5	0	11	5	20	9	8	1	55	25	120
4	5	1	12	5.6	22	9	8	2	61	26	120
4	6	0	12	5.6	22	9	8	3	68	30	140
5	0	0	6	2.5	14	9	9	0	57	25	120
5	0	1	7.2	3.1	15	9	9	1	63	30	140
5	0	2	8.5	3.6	17	9	9	2	70	30	140
5	0	3	9.8	4.5	18	10	0	0	23	11	44
5	1	0	7.3	3.1	15	10	0	1	27	12	50
5	1	1	8.5	3.6	17	10	0	2	31	14	58
5	1	2	9.8	4.5	18	10	0	3	37	17	73
5	1	3	11	5	21	10	1	0	27	12	57
5	2	0	8.6	3.6	17	10	1	1	32	14	61
5	2	1	9.9	4.5	18	10	1	2	38	17	74
5	5	5	11	5	21	10	1	3	44	20	91
5	3	0	10	4.5	18	10	1	4	52	25	120
5	3	1	11	5	21	10	2	0	33	15	73
5	3	2	13	5.6	23	10	2	1	39	17	79
5	4	0	11	5	21	10	2	2	46	20	91
5	4	1	13	5.6	23	10	2	3	54	25	120
5	4	2	14	7	26	10	2	4	63	30	140
5	5	0	13	6.3	25	10	3	0	40	17	91
5	5	1	14	7	26	10	3	1	47	20	100
5	6	0	14	7	26	10	3	2	56	25	120
6	0	0	7.8	3.1	17	10	3	3	66	30	140
6	0	1	9.2	3.6	17	10	3	4	77	34	150
6	0	2	11	5	20	10	3	5	89	39	180
6	0	3	12	5.6	22	10	4	0	49	21	120
6	1	0	9.2	3.7	18	10	4	1	59	25	120
6	1	1	11	5	21	10	4	2	70	30	150
6	1	2	12	5.6	22	10	4	3	82	38	180
6	1	3	14	7	26	10	4	4	94	44	180
6	2	0	11	5	21	10	4	5	110	50	210
6	2	1	12	5.6	22	10	5	0	62	26	140

COLIFORMES EN TUBO

NMP por gramo de muestra e intervalos de confianza del 95%, utilizando 10 tubos con 0.1; 0.01 y 0.001 g de muestra											
Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza		Tubos positivos			NMP/g	Límite de confianza	
0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.1	0.01	0.001		Inferior	Superior
6	2	2	14	7	26	10	5	1	74	30	150
6	2	3	15	7.4	30	10	5	2	87	38	180
6	3	0	12	5.6	23	10	5	3	100	44	180
6	3	1	14	7	26	10	5	4	110	50	210
6	3	2	15	7.4	30	10	5	5	130	57	220
6	4	0	14	7	26	10	5	6	140	70	280
6	4	1	15	7.4	30	10	6	0	79	34	180
6	4	2	17	9	34	10	6	1	94	39	180
6	5	0	16	7.4	30	10	6	2	110	50	210
6	5	1	17	9	34	10	6	3	120	57	220
6	5	2	19	9	34	10	6	4	140	70	280
6	6	0	17	9	34	10	6	5	160	74	280
6	6	1	19	9	34	10	6	6	180	91	350
6	7	0	19	9	34	10	7	0	100	44	210
7	0	0	10	4.5	20	10	7	1	120	50	220
7	0	1	12	5	21	10	7	2	140	61	280
7	0	2	13	6.3	25	10	7	3	150	73	280
7	0	3	15	7.2	28	10	7	4	170	91	350
7	1	0	12	5	22	10	7	5	190	91	350
7	1	1	13	6.3	25	10	7	6	220	100	380
7	1	2	15	7.2	28	10	7	7	240	110	480
7	1	3	17	7.7	31	10	8	0	130	60	250
7	2	0	13	6.4	26	10	8	1	150	70	280
7	2	1	15	7.2	28	10	8	2	170	80	350
7	2	1	17	7.7	31	10	8	3	200	90	350
7	2	3	19	9	34	10	8	4	220	100	380
7	3	0	15	7.2	30	10	8	5	250	120	480
7	3	1	17	9	34	10	8	6	280	120	480
7	3	2	19	9	34	10	8	7	310	150	620
7	3	3	21	10	39	10	8	8	350	150	620
7	4	0	17	9	34	10	9	0	170	74	310
7	4	1	19	9	34	10	9	1	200	91	380
7	4	2	21	10	39	10	9	2	230	100	480
7	4	3	23	11	44	10	9	3	260	120	480
7	5	0	19	9	34	10	9	4	300	140	620
7	5	1	21	10	39	10	9	5	350	150	630
7	5	2	23	11	44	10	9	6	400	180	820
7	6	0	21	10	39	10	9	7	460	210	970
7	6	1	23	11	44	10	9	8	530	210	970
7	6	2	25	12	46	10	9	9	610	280	1300
7	7	0	23	11	44	10	10	0	240	110	480
7	7	1	26	12	50	10	10	1	290	120	620
8	0	0	13	5.6	25	10	10	2	350	150	820
8	0	1	15	7	26	10	10	3	430	180	970
8	0	2	17	7.5	30	10	10	4	540	210	1300
8	0	3	19	9	34	10	10	5	700	280	1500
8	1	0	15	7.1	28	10	10	6	920	350	1900
8	1	1	17	7.1	31	10	10	7	1200	480	2400
8	1	2	19	9	34	10	10	8	1600	620	3400
8	1	3	21	10	39	10	10	9	2300	810	5300
						10	10	10	>2300	1300	--

Tabla 8.7. NMP por 100 mL de muestra inoculando tubos de cada una de tres diluciones geométricas

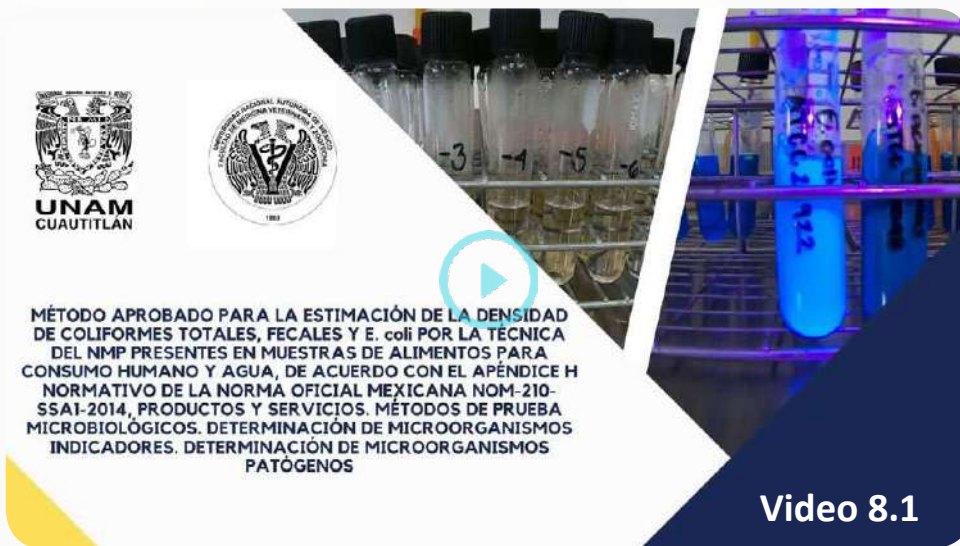
Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP	Tubos positivos mL			NMP
10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1		10	1	0.1	
0	0	0	<3	1	0	0	3.6	2	0	0	9.1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7.2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7.3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6.1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9.2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6.2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9.3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9.4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	>1100

Referencia: Recommended Procedures for the Examination of Sea Water and Shellfish. Fourth Edition 1970. APHA. New York.

Literatura citada

1. Secretaría de Salud. (2014). *Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.* (NOM-210-SSA1-2014). https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5398468&fecha=26/06/2015#gsc.tab=0

A continuación, en el **video 8.1**, se muestra la técnica para la cuenta de microorganismos coliformes totales, fecales y *E. coli*.



***Técnicas Microbiológicas para la identificación de bacterias y hongos en leche
y productos lácteos de acuerdo con la NOM-243-SSA1-2010***

Editado por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Se terminó de editar el 14 de marzo de 2024,
para su composición se utilizó software InDesign, peso de 53.6Mb

Comité Editorial
Departamento de Publicaciones Académicas

