

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Vicerrectoría Académica y de Investigación

**Guía de aprendizaje para el desarrollo del componente práctico
del curso
Microbiología de los alimentos**

1. Información general del componente práctico.

Tabla 1. *Información general del componente práctico*

Aspecto	Descripción
1. Estrategia metodológica	Aprendizaje Basado en Problemas ABP
2. Tipología de curso	Metodológico
3. Momento de la evaluación	Intermedio
4. Puntaje de la actividad	220 puntos
5. Número de actividades del componente registradas en esta guía	1
6. Tipo de práctica formativa	De Laboratorio

2. Con esta actividad de componente práctico se espera que los estudiantes logren y evidencien el siguiente resultado de aprendizaje:

Resultado de aprendizaje 4: Evaluar los resultados del monitoreo microbiológico a través de la interpretación de datos experimentales obtenidos en el desarrollo del componente práctico mediante el uso de diversas técnicas y herramientas para control y seguimiento microbiano aplicable a la industria alimentaria.

3. Descripción general de la actividad del componente práctico.

Tabla 2. *Información actividad 1*

Aspecto	Descripción
1. Escenarios de componente práctico	Físico
2. Tipo de actividad	Independiente
3. Número de actividad	1
4. La actividad inicia el:	lunes, 8 de septiembre de 2025
5. La actividad finaliza el:	lunes, 24 de noviembre de 2025

Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes:

Los recursos relacionados con bioseguridad para el desarrollo de toda la práctica son los siguientes:

Prácticas higiénicas y medidas de protección

- Recuerde que en algunas prácticas de laboratorio se trabaja con cepas microbianas de alta patogenicidad por lo que debe extremar sus cuidados. Se solicita que antes de manipular instrumental o equipos en el laboratorio pregunte al tutor encargado.
- Mantener una esmerada limpieza e higiene personal. Realizar la desinfección de las manos cuando manipule: materiales, microorganismos, residuos sólidos y canecas.
- Lavarse las manos, antes de comenzar su trabajo, cada vez que salga y regrese al área asignada.
- Mantener las uñas cortas, limpias y sin esmalte. No se permite usar anillos, aretes, joyas u otros tipos de accesorios mientras se encuentre en el laboratorio.
- No se permite el uso de cosméticos, perfumes, cremas de manos y maquillaje en el laboratorio.
- No está admitido comer, beber o masticar cualquier objeto o producto en el laboratorio.
- No se permite la salida con la indumentaria del laboratorio.
- Debe tener especial cuidado con el mechero y el material de vidrio (evitar quemaduras y cortadas)

- Debe trabajar muy concentrado pues un pequeño error o descuido, puede dañar todo su trabajo en el laboratorio y tener el riesgo de contaminarse con bacterias patógenas.
- Observe el material de vidrio y pida al tutor y coordinador que le enseñe su adecuada manipulación (cajas de petri, pipetas diferentes volúmenes y otros).
- El material de vidrio en microbiología siempre debe ser utilizado estéril por lo que debe ser empacado con papel kraft antes de ser sometido a un proceso de esterilización. Tenga especial cuidado con la manipulación del material ya que se puede contaminar con microorganismos provenientes de las manos. Importante el uso de guantes
- Una vez hecha la lectura de los medios de cultivo, quite la cinta de enmascarar. Y entregue el material al grupo encargado de la esterilización.

Después del proceso de esterilización, espere a que el material este frío para proceder con el lavado de la siguiente manera:

- Retire los restos de agar y cinta de enmascarar y déjelos en una bolsa roja.
- Enjabone las cajas y demás material utilizado.
- Enjuague bien, deje escurrir y seque el material.
- Entregue todo el material al coordinador del laboratorio.
- Debe dejar el laboratorio perfectamente limpio después de la práctica.

Vestimenta

Usar vestimenta del laboratorio que cumpla con los siguientes requisitos: Bata blanca manga larga que permita visualizar su limpieza, con cierres o cremalleras en lugar de botones u otros accesorios, sin bolsillos ubicados por encima de la cintura.

- Usar zapatos cerrados y antideslizantes.
- Es obligatorio el uso de gorro (cofia) y tapabocas mientras se encuentra en el laboratorio.
- Uso de jeans sin rotos por seguridad en probable derrame
- Gafas de seguridad
- El uso del celular está restringido dentro del laboratorio.

- Es importante que el estudiante revise los documentos emitidos por la vicerrectoría de medios y mediaciones pedagógicas (VIMEP):
- Reglamento práctico de laboratorio. Sistema nacional de laboratorios.
- Reglamentación y normas de Bioseguridad en los laboratorios de la UNAD

Materiales, insumos, reactivos y equipos

- Fósforos
- Papel absorbente
- Marcador de vidrio
- Cinta de enmascarar
- Tijeras
- Toalla para manos
- Jabón desinfectante para manos
- Alcohol absoluto
- Guantes de latex
- Un alimento
- Tubos tapa rosca con caldo lactosado verde brillante (BRIILA)
- Frasco con agua peptonada 0.1 % estéril (90 mL)
- tubos tapa rosca con agua peptonada 0.1 % estéril
- Tubos tapa rosca estériles
- Gradilla
- Pipetas estériles (1 mL, 0.1 mL)
- Cajas de Petri con agar Plate Count o nutritivo
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora
- Autoclave
- Mecheros
- Agitador en vórtice o vórtex
- Pipeteadores
- Asa de hockey o digralsky

Software

- Combbase: enlace para crear cuenta con correo personal
<https://combasebrowser.errc.ars.usda.gov/membership/Login.aspx?ReturnUrl=%2f>

La actividad consiste en:

Paso 1. Técnica de recuento en placa y Numero Más Probable (NMP)

Propósito:

Diferenciar entre técnicas microbiológicas para el recuento de microorganismos en matrices alimentarias.

Fundamento técnico:

El conteo de diferentes microorganismos presentes en matrices alimentarias se puede realizar empleando distintas metodologías; las más comunes: recuento en placa para mesófilos aerobios en superficie y Numero Mas Probable (NMP) para Coliformes totales. Ambas tienen la misma intencionalidad, conocer la carga microbiana de la matriz alimentaria, aunque el fundamento sea completamente diferente.

NMP se basa en el principio de que una sola célula del grupo de Coliformes (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* y/o *Enterobacter*); puede reproducirse por fisión binaria y producir turbidez. Posterior al montaje de diluciones seriadas o decimales en serie de la muestra inicial (matriz alimentaria) estas son inoculadas en el medio de cultivo líquido adecuado para su crecimiento. Luego se incuban las muestras en tubos y pasado un tiempo se examinan. Aquellos tubos que recibieron una o más células microbianas presentarán turbidez y los que no, permanecerán transparentes. Al aumentar el factor de dilución, se llega al punto en donde algunos tubos tendrán tan solo una célula y otros ninguna. Finalmente, al calcular la probabilidad de que los tubos que no hayan recibido ninguna célula se pueden estimar el número más probable de microorganismos presentes en la matriz alimentaria, empleando una tabla estadística. Podemos concluir que este método se fundamenta en la probabilidad estadística para determinar el número de células de una muestra a analizar. A diferencia de recuento en placa, el cual consiste en realizar diluciones seriadas o decimales y extender una porción de esa muestra sobre la superficie de una placa con agar, se incuba cierto tiempo y se procede a contar las Unidades Formadoras de Colonia (UFC), las cuales están definidas como el número mínimo de células separables sobre la superficie que da lugar al desarrollo de una colonia apreciable al ojo humano, del orden de decenas de millones de células descendientes.

Fundamento teórico:

El grupo Coliformes totales, se emplean como “microorganismos indicadores”. Su presencia en matrices alimentarias puede deberse a: elaboración inadecuada de los alimentos, contaminación cruzada (alimento crudo con cocido), o crecimiento en el alimento desde la cadena de suministro entre otras.

Los mesófilos aerobios son todos aquellos microorganismos viables capaces de desarrollarse en presencia de oxígeno (aerobios) a una temperatura que va desde los 20°C y 45°C, aunque la óptima es 30°C y 40°C (mesófilos). El recuento de microorganismos mesófilos estima la microbiota presente en la matriz alimentaria, sin especificar tipos de microorganismos, es decir NO diferencia entre patógenos, deteriorantes o microbiota acompañante. Este indicador sanitario refleja la calidad y condiciones higiénicas del producto, incluido la materia prima, producto en proceso y terminado. Un recuento bajo no asegura ausencia de patógenos, ni un recuento alto no significa presencia de microorganismos potencialmente peligrosos. Ahora bien, salvo en matrices fermentadas, no son recomendables recuentos elevados.

Si hubo excesiva contaminación de la materia prima, deficiente manipulación durante el proceso de elaboración, alteración del producto y/o posibilidad de que existan patógenos, pues estos son mesófilos, es probable que los recuento de mesófilos sean elevados. Es necesario implementar medidas de control microbiano por parte del profesional de la industria alimentaria.

Desarrollo paso 1:

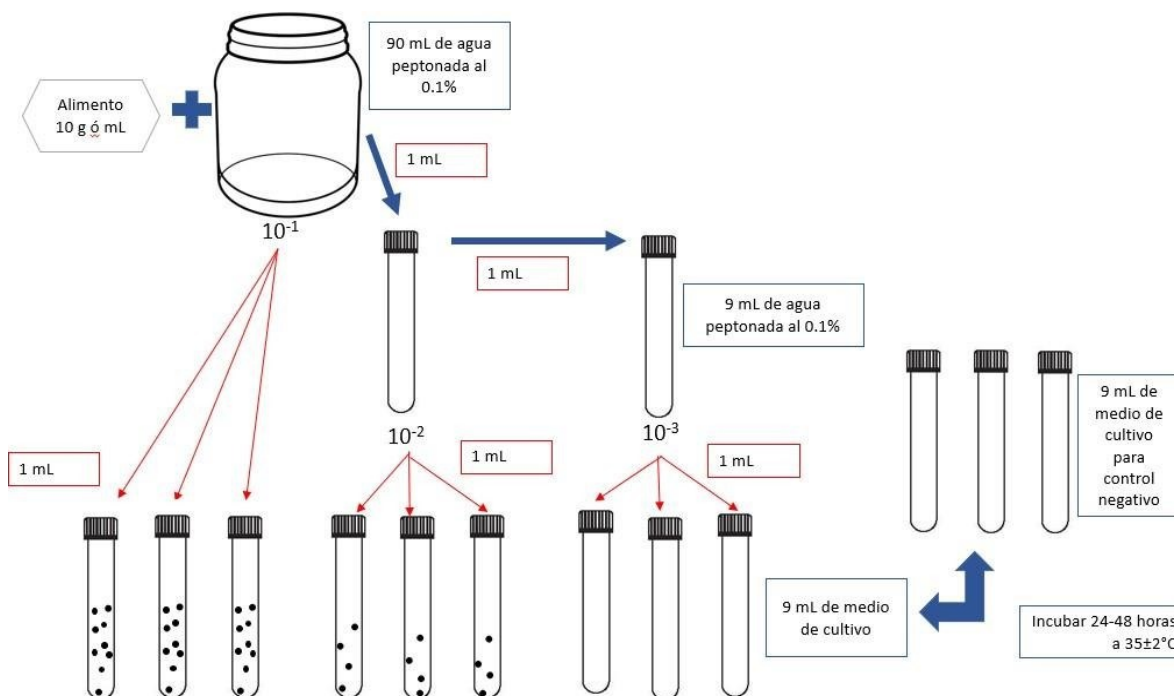
A. Número Más Probable (NMP)

Todo el material destinado para el desarrollo de esta práctica debe estar debidamente rotulado y estéril (Figura 1). Montaje deben ser llevados a cabo preferiblemente en cabina de bioseguridad.

- I Tomar 10 gramos ó mililitros de la muestra
- II Agregar a 90 mL de agua peptonada al 0.1% estéril.
- III. Realizar diluciones seriadas 10-1, 10-2 y 10-3
- IV. Homogeneizar en agitador en vórtice durante 15 segundos
- V. Inocular 1 mL de cada dilución en el medio de cultivo Brilla
- VI. Incubar 24-48 horas a 35±2°C, incluidos los tubos de control negativo.
- VII. Lectura:

- Tubo positivo: medio turbio con producción de gas
 - Tubo negativo: medio transparente sin producción de gas
- VIII. Analizar la secuencia numérica obtenida (por ejemplo 3-3-0) teniendo en cuenta la tabla para 3 réplicas de Brilla, correlacionándolo con la muestra analizada.

Figura 1: Montaje para NMP en alimentos



Nota. En la figura se presenta el modelo del montaje para la de determinación de número más probable por diluciones seriadas. Fuente (Wilches, 2022).

- **Recuento en placa para mesófilos aerobios**

Todo el material destinado para el desarrollo de esta práctica debe estar debidamente rotulado y estéril (Ver Figura 2). Montaje deben ser llevados a cabo preferiblemente en cabina de bioseguridad.

- Rotular debidamente en todo el contorno de la base de las cajas de Petri la siguiente información. Iniciales del nombre del estudiante, fecha de inoculación, dilución y tipo de ensayo: Mesófilos aerobios (MA)
- Rotular debidamente el material de vidrio estéril para las diluciones seriadas

- III. Tomar 10 gramos ó mililitros de la muestra
- IV. Agregar a 90 mL de agua peptonada al 0.1% estéril. Realizar diluciones seriadas 10-1, 10-2 y 10-3
- V. Homogeneizar en agitador en vórtice durante 15 segundos
- VI. Inocular 0.1 mL ó 100 µL de cada dilución en la superficie del medio de Plate count por triplicado y el mismo volumen para evaluar la esterilidad del agua peptonada al 0.1%.
- VII. Utilizando un rastrillo de dispersión de vidrio o plástico (también conocido como asa de hockey o digralsky) disperse el inóculo tan rápidamente como sea posible de manera uniforme sobre la superficie de agar sin tocar las paredes laterales de la caja. Permita que el medio de cultivo absorba el inóculo durante 15 min. aproximadamente a temperatura ambiente.
- VIII. Invierta inmediatamente las cajas una vez han sido inoculadas y colóquelas rápidamente en la incubadora durante 24-48 horas a 35±2°C, incluidas las tres cajas de control negativo y las de control del agua peptonada al 0.1%.

Después del periodo de incubación establecido cuente las colonias para cada caja que contenga mínimo 10 colonias y máximo 300 colonias.

Calcule la cantidad N de microorganismos presentes en la muestra de ensayo como un promedio ponderado a partir de dos diluciones sucesivas utilizando la siguiente ecuación:

$$N: \frac{\sum c}{V * 1.1 * d}$$

Donde:

Σc: es igual es la suma de colonias contadas en las dos cajas provenientes de dos diluciones sucesivas, por lo menos una de las cuales contiene un mínimo de 10 colonias

V: es el volumen de inóculo puesto en cada caja, en mililitros

D: es la dilución correspondiente a la primera dilución retenida o seleccionada

Aproxime el resultado calculado hasta dos cifras decimales. Al hacer esto, si la tercera cifra es inferior a 5, no modifique la cifra precedente; si la tercera cifra es superior o igual a 5, incremente la cifra precedente en una unidad. Expresé el resultado preferiblemente como un número entre 1,0 y 9,9 multiplicado por la potencia correspondiente de 10, o un número entero con dos cifras decimales.

Cuestionario del paso 1:

- A. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio:
- B. ¿consumirías o no el alimento analizado? Justifique su respuesta.
- C. Con relación a los datos experimentales obtenidos y las metodologías empleadas,
- D. ¿cuál de los dos métodos te genera más confianza? Justifique su respuesta
- E. Realice cuadro comparativo con las ventajas y desventajas de ambas técnicas.
- F. Describa la composición de los medios de cultivo Brilla y Plate Count. ¿Cuál es la fuente de carbono y de nitrógeno de los medios? ¿Qué relación la composición del medio de cultivo con los alimentos? ¿El medio tiene inhibidores? Justifique sus respuestas.
- G. Diseñe y diligencie una tabla donde se expresen los resultados obtenidos.

Todos los cuestionarios de los pasos de la práctica de laboratorio deben ser entregado al tutor asignado del componente practico bajo los siguientes lineamientos:

Documento Word con portada, introducción (2 párrafos coherentes con las actividades desarrolladas y mínimo 150 palabras), desarrollo de los cuestionarios de las 4 (cuatro) actividades y referencias bibliográficas con normas APA (mínimo 10).

Además de revisión realizada de la ortografía, redacción, colocación de número de las páginas, justificación de párrafos y otros detalles de forma que son importantes para presentación de trabajos académicos.

Paso 2. Efectividad de agentes químicos para control microbiano

Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes:

Materiales, insumos, reactivos y equipos

- Tubos tapa rosca
- Hipoclorito de Sodio o Cloro
- Ácido acético o vinagre blanco
- Alcohol antiséptico
- Jabón líquido
- Peróxido de hidrogeno o agua oxigenada

- Papel absorbente
- Marcador de vidrio
- Cinta de enmascarar
- Hisopos estériles
- Guantes de látex
- Cajas de Petri con medio de cultivo Plate count o nutritivo
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora
- Autoclave
- Mecheros
- Agitador en vórtice o vórtex
- Pipeteadores
- Gradilla
- Pipetas estériles

Propósito:

Evaluar la efectividad de agentes químicos como desinfectantes, jabones y antisépticos para el control de microorganismos de importancia en la industria alimentaria.

Fundamento técnico:

Los procesos de limpieza y desinfección química están íntimamente ligados a la industria alimentaria, es por lo que eliminar la suciedad y la materia orgánica de todo el material y/o superficies utilizadas en la preparación de alimentos o en acciones indirectas se conoce como limpieza y desinfección química se define como proceso en el que se emplean agentes químicos para inviabilizar células microbianas. El objetivo es poder garantizar la inocuidad de los alimentos.

Desarrollo paso 2:

Todo el material destinado para el desarrollo de esta práctica debe estar debidamente rotulado y estéril (Ver Figura 3). Montaje deben ser llevados a cabo preferiblemente en cabina de bioseguridad.

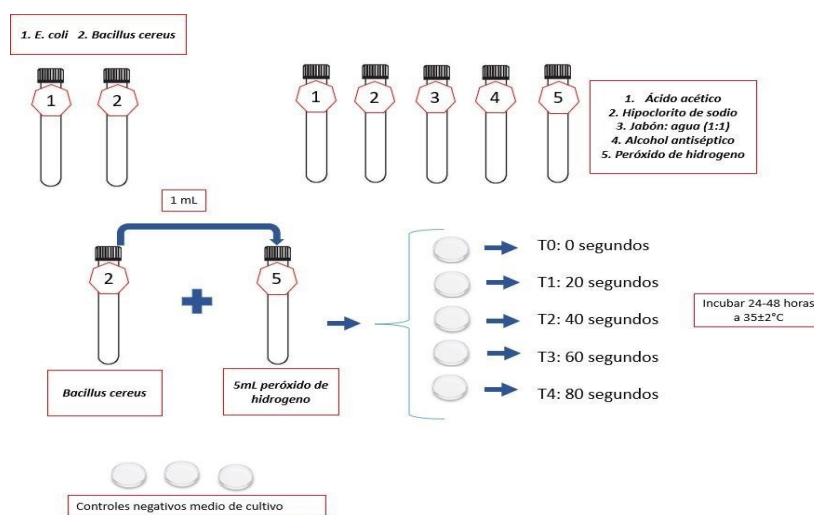
Se realizará efectividad cualitativa de agentes químicos (ácido acético, jabón, hipoclorito de sodio, alcohol antiséptico y peróxido de hidrogeno) contra microorganismos bacterianos tipo *Escherichia coli* o *Bacillus cereus*

- I. Tomar 5 cajas de Petri con medio de cultivo plate count o nutritivo y rotular debidamente en todo el contorno de la base la siguiente información. Iniciales del nombre del estudiante, fecha de inoculación, agente químico evaluado y tiempo de toma de muestra (expresado en segundos)

- II. En un tubo tapa rosca agregue 5 mL del agente químico evaluado
- III. Agregue 1 mL de medio de cultivo con *Bacillus cereus* o *E. coli* cultivados previamente en caldo nutritivo.
- IV. Con un escobillón estéril introdúzcalo en el tubo tapa rosca inoculado con la bacteria y el agente químico, elimine el exceso en las paredes del tubo y siembre en agar plate count o nutritivo, en los siguientes tiempos:
 - ✓ T0: inmediatamente después de inocular
 - ✓ T1: a los 30 segundos exactos
 - ✓ T2: a los 60 segundos exactos
 - ✓ T3: a los 90 segundos exactos
 - ✓ T4: a los 120 segundos exactos
 - ✓
- V. Permita que el medio de cultivo absorba el inóculo durante 15 min. aproximadamente a temperatura ambiente. Invierta inmediatamente las cajas una vez han sido inoculadas y colóquelas rápidamente en la incubadora durante 24-48 horas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, incluido triplicado de cajas de control negativo.
- VI. Después del periodo de incubación establecido, inspeccione visualmente las cajas buscando crecimiento microbiano.

Nota aclaratoria: El jabón se prepara en una proporción 1:1, es decir 2.5 mL de agua y 2.5 mL de jabón líquido, homogeneizando en agitador en vórtice durante 15 segundos.

Figura 3. Evaluación cualitativa de agentes químicos para el control microbiano.



Nota. En la figura se presenta el modelo del montaje para la evaluación cualitativa usando diferentes químicos de desinfección. Fuente (Wilches, 2022).

Cuestionario del paso 2:

- I. ¿Como se clasifican los desinfectantes según su efectividad?
- II. Describa brevemente cuál es el modo de acción de un desinfectante tipo: Alcoholes, aldehídos y fenoles; Amoniacales, halógenos y Oxidantes.
- III. ¿Crees que evaluar los agentes químicos con *Bacillus cereus* o *E. coli* es lo mismo? Justifique su respuesta.
- IV. ¿Qué pH tiene el ácido acético o vinagre blanco y el hipoclorito de sodio? ¿Crees que el pH influye sobre el crecimiento de los microorganismos? Justifique su respuesta
- V. Diseñe y diligencie una tabla donde se expresen los resultados obtenidos.

Paso 3. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento microbiano

Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes:

- Tubos tapa rosca con medio de cultivo liquido nutritivo
- Alcohol antiséptico
- Papel absorbente
- Marcador de vidrio
- Cinta de enmascarar
- Guantes de látex
- Cajas de Petri con medio de cultivo Plate count o nutritivo
- Asa en aro
- Cabina de bioseguridad
- Incubadora
- Autoclave
- Mecheros
- Agitador en vórtice o vórtex
- Gradilla

Propósito:

Evaluar el efecto de la temperatura sobre los microorganismos de importancia en la industria alimentaria

Fundamento técnico: La temperatura juega un papel fundamental en la industria de los alimentos siendo necesario monitorearla para utilizarla a favor del control de los microorganismos en las matrices alimentarias.

Las altas temperaturas desnaturalizan proteínas y enzimas, modificando las estructuras moleculares de los microorganismos y causando inviabilidad celular, además porque alteran el metabolismo microbiano. Por consiguiente, el seguimiento a este factor de proceso tecnológico es tan importante.

Desarrollo paso 3:

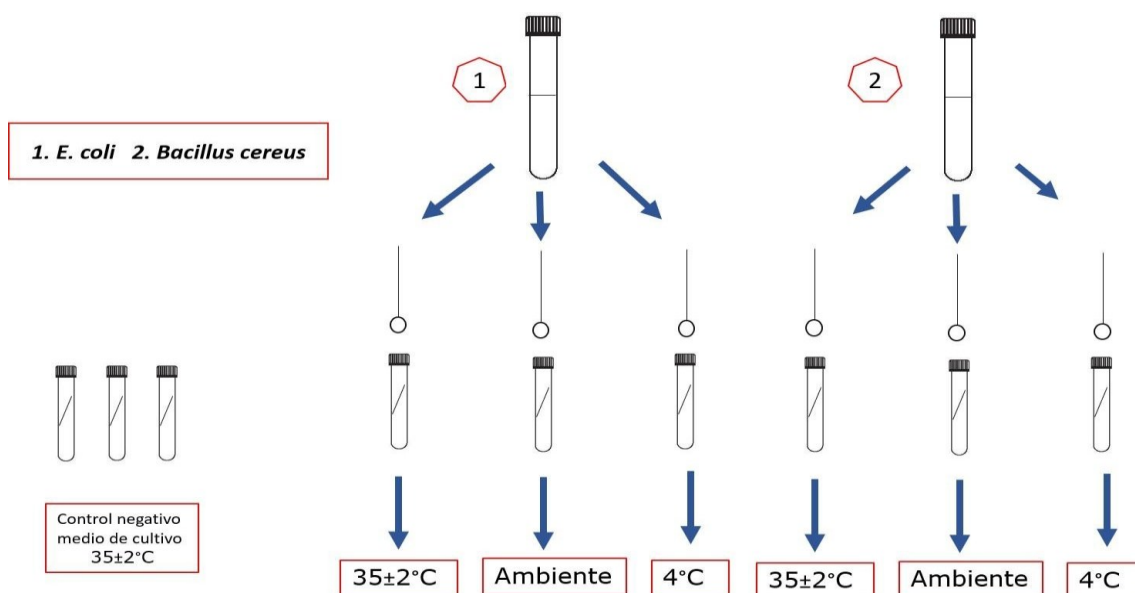
Todo el material destinado para el desarrollo de esta práctica debe estar debidamente rotulado y estéril (Ver Figuras 4 y 5). Montaje deben ser llevados a cabo preferiblemente en cabina de bioseguridad.

Evaluación de la temperatura optima de crecimiento

- ✓ Esterilizar a fuego directo asa en aro
- ✓ Sumergir en caldo de cultivo nutritivo cultivado previamente con *E. coli* o *Bacillus cereus*, el asa en aro e inocular por estría en agar inclinado de Plate count o nutritivo por triplicado.
- ✓ Incubar los tubos durante 24 horas de la siguiente manera 1 tubo a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$
 - 1 tubo a temperatura ambiente
 - 1 tubo a temperatura de refrigerador (4°C)
- ✓ Posterior al tiempo de incubación la lectura se realiza así:
 - Una cruz (+) poco desarrollo de las colonias microbianas
 - Dos cruces (++) desarrollo regular de las colonias microbianas
 - Tres cruces (+++) desarrollo abundante de las colonias microbianas

Nota aclaratoria: Es necesario tomar nota de temperatura ambiente del día para el análisis de resultados e incubar controles negativos del medio de cultivo.

Figura 4. Evaluación de la temperatura óptima de crecimiento

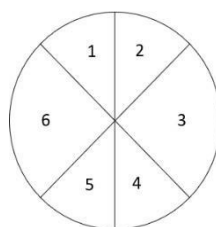


Nota. En la figura se presenta el modelo del montaje para la evaluación de la temperatura óptima de crecimiento microbiano. Fuente (Wilches, 2022).

Punto térmico mortal para bacteria no esporulada (*E. coli*) y esporulada (*Bacillus cereus*)

- Divida el reverso de una caja de Petri con medio de cultivo Plate count o nutritivo con un marcador de vidrio en seis partes. Así:

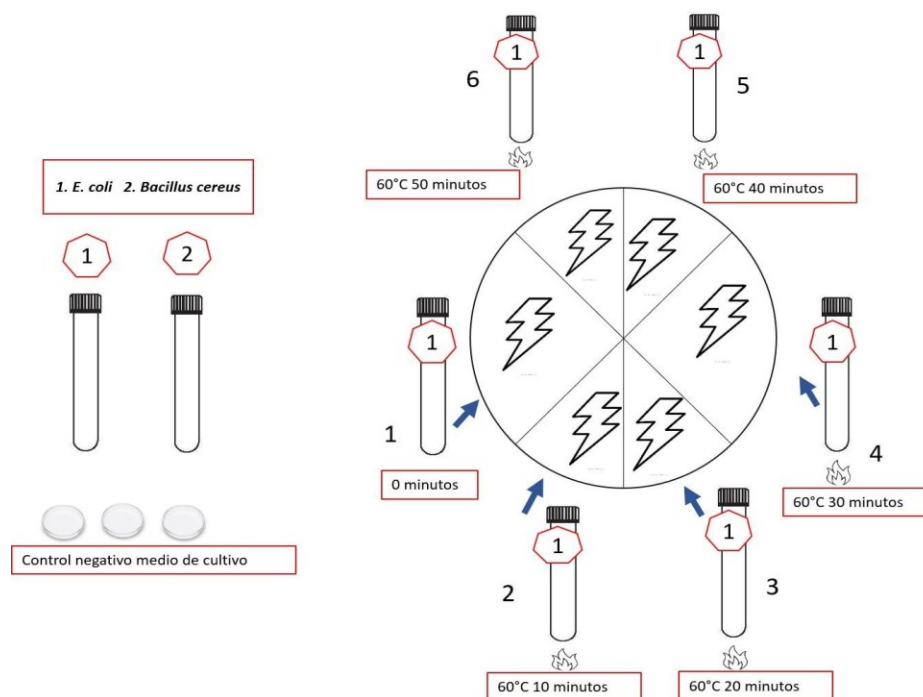
Figura 4.1. Caja de Petri con medio de cultivo



Nota. En la figura se presenta el modelo de partición de una caja de Petri para evaluar las diferentes temperaturas de crecimiento. Fuente (Wilches, 2022).

- Esterilizar a fuego directo asa en aro
- A partir de un cultivo de *E. coli* en caldo nutritivo (5 mL) tomar una asada y siembre por estría cerrada en la división 1.
- Sumergir el tubo en un baño termostático a 60°C. Tome una asada, luego de 10 minutos de estar expuesto a la temperatura y siémbrela en el sector 2; y así sucesivamente cada 10 minutos, hasta completar 50 minutos.
- Permita que el medio de cultivo absorba el inóculo durante 15 min. aproximadamente a temperatura ambiente. Invierta inmediatamente las cajas una vez han sido inoculadas y colóquelas rápidamente en la incubadora durante 24-48 horas a 35±2°C, incluido triplicado de cajas de control negativo.
- Realizar este mismo procedimiento para *Bacillus cereus*.

Figura 5. Punto térmico mortal para bacteria no esporulada (*E. coli*) y esporulada (*Bacillus cereus*)



Nota. En la figura se presenta el modelo del montaje para la evaluación de la temperatura mortal para bacterias esporuladas y no esporuladas. Fuente (Wilches, 2022).

Cuestionario del Paso 3:

- I. 1. Diseñe y diligencie una tabla donde se expresen los resultados obtenidos. Cual interpretación le puedes dar a los resultados obtenidos.
 - II. 2. Describa el proceso de esporulación de una bacteria con sus propias palabras
 - III. 3. Después de esta práctica experimental crees que la expresión: “el calor lo mata todo” es cierta? Justifique su respuesta
 - IV. 4. Defina que es el efecto bacteriostático y bactericida con sus propias palabras. Evite copiar y pegar textual de fuentes bibliográficas.
-

Paso 4. Diferenciación y observación de microorganismos

Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes:

- Alcohol antiséptico
- Papel absorbente
- Marcador de vidrio
- Cinta de enmascarar
- Guantes de látex
- Cajas de Petri con medio de cultivo e inoculado con *Bacillus cereus*
- Tubo tapa rosca inoculado con *E. coli*
- Caja de petri con Sabouraud inoculado con *Aspergillus sp* o *Fusarium sp*
- Caja de Petri con Sabouraud inoculado con *Saccharomyces cerevisiae*
- Colorantes para tinción de Gram: Cristal Violeta, Lugol, alcohol acetona, safranina.
- Colorante para hongos: azul de lactofenol

- Colorante para endosporas: verde de malaquita 5%, safranina acuosa al 0,5 %
- Agua destilada
- Asa en aro y en punta
- Mecheros
- Porta objetos y cubre objetos
- Cinta pegante delgada
- Cabina de bioseguridad
- Mecheros

- Gradilla
- Microscopio
- Aceite de inmersión

Nota: Todo el material destinado para el desarrollo de esta práctica debe estar debidamente rotulado y estéril. Montaje deben ser llevados a cabo preferiblemente en cabina de bioseguridad.

Propósito:

Diferenciación y observación de microorganismos de interés en la industria alimentaria

Fundamento teórico:

La identificación de fuentes de contaminación en la industria de los alimentos implica un conocimiento profundo tanto de los factores implícitos, es decir de los microorganismos como de los factores tecnológicos. Al identificar la fuente, controlas el microbiota no deseado dentro del alimentos, aumentas la productivas y garantizas inocuidad alimentaria. Cuando tengas un alimento contaminado con mohos y levaduras piensa en el ambiente (no siendo el único habitad, pero si el más común), a diferencia de las bacterias las cuales tienen su nicho ecológico en los seres humanos, en las superficies, en el suelo y el aire. De estos argumentos nace la necesidad de observar los microorganismos al microscopio para poder aumentar el conocimiento microbiológico, conocer su estructura para de esta manera, poder controlarlos de manera eficiente.

Desarrollo paso 4:

Tinción de Gram:

Técnica que tiene 4 pasos fundamentales: tinción, fijación, decoloración y contraste. Por ello, además de colorear microorganismos tipo bacterias, también permite diferenciarlas.

- I. De un cultivo previamente inoculado con E. coli tomar una asada y colocarla en el portaobjetos
- II. Fijar el frotis con calor hasta su secado completo, colocarla sobre un puente de coloración para evitar machas en lugares no deseados.

- III. Portaobjetos con el frotis bacteriano cubierto completamente con cristal violeta por 1 minuto.
- IV. Lavar con agua de grifo. No secar
- V. Cubrir la lámina con solución de Lugol, dejar actuar durante 1 minuto. Lavar con agua. No secar.
- VI. Decolorar por 10 segundos con alcohol acetona.
- VII. Lavar con agua. No secar.
- VIII. Volver a colocar la lámina sobre el puente de coloración y cubrir por 30 segundos con safranina
- IX. Lavar con agua y secar el portaobjetos.
- X. Posterior el secado, colocar 1 gota de aceite de inmersión para observarlo bajo el objetivo de 100X en el microscopio óptico.

Tinción para endosporas:

La técnica de Shaeffer–Fulton o Wirtz-Conklin propone los siguientes pasos para la tinción de endosporas:

- I. Hacer un extendido fino a partir del medio de cultivo líquido inoculado con
- II. *Bacillus cereus* y fijar al calor.
- III. Cubrir el portaobjetos con solución acuosa de verde de malaquita al 5 %, calentar la placa de vidrio hasta que se observe desprendimiento de vapores y retirar del fuego. Repetir durante aproximadamente 6 a 10 minutos. Si se llegase a evaporar parte del colorante puedes agregar mucho más, hasta cubrir nuevamente la totalidad del portaobjetos.
- IV. Transcurrido entre 6 y 10 minutos con Verde de Malaquita, se procede a cubrir el portaobjetos con safranina acuosa al 0,5 % durante 30 segundos
- V. Eliminar el exceso y dejar secar.
- VI. Con esta técnica las esporas se presentan de color verde y los bacilos de color rojo.

Tinción para mohos

- I. Sobre un portaobjetos limpio y seco deposite 2 gotas de azul de lactofenol
- II. Cortar un trozo de cinta adhesiva delgada y la colocas sobre el micelio aéreo suavemente.
- III. A la cinta se adhiere las esporas del moho y otras estructuras fúngicas
- IV. Pegaremos la cinta adhesiva en el portaobjetos que tiene el colorante. No se debe ejercer demasiada presión para no destruir las estructuras

del hongo, ya que estas son extremadamente frágiles. Se debe dejar actuar el colorante por 3 a 4 minutos aproximadamente.

- V. Luego de este tiempo, ya la preparación está lista para ser observada al microscopio en aumento de 10X o 40X.

Cuestionario del paso 4

- A. Diferencia entre micelio aéreo y micelio vegetativo. Como correlacionas estos conceptos con la contaminación con mohos en alimentos.
- B.Cuál es el fundamento e importancia de la tinción de Gram y de la tinción de endosporas. Mencione ejemplos de géneros y especies microbianos tanto Gram positivos como negativos de interés en la industria alimentaria. Cuales son los dos géneros más importantes que generan esporas en los alimentos?
- C. ¿Porque el manipulador de alimentos es una potencial fuente de contaminación para la industria alimentaria? Si un manipulador de alimentos es portador sano de *Staphylococcus aureus*; ¿cuáles medidas preventivas utilizarías para mantener esta fuente controlada?
- D. ¿Crees que un cuchillo mal lavado es una fuente probable de contaminación? Justifique su respuesta
- E. ¿Qué significa 4X, 10X, 40X y 100X en microscopia?

Paso 5. Simulación del crecimiento/inactivación de microorganismos

Los recursos con los que debe contar para el desarrollo de la actividad son los siguientes:

- Computador, Tablet o celular
- Registro en combase
<https://combasebrowser.errc.ars.usda.gov/membership/Login.aspx?ReturnUrl=%2f>
- Conectividad internet

La actividad consiste en:

Propósito:

Simular el crecimiento o inactivación de microorganismos de interés en la industria alimentaria, mediante el uso del software de predicción Combace.

Fundamento teórico:

De acuerdo con la USDA; U.S. Department of Agriculture por sus siglas en inglés, los modelos predictivos de ComBase son una colección de herramientas de software basadas en datos para predecir el crecimiento o la inactivación de microorganismos, es así como el objetivo de ComBase es describir y predecir cómo los microorganismos sobreviven y crecen en una variedad de condiciones relacionadas principalmente con los alimentos.

Predecir el crecimiento o la inactivación de microorganismos mediante el uso de software de simulación es importante ya que permite la optimización de recursos, al hacer análisis basados en investigaciones y/o publicaciones realizadas por otros y poder a partir de estos tomar decisiones para: informar sobre el diseño de planes de gestión de riesgos de seguridad alimentaria, la elaboración de planes de seguridad alimentaria y planes HACCP, reducir el desperdicio de alimentos y para la evaluación del riesgo microbiológico en los alimentos.

Desarrollo paso 5:

Seleccionar individualmente tres microorganismos de la siguiente lista para su análisis:

- ✓ Aeromonas hydrophila
- ✓ Bacillus Subtilis
- ✓ Brochothrix thermosphacta
- ✓ Pseudomonas

Crear una cuenta personal en combase con los datos allí solicitados, e ingresar al software.

Nota: Si se presenta algún inconveniente de acceso por favor contactar al tutor asignado en la primera semana de iniciado el e

Seguir esta ruta una vez ingrese a Combase:

- (I) Clic en Broth models
- (II) Clic en Growth
- (III) Clic en Selecciona el microorganismo
- (IV) Clic en Identifica los parámetros

Usar estos parámetros de configuración para el análisis:

- ✓ Init level (inóculo)
- ✓ Phy.state (estado fisiológico de los microorganismos: se debe dejar fijo para cada análisis, es decir no se debe mover)

- ✓ Temp °C (Temperatura expresada en Celsius)
- ✓ pH
- ✓ Aw (Actividad acuosa)
- ✓ CO₂ % (Porcentaje de dióxido de carbono)
- ✓ Lactic ppm (Partes por millón de ácido láctico)
- ✓ Nitrite ppm (Partes por millón de nitritos)
- ✓ Todos los parámetros tienen un intervalo, con un límite superior y uno inferior.
- ✓ logcCFU/g: significa la cantidad de microorganismos expresado como Logaritmo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por cada gramo de alimento.
- ✓ Time (h): significa el tiempo expresado en horas.

Nota aclaratoria: el tiempo debe estar ajustado a 200 horas.

Posterior a la identificación de los parámetros en el software y de seleccionar el microorganismo; resolver las siguientes situaciones problemáticas:

Qué interpretación se puedes dar a la curva en la gráfica, en función del tiempo y de la cantidad de microorganismo, cuando:

- ✓ **Situación problemática 1.** Todos los parámetros están en límite inferior. ¿Para esta situación se acorta o se alarga la fase de adaptación? ¿Qué forma de control aplicaría para este caso?
- ✓ **Situación problemática 2.** Todos los parámetros están en límite superior. ¿Para esta situación se acorta o se alarga la fase logarítmica? ¿Qué forma de control aplicaría para este caso?
- ✓ **Situación problemática 3.** todos los parámetros están a la mitad del intervalo. ¿Para esta situación se acorta o se alarga la fase estacionaria? ¿Qué forma de control aplicarías para este caso?
- ✓ **Situación problemática 4.** Ajusta todos los parámetros a la mitad del intervalo excepto la temperatura. ¿Para esta situación problemática cuales fases se observan en la curva de la gráfica? ¿Qué forma de control aplicaría para este caso?

Las respuestas deben ser redactadas y justificadas en sus propias palabras, con sustento teórico, cualitativo, cuantitativo y bibliográfico, citado con normas APA.

Se debe anexar la captura de pantalla de cada situación problemática simulada en combase.

Cuestionario del paso 5:

Es preciso resolver las situaciones problemáticas justificando sus respuestas específicas con referencia a los microorganismos seleccionados, evitando copiar y pegar textual de páginas web u otras fuentes de información.

Paso 6. Simulación con el Programa de Modelado de Patógenos (PMP).

Establecer 5 bondades y 5 limitaciones de los modelos de inactivación térmica para microorganismos que están relacionadas con alimentos

Ingresar al PMP, mediante el siguiente enlace:

<https://pmp.errc.ars.usda.gov/PMPOnline.aspx?ModelID=2021161#noq>
[o](#)

- I. Una vez se haya ingresado, se recomienda revisar el “tutorial” para comprender el alcance del modelo y variables para el análisis de los resultados obtenidos, de acuerdo con los datos de entrada que se suministren.
- II. Se debe seleccionar el modelo de “inactivación por calor” y de la lista de modelos que se presentan elegir 3 modelos para el análisis.
- III. Para cada uno de los modelos, genere al menos 3 entradas de datos para el análisis de acuerdo con las variables de calculo abiertas para cada uno de ellos.
- IV. Realice el registro de la imagen de lo arrojado por cada una de las situaciones calculadas.
- V. Genere un informe del análisis apropiado de acuerdo con 6 preguntas planteadas desde su rol de Ingeniero de alimentos, responsable de la inocuidad en la producción, para considerarse a partir de lo observado.

Un ejemplo puede darse al seleccionar el modelo de:

Modelo predictivo para la reducción de Salmonella spp. en productos de carne seca con temperatura, sorbato de potasio, pH y actividad del agua como factores de control. Las condiciones de entrada que se pueden ingresar se refieren a los parámetros de: Sorbato de potasio, pH y actividad de agua, de los cuales se recomienda hacerlos variar de acuerdo con los límites del modelo y generar los cálculos correspondientes para el análisis. Al respecto el informe puede llevar por ejemplo el análisis de estas preguntas:

- I. ¿Cómo influyen la temperatura, el sorbato de potasio, el pH y la actividad de agua en la reducción de Salmonella spp? en la carne seca?

- II. ¿Cuál es la tasa de reducción de Salmonella spp? en la carne seca bajo condiciones específicas de temperatura, ¿sorbato de potasio, pH y actividad de agua?
- III. ¿Qué combinación de estos factores (temperatura, sorbato de potasio, pH, actividad de agua) optimiza la reducción de Salmonella spp? en la carne seca?
- IV. ¿Se puede predecir la supervivencia o inactivación de Salmonella spp? en un producto cárnico similar a la carne seca dadas ciertas condiciones?
- V. ¿Qué riesgo de seguridad alimentaria podría existir si se alteran los parámetros de procesamiento de la carne seca, basándose en las predicciones del modelo sobre Salmonella spp??
- VI. ¿Podría el modelo ser adaptado o extendido para predecir el comportamiento de otros patógenos en la carne seca, o de Salmonella spp? en otros productos cárnicos?
- VII. ¿Cuáles son los rangos seguros de temperatura, sorbato de potasio, pH y actividad de agua para el procesamiento de carne seca con el fin de controlar Salmonella spp?, según el modelo?

Se debe recordar que las preguntas resueltas de los cuestionarios de todos los pasos de las practicas se deben entregar a los tutores, de acuerdo con lineamientos estipulados para la entrega.

Evidencias de trabajo independiente:

Las evidencias de trabajo independiente para entregar son:

- ✓ Evidencia de asistencia a cipas o web de preparación del componente practico
- ✓ Presentar Preinforme del componente de acuerdo con lineamientos del tutor del CP en zona
- ✓ Presentar quiz de evaluación sobre las practicas del Cp del curso antes de realizar las practicas en el laboratorio
- ✓ Entrega de informe de acuerdo los lineamientos de calidad en cuanto a estructura y contenido

Evidencias de trabajo grupal:

En esta actividad no se requieren evidencias de trabajo grupal:

4. Lineamientos generales para la elaboración de las evidencias

Para evidencias elaboradas **de forma independiente**, tenga en cuenta las siguientes orientaciones:

Antes de entregar el producto solicitado deben revisar que cumpla con todos los requerimientos que se señalaron en esta guía de actividades de componente práctico.

Tenga en cuenta que todos los productos escritos independientes o grupales deben cumplir con las normas de ortografía y con las condiciones de presentación que se hayan definido.

En cuanto al uso de referencias considere que el producto de esta actividad debe cumplir con las normas APA

En cualquier caso, cumpla con las normas de referenciación y evite el plagio académico, para ello puede apoyarse revisando sus productos escritos mediante la herramienta Turnitin que encuentra en el campus virtual.

5. Situaciones de orden académico

Considere que en el acuerdo 029 del 13 de diciembre de 2013, artículo 99, se considera como faltas que atentan contra el orden académico, entre otras, las siguientes: literal e) "El plagiar, es decir, presentar como de su propia autoría la totalidad o parte de una obra, trabajo, documento o invención realizado por otra persona. Implica también el uso de citas o referencias faltas, o proponer citas donde no haya coincidencia entre ella y la referencia" y literal f) "El reproducir, o copiar con fines de lucro, materiales educativos o resultados de productos de investigación, que cuentan con derechos intelectuales reservados para la Universidad."

Las sanciones académicas a las que se enfrentará el estudiante son las siguientes:

- a) En los casos de fraude académico demostrado en el trabajo académico o evaluación respectiva, la calificación que se impondrá será de cero puntos sin perjuicio de la sanción disciplinaria correspondiente.
- b) En los casos relacionados con plagio demostrado en el trabajo académico cualquiera sea su naturaleza, la calificación que se impondrá será de cero puntos, sin perjuicio de la sanción disciplinaria correspondiente.