**TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS.**

**Objetivos**

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

* Explicar el fundamento de la técnicas más utilizadas en el recuento microbiano: microscópico, turbidimétrico, filtración y siembra en placa, reducción de indicadores óxido-reducción.
* Establecer la cantidad de microorganismos en una muestra mediante la aplicación de las técnicas más adecuadas.
* Relacionar los resultados obtenidos y explicar las causas que determinan la variación de éstos.

**Introducción**

El crecimiento de los microorganismos presentes en sustratos que se encuentren en condiciones que lo propicien, se traducirá primero en el aumento de los componentes celulares, y en seguida por el aumento del tamaño y el incremento del número de células. Los estudios relacionados con el análisis de muestras como agua, alimentos, leche y aire requieren de una enumeración cuantitativa de los microorganismos presentes en estos compuestos, ya que la calidad microbiológica de estos productos está en relación directa con la calidad sanitaria y la seguridad para el consumo de ellos.

Por lo heterogéneo de los microorganismos y de las muestras, existen muchos métodos para tales fines que incluyen métodos microscópicos o directos, el uso de contadores electrónicos de células como el contador Coulter, métodos químicos que permiten estimar la masa celular o constituyentes celulares, lecturas turbidimétricas que se pueden relacionar con el aumento de la masa celular y el método de cuenta en placa de unidades formadoras de colonias.

Las sesiones están diseñadas para realizar:

* 1. La determinación cuantitativa de bacterias en agua utilizando tres métodos que forman parte del método oficial para determinar la calidad bacteriológica del agua: coliformes totales por el método del Número Más Probable (NMP) y el método de filtración para determinar coliformes fecales. La cuantificación de bacterias mediante los métodos: Cuenta directa al microscopio (Método de Breed) y el Redox, ambos aplicados en el análisis de leche.
  2. El método turbidimétrico para la construcción de una curva que relaciona la densidad óptica y el log de UFC obtenido en cada muestra. El método turbidimétrico es aplicado para ajustar inóculos a una determinada concentración o en el caso de vacunas.

**Método del Número Más Probable (NMP): Cuantificación de coliformes totales y fecales**

**Método de Filtración y Siembra en Placa: Cuantificación de Coliformes Fecales**

**ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y OTRAS MUESTRAS.**

**Materiales**

Material por equipo:

Pinzas de pato

Manguera para vacío

Membrana Millipore estéril de 5 cm de diámetro y 0.45 µm de poro

1 Placa Petri de ENDO

Vaso de precipitado de 250 mL

Pinzas Millipore

Manguera para vacío

5 Tubos de 22 x 175 con 10 mL de Caldo lauril sulfato (triple concentración) con campana de Durham

Material que deben tener los alumnos:

200mL de muestra de agua presumiblemente potable (cisterna, pileta, garrafón, etc.)

Equipo Millipore para filtración (matraz, filtro, embudo) estéril

Mecheros

Gradillas

Asas

Etanol (96°) para flamear pinzas

Pinzas de punta roma

Pipetas serológicas de 1.0 mL estériles

### Metodología

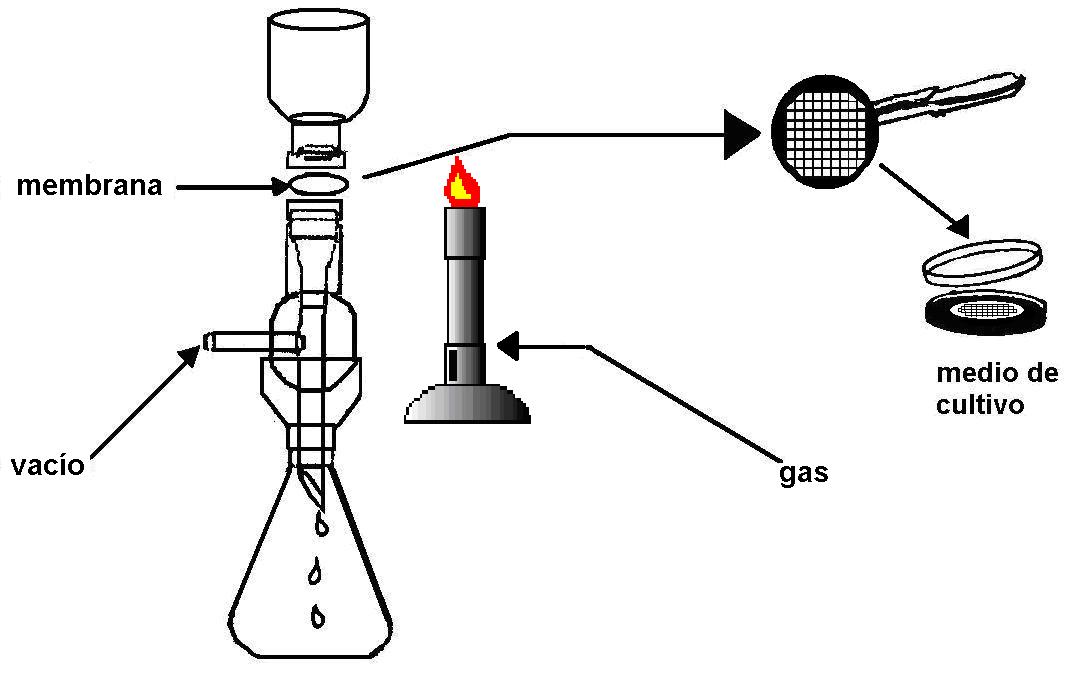
* 1. Técnica del Número Más Probable (NMP).

(**PRUEBA PRESUNTIVA del análisis microbiológico del agua).**

1. Colocar en la gradilla los 5 tubos con caldo lactosado doble concentración y rotularlos.
2. Agitar la muestra para homogeneizarla.
3. En condiciones asépticas colocar a cada tubo 10 mL del agua a analizar. Agitar los tubos para homogeneizar la muestra.
4. Incubar los tubos a 35 ± 0,5°C. Examinar los tubos a las 24 h., observar si hay formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham); si no se observa producción de gas, incubar 24 h. más.

7.2 Técnica de filtración:

1. Montar el equipo Millipore en condiciones de asepsia, y conectarlo al sistema de vacío (figura 1).
2. Colocar la membrana Millipore estéril (cuadriculado hacia arriba) en el soporte, con la ayuda de una pinza (de punta roma) previamente flameada con alcohol y enfriada.
3. Montar nuevamente el equipo y fijarlo con la pinza adaptadora (pinza de pato).
4. Agitar vigorosamente el frasco que contiene la muestra de agua y verter 100 mL en el embudo del equipo Millipore y filtrar al vacío; cuando haya pasado toda la muestra, con el filtro aún en su lugar, enjuague el embudo mediante la filtración de 100 mL de solución buffer de fosfatos (procurar que el líquido recorra las paredes del embudo). Cerrar el vacío antes de retirar la membrana.
5. Retirar la membrana tomándola con la pinza estéril y depositarla asépticamente sobre la placa de agar ENDO, asegurando el contacto de la membrana con el medio.
6. Incubar a 37° C durante 24-48 h.



**Precauciones generales**

* Procura emplear propipetas en buen estado. Es importante que las cantidades (volúmenes o masa) empleadas en esta práctica sean exactas.
* El rotulado de tubos y cajas es básico en esta práctica, pues una equivocación conduce a la obtención de resultados erróneos.
* Si la muestra de agua, que se usará para la cuantificación de bacterias coliformes mediante la técnica de filtración, está turbia (presencia de sólidos), será necesario diluirla o cambiar de muestra.
* Ten mucho cuidado al tomar la membrana. Si ésta se rompe no servirá para el análisis.

**Disposición de desechos**

1. Las pipetas se depositan en el pipetero (recipiente largo) con desinfectante inmediatamente después de su uso. Dejar actuar por 10 minutos, sacar las pipetas, envolverlas en papel kraftin para su esterilización y finalmente lavarlas con agua y jabón.

**RESULTADOS DE: Métodos del Número Más Probable (NMP) y Filtración**

Por equipo

* 5 tubos de 16 x 150 mm con 10.0 mL de caldo bilis verde brillante con campana de Durham.
* 5 de 16 x 150 mm con 10.0 mL de caldo EC y campana de Durham

Material que deben tener los alumnos:

* 1 gradilla
* Mechero
* Asa bacteriológica.

Técnica del Número Más Probable (NMP).

1. Observar y registrar el número de tubos que muestren turbidez, acidificación del medio y presencia de gas resultante del crecimiento microbiano.
2. Con los resultados obtenidos calcular el NMP de microorganismos utilizando la tabla correspondiente.
3. Reportar el NMP/ 100mL de muestra.
4. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales.

* Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos que contienen caldo de bilis verde brillante (brila) con campana Durham.
* Agitar suavemente los tubos par su homogeneización
* Incubas a 35±2°C durante 24 a 48h.
* Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48h
* Consultar la tabla 1 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes totales/100mL.

1. Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales.

* Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos con caldo EC
* Agitar suavemente los tubos para su homogeneización
* Incubar a 44.5± 0.1°C en incubadora o un baño de agua con circulación durante 24 a 48h
* Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe crecimiento y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48
* Consultar la tabla 1 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes fecales/100mL.

Control de calidad para coliformes fecales:

* Inocular en tubos de caldo EC una cepa de *E. coli* como control positivo y una de *Enterobacter* *aerogenes* como control negativo e incubar junto con las muestras.

Técnica de filtración.

1. Revisar las membranas sobre las placas y ubicar la presencia de colonias típicas:
   * 1. De coliformes. Color rojo obscuro con brillo metálico. El área brillante puede variar de tamaño desde que solo brille la parte superior de la colonia hasta que abarque la superficie total de la colonia, las colonias atípicas de coliformes pueden ser rojo oscuro o nucleadas sin brillo.
     2. No coliformes. Colonias sin brillo, que pueden ser rosas, rojas, blancas o incoloras.
2. Utilizar un cuentacolonias para contar las colonias con las características antes descritas cuyo número oscile entre 20 y 80 con un límite máximo de 200.
3. Reportar el número de UFC /100 mL de muestra.
4. Consultar la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que señala los límites permitidos de bacterias coliformes fecales y confirmar si el agua analizada reúne y cumple con lo establecido.

**Método del Número Más Probable (continuación)**

Por equipo

* 2 cajas Petri con agar Eosina azul de metileno

Material que deben tener los alumnos:

* 1 gradilla
* Mechero
* Asa bacteriológica.

1. Prueba confirmativa de *Escherichia coli*.

* Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría en cuadrante radial en agar eosina azul de metileno (EMB) para su aislamiento.
* Incubar las placas invertidas a 35°C por 18-24h.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos en los que preparó las suspensiones bacterianas y posteriormente lavarlos.
2. Después de realizar las lecturas correspondientes, sellar las caja de Petri de plástico con la membrana *Millipore* y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

**Método del Número Más Probable (continuación)**

**Materiales**

Por equipo

Microscopio

Juego de colorantes de Gram

2 cajas Petri con agar cuenta estándar

Material que deben tener los alumnos:

* 1 gradilla

**Método**

1. Prueba confirmativa de *Escherichia coli*.

* Seleccionar dos colonias de cada placa de EMB con la siguiente morfología colonial: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido a *E. coli* de cada placa.
* Realizar tinción de Gram.
* Sembrar la colonia seleccionada (bacilo corto gram negativo) en agar cuenta estándar.
* Incubar las placas a 35°C por 18-24h.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos en los que preparó las suspensiones bacterianas y posteriormente lavarlos.
2. Después de realizar las lecturas correspondientes, sellar las caja de Petri de plástico con la membrana *Millipore* y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

**Método del Número Más Probable (continuación)**

Por equipo:

4 Tubos de 13 x 100

1 con caldo triptona

2 con caldo RM-VP

1 con caldo triptona o citrato de Simmons

Material que deben tener los alumnos:

* 1 gradilla
* Asa bacteriológica
* Mechero

**Metodología**.

1. Identificación bioquímica de *Escherichia coli* mediante pruebas IMViC

INOCULACIÓN

* Seleccionar una colonia desarrollada en agar cuenta estándar, resuspenderla en 2mL de solución salina isotónica para realizar las siguientes pruebas bioquímicas:
  1. Producción de indol(I)
* Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con caldo triptona.
* Incubar a 35°C por 24 ± 2h.
  1. Producción de ácidos mixtos (o prueba de rojo de metilo, RM)
* Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo que contenga caldo RM-VP
* Incubar a 35°C por 24 ± 2h.
  1. Producción de metabolitos neutros (Voges-Proskauer VP)
* Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo que contenga caldo RM-VP
* Incubar a 35°C por 24 ± 2h.
  1. Utilización del citrato como única fuente de carbono (C)
* Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo que contenga agar citrato de Simmons.
* Incubar a 35°C por 96h.

**NOTAS.**

* Para determinar la producción de indol, en lugar de caldo triptona puede utilizarse el medio SIM. Este medio se inocula por picadura con el asa bacteriológica de forma recta. Se incuba a 35°C por 24 ± 2h.
* Para evitar resultados falsos positivos, en el agar citrato de Simmons e inóculo no debe ser muy abundante. Además de ser este el primer medio en sembrar.

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE PRUEBAS IMVIC

**Materiales**

Por equipo

* Frascos gotero con reactivo de Ehrlich o Kovac
* Frascos gotero con indicador rojo de metilo
* Frascos gotero con reactivo alfa naftol (VP1)
* Frascos gotero con solución de hidróxido de potasio al 40 % (VP2)

**Metodología**

a. Producción de indol (I)

* Finalizada la incubación, adicionar entre 0.2 y 0.3 mL de reactivo de Kovacs o Ehrlich.
* La presencia de una coloración roja en la superficie del tubo se considera como prueba positiva para la presencia de indol.

b. Producción de ácidos mixtos (o prueba de rojo de metilo, RM)

* Finalizada la incubación, adicionar 5 gotas de solución de rojo de metilo.
* Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo. Un color amarillo es una prueba negativa.

c. Producción de metabolitos neutros (Voges-Proskauer VP)

* Finalizada la incubación, adicionar 0.6 mL de solución KOH 40% (VP1), agitar y 0.2 mL de solución alfa- naftol (VP2) y agitar.
* Dejar reposar el tubo destapado durante 10 minutos; se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rosa en la superficie.

d. Utilización del citrato (C)

* Finalizada la incubación, observar el desarrollo del cultivo con el vire del indicador de verde a azul turquesa, mismo que se considera una prueba positiva.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos en los que realizaron las pruebas IMViC y posteriormente lavarlos. Desechar el agar al colocarlo en bolsas de plástico y colocarlos en los contenedores del laboratorio 1A.

**Precauciones generales**

Para obtener resultados confiables:

* Respeta los tiempos de incubación establecidos
* Agrega los reactivos en el orden indicado

**Discusión de resultados**

1. ¿Cuáles son los puntos críticos para realizar las técnicas del NMP y Filtración? ¿cuál para la de dilución y vertido en placa?
2. ¿Cuáles fueron las dificultades a las que te enfrentaste al realizar la lectura de éstas técnicas?
3. ¿Qué similitudes y diferencias existen entre las técnicas de estudio? ¿cuál crees que proporcione resultados más certeros?
4. Discute sobre la información que te proporciona cada una de las técnicas.

**Literatura de consulta**

* CCAYAC-M-004 (2006) “Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable”.
* Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
* Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8th ed.
* Food and Drug Administration (2003) “Bacteriological Analytical Manual” 9th ed. Arlington, VA:AOAC.
* Norma Ofical Mexicana NOM-041-SSA1-1993. Bienes y servicios. Agua purificada envasada.Especificaciones sanitarias.
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos.* 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Assiciation. 20th ed. Washington.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
* Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

**TÉCNICAS DE CUENTA DIRECTA:**

**Método de Breed y Método Redox.**

**Materiales**

Muestras

Leche pasteurizada

Leche no pasteurizada

Leche cruda o bronca (de establo)

Vino

Material por mesa

Solución de tiocianato de azul de metileno

Frasco gotero con azul de metileno

Material por equipo:

Microscopio

Objetivo micrométrico

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradillas

Portaobjetos

Tubos de ensayo de 16x150 con tapón de rosca estériles

Pipetas de 10 mL estériles

Pipetas de 1.0 mL estériles

Pipetas de 0.1 mL estériles

Pipetero

**Metodología**

MÉTODO DE BREED.

**Cálculo del factor microscópico (FM):**

1. Medir el diámetro del campo microscópico por medio del micrómetro objetivo, en mm.
2. Determinar el área del campo: elevar el radio al cuadrado y multiplicar por 3.1416. Dividir este resultado entre 100 para obtener el área del campo en centímetros cuadrados.
3. Determinar el número de dichos campos en 1 cm2, dividiendo 1 cm2 entre el área del campo obtenido antes.
4. Como se coloca 0.01 mL de leche en un área de 1 cm2, multiplicar el número de campos por 100 para conocer el número de campos microscópicos por mL de leche.

**Preparación de la muestra:**

1. En un portaobjetos desengrasado marcar un área de 1 cm2.
2. Agitar la muestra de vino.
3. Con una pipeta estéril tomar 0.01 mL del vino y transferirlo al portaobjetos previamente marcado, extendiendo la muestra en el área marcada con el asa.
4. Dejar secar al aire.
5. Teñirlo con solución de azul de metileno durante 2 minutos. Lavar con agua. Dejar secar a temperatura ambiente.
6. Observar en el microscopio con objetivo de inmersión y contar el número de microorganismos por campo, obteniendo el promedio de 5 campos.
7. Calcular el FM.
8. Calcular el número de bacterias por mL de vino.

MÉTODO REDOX (reducción del azul de metileno).

Reducción del azul de metileno:

1. Agitar la muestra de leche pasteurizada y transferir 10 mL a un tubo de ensayo.
2. Agitar la muestra de leche cruda y transferir 10 mL a otro tubo de ensayo.
3. Agregar a cada tubo 1 mL de la solución de colorante, mezclar bien y colocarlos en un baño de agua a 37°C (o en la incubadora).
4. Después de 10 minutos, asegurar los tapones e invertir lentamente los tubos tres veces para distribuir la capa de crema.
5. Observar cada 30 minutos y continuar la incubación hasta que registre decoloración del colorante.
6. Anotar los resultados obtenidos prácticamente, de acuerdo con la clasificación indicada en el cuadro 1.

***Cuadro 1.*** Clasificación de la calidad de leche y número de microorganismos, mediante la técnica de reducción del azul de metileno.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Calidad** | **Tiempo (°C) de incubación en el que se presenta la decoloración** | **Número de microorganismos / mL** |
| Excelente | No se decolora en 5.5 h | < de 500 000 |
| Buena | Se decolora entre las 2 y 5.5 h | 500,000 a 4 000 000 |
| Mala | Se decolora entre los 20 minutos y 2 h | 4 a 20 millones |
| Muy mala | Se decolora en 20 minutos | > de 20 millones |

**Precauciones generales**

* Registra los tiempos adecuadamente para observar el cambio de color en las muestras de leche empleadas para cuantificar microorganismos mediante la técnica de Redox.

**Disposición de desechos**

1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
3. Las muestras de leche con colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio.

**Discusión de resultados**

1. ¿Cuál fue la problemática a la que te enfrentaste para llevar a cabo los métodos de Breed y Redox?

**Literatura de consulta**

* Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
* Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
* Ramírez-Gama, R. M., Luna, B., Velásquez, O., Vierna, L., Mejía, A., Tsuzuki, G., Hernández, L., Camacho, A. y Urzúa, M. C. 2015. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Assiciation. 20th ed. Washington.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
* Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

**MÉTODO TURBIDIMÉTRICO**

**Materiales**

Material por equipo

Matraz nefelométrico conteniendo un cultivo de *Escherichia coli* de 24 horas.

Celdas para espectrofotómetro

Tubo de ensayo de 22x175 con 20 mL de caldo nutritivo estéril.

Material que deben tener los alumnos:

Cajas de Petri estériles de plástico

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Pipetas graduadas de 10 mL estériles

Pipetas graduadas de 5 mL estériles

Tubos de ensayo de 16x150 vacíos con tapón de rosca estériles

**Metodología**

1. Agregar 1 gota de formaldehído a los tubos con muestra.
2. Vaciar el contenido de cada uno de ellos a 5 celdas espectrofotométricas y proceder a tomar la lectura del % de transmitancia.
3. Agitar suavemente el matraz que contiene el cultivo de *Escherichia coli,* insertar el tubo lateral en el espectrofotómetro y tomar la lectura del % de transmitancia.
4. Construir una gráfica (*y*=No. Microorganismos, *x*=% transmitancia) con la Curva de McFarland.
5. Obtener la ecuación de la recta a partir de la curva e interpolar los datos obtenidos para los tubos muestra en la curva de McFarland.

**Precauciones generales**

* Procura homogenizar perfectamente tus cultivos al realizar cada dilución, y antes de leer el % transmitancia.

**Disposición de desechos**

1. Esterilizar los tubos en los que preparó las suspensiones bacterianas y posteriormente lavarlos.

**Discusión de resultados**

1. ¿Qué precauciones propondrías para mejorar el método turbidimétrico?

**Literatura de consulta**

* Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
* Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
* Madigan, M. T., J.M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice may Iberia, España.
* Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20th edition. Washington.
* Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994.
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cumings Publishing Company, Inc. 801 pp.

DILUCIÓN Y CUENTA EN PLACA.

**OBJETIVOS.**

Al finalizar la práctica el estudiante será capaz de:

* Determinar la cantidad de microorganismos viables, por medio del método de dilución y cuenta en placa, a partir de una muestra problema.

**INTRODUCCIÓN.**

La dilución y cuenta en placa es un método de cuantificación de microorganismos que nos permite determinar la cantidad de microorganismos viables, es decir vivos, presentes en una muestra problema. Su metodología se basa en llevar a cabo diluciones seriales hasta un intervalo de concentración en el cuál sea posible contar las colonias presentes cultivadas en un medio de cultivo adecuado. Una vez llevada a cabo la cuenta, se puede determinar la concentración de microorganismos en nuestra muestra inicial considerando las diluciones que hayan sido necesarias y el número de repeticiones de las mismas.

**MATERIALES.**

* **PARA ANÁLISIS DE PROBIÓTICO (YOGURT PARA BEBER):**
* 7 Tubos de ensaye con 9.0 ml de solución salina isotónica estéril (SSI).
* 7 Cajas Petri con medio de cultivo MRS para lactobacilos.
* Pipetas graduadas estériles de 1 ml.
* “L” de vidrio estéril.
* Cuenta colonias.

MUESTRA:

* Yogurth para beber u otro probiótico
* **PARA ANÁLISIS DEL ALIMENTO O REMEDIO NO EMPAQUETADO:**
* Cuadro de papel estéril de 8x8.
* Cuchara metálica estéril.
* Balanza analítica.
* 1 Matraz Erlenmeyer con 90.0 ml de SSI estéril.
* 3 Tubos de ensaye con 9.0 ml de solución salina isotónica estéril.
* 7 Cajas Petri con medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) o Agar Tripticaseina de Soya (TSA).
* 4 Pipetas graduadas estériles de 1 ml.
* “L” de vidrio estéril.
* Cuenta colonias

**MUESTRA:**

Producto farmacéutico de libre venta.

**MÉTODO**

* **PARA ANÁLISIS DE PROBIÓTICO (YOGURT PARA BEBER):**

1. Antes de abrir el yogurt, agítalo suavemente unos segundos para homogenizar el contenido.
2. Ordena tu material cerca de la llama y genera tu zona aséptica con tu mechero.

Rotula los tubos con SSI como 10-1 a 10-7 y las cajas con 10-5, 10-6 y 10-7 (dos para cada dilución).

1. **A PARTIR DE ÉSTE MOMENTO, TRABAJANDO SOLAMENTE DENTRO DE LA ZONA ASÉPTICA**, destapa el yogurt y con la pipeta estéril, toma un volumen de 1.0 ml depositando el inóculo en un primer tubo de ensaye con 9.0 ml de SSI. Con la punta de la pipeta dentro de la SSI, sube y baja la solución salina un par de veces para “lavar” el interior de la pipeta teniendo cuidado de no mojar la torunda de algodón al final de la misma y tapa el tubo de ensayo. Agita suavemente este tubo con la Dilución 10-1 para homogenizar la suspensión de microorganismos.
2. Nuevamente dentro de la zona aséptica, destapa el tubo y toma con la misma pipeta un volumen de 1.0 mL de la “Dilución 10-1”. Tapa el tubo de ensaye y toma un segundo tubo de con SSI e inocúlalo con 1.0 ml de la “Dilución 10-1”. Lava el interior de la pipeta subiendo y bajando el nivel de la SSI un par de veces sin mojar la torunda de algodón al final de la misma. Tapa el tubo de ensayo, rotúlalo como “Dilución 10-2” y agita suavemente para homogenizar la suspensión microbiana.
3. Repite el procedimiento de tomar 1.0 ml de la última dilución y deposítalo en un nuevo tubo de SSI. Repetir el lavado del interior de la pipeta subiendo y bajando un par de veces el nivel de la SSI y rotula el tubo con la dilución respectiva y continúa así hasta llegar a una dilución de 10-6.
4. Rotula dos cajas Petri como “Dilución 10-6”, dos como “Dilución 10-5”, dos como “Dilución 10-4” y una como “Control”. (lo pase al punto 2 para que tengan todo el material listo antes de iniciar el trabajo).
5. Después de realizar las diluciones, **DENTRO DE LA ZONA ASÉPTICA**, toma con una pipeta graduada estéril un volumen de 2.0 ml de la “Dilución 10-6” y vierte 1.0 ml al centro de una caja Petri del medio de MRS rotulada para dicha dilución y coloca el segundo volumen de 1.0 ml en la segunda caja.
6. Repetir la metodología del punto anterior con la “Dilución 10-5” en el par de cajas Petri que rotulaste para este fin y luego para la dilución de “Dilución 10-4” en sus cajas Petri respectivas.
7. En una caja Petri rotulada como “Control”, con una nueva pipeta graduada estéril, vierte 1.0 ml de la SSI estéril.
8. Empapa la “L” de vidrio con alcohol etílico y colócala dentro de la llama del mechero un segundo para que el alcohol se encienda y dejar la “L” junto a la llama dentro de la zona aséptica hasta que el alcohol se consuma, la llama se apague y se enfríe unos segundos.
9. Utiliza la “L” de vidrio para homogenizar el inóculo en ambas cajas Petri de la “Dilución 10-4” girándolo 360°.
10. Repetir la metodología del punto 11, 12 y 13, con la “Dilución 10-5” en el par de cajas Petri que rotulaste para este fin, para las cajas que rotulaste como “Dilución 10-6” y para la caja Petri “Control”.
11. Incubar las cajas invertidas a 37 °C observando a las 24 y 48 horas y contar el número de colonias presentes en cada una de las cajas de cada dilución.
12. Obtener el promedio de ambas cajas Petri de cada dilución.
13. Utilizando la dilución más grande donde hubo una cuenta confiable de colonias, multiplicar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el factor de dilución correspondiente y reportar la concentración de microorganismos en UFC/ml.

**MÉTODO**

* **PARA ANÁLISIS DEL ALIMENTO O REMEDIO NO EMPAQUETADO:**

1. Pesa en el papel estéril 10.0 g de la muestra a analizar.
2. Ordena tu material cerca de la llama y genera tu zona aséptica con tu mechero. Rotular tubos y cajas.
3. **A PARTIR DE ÉSTE MOMENTO, TRABAJANDO SOLAMENTE DENTRO DE LA ZONA ASÉPTICA**, destapa el matraz Erlenmeyer con la solución salina isotónica estéril (SSI) y adiciona los 10.0 g del producto y tapa el matraz. Homogeniza suavemente el producto por agitación por 30 segundos.
4. Destapa el matraz en la zona aséptica y con la pipeta estéril toma un volumen de 1.0 ml, tapa el matraz y vierte el inóculo en un primer tubo de ensaye con SSI rotulado previamente como “Dilución 10-2”. Sube y baja un par de veces el nivel de la SSI para lavar el interior de la pipeta. Tapa el tubo y agita suavemente para homogenizar la suspensión de microorganismos.
5. Tomar 1.0 ml de la “Dilución 10-2” y viértelo en un segundo tubo de SSI previamente rotulado como “Dilución 10-3”. Repetir el lavado del interior de la pipeta subiendo y bajando un par de veces el nivel de la SSI. Tapa el tubo y agita suavemente para homogenizar la suspensión de microorganismos.
6. Toma 1.0 ml de la “Dilución 10-3” y viértelos en un tercer tubo de SSI previamente rotulado como “Dilución 10-4”. Repetir el lavado del interior de la pipeta subiendo y bajando un par de veces el nivel de la SSI. Tapa el tubo y agita suavemente para homogenizar la suspensión de microorganismos.
7. Después de realizar las diluciones, **DENTRO DE LA ZONA ASÉPTICA**, toma con una pipeta graduada estéril un volumen de 2.0 ml de la “Dilución 10-4” y vierte 1.0 ml al centro de la caja Petri del medio de cultivo AN o TSA rotulada para este dilución. Coloca el segundo volumen de 1.0 ml en la segunda caja Petri.
8. Repetir la metodología del punto anterior con la “Dilución 10-3” en el par de cajas Petri que rotulaste para este fin y luego para la dilución de “Dilución 10-2” en sus cajas Petri respectivas.
9. En una caja Petri rotulada como “control”, con una pipeta graduada estéril, vierte 1.0 ml de la SSI estéril.
10. Empapar la “L” de vidrio con alcohol etílico y colocarla dentro de la llama del mechero un instante para que el alcohol se encienda y dejar la “L” dentro de la zona aséptica hasta que el alcohol se consuma, la llama se apague y se enfríe unos segundos.
11. Utilizar la “L” de vidrio para homogenizar el inóculo en ambas cajas Petri de la misma dilución girándolo 360°. Una vez homogenizados ambos inóculos, volver a impregnar de etanol la “L” de vidrio y pasar por la llama para esterilizarla y proceder de la misma manera para dispersar el inóculo en cada caja Petri restante.
12. Incubar las cajas invertidas a 37 °C observando a las 24 y 48 horas y contar el número de colonias presentes en cada una de las cajas de cada dilución.
13. Obtener el promedio de ambas cajas Petri de cada dilución.
14. Utilizando la dilución más grande donde hubo una cuenta confiable de colonias, multiplicar el número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por el factor de dilución y reportar la concentración de microorganismos en UFC/ml.

**Revisar para la discusión:**

Definir los conceptos de:

* Diluciones seriadas, factor de dilución, unidades formadoras de colonias.
* Consultando en la NOM092-SSA1-1994, indica cuál es el intervalo de la cuenta confiable de colonias en la metodología de la dilución y cuenta en placa.

**Precauciones generales.**

* Tener cuidado que el trabajo que deba realizarse en la zona aséptica siempre se realice dentro de la misma.
* Realizar las cuentas de manera cuidadosa sin omitir colonias o contando de nuevo colonias ya consideradas.

**Disposición de desechos**

1. Los tubos de las diluciones seriales deben esterilizarse al igual que los matraces y una vez que estén estériles, lavarlos, dejarlos secar y entregarlos inmediatamente.
2. Las cajas Petri que vayan a ser desechadas deben de empaquetarse adecuadamente para que sean llevadas a incineración en los contenedores de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos (RPBI).

**Literatura de consulta**

* NOM092-SSA1-1994 MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.
* Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
* Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2013. Manual de Prácticas de Microbiología General. 6ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
* Stanier, R. Y., J. L Ingraham, M. L Wheelis y P. R Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
* Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp