



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Biología



Morelia, Michoacán, febrero de 2024

AUTORES

**Dra. Irene Ávila Díaz
Dra. Yazmín Carreón Abud
Dr. Miguel Martínez Trujillo
Dr. Eduardo Valencia Cantero
Biól. Ana Isabel Reza Maqueo
M. C. Cornelio Téllez Sánchez
Q.F.B. Rita Sandra Mendoza Olivares**

PARTICIPANTES EN LA ACTUALIZACIÓN DEL MANUAL

**Biol. Manuel Medina Barriga
Q.F.B. Rita Sandra Mendoza Olivares
Dra. María Gloria Solís Guzmán**

febrero de 2024



Manual de Prácticas de Biología de Procariotas y Virus

Nombre del alumno:

Sección: _____

Matrícula: _____

Profesor:

Técnico Académico:

Ciclo escolar: _____ Evaluación: _____

Procariota versus Procarionte

*Alberto Huberman

En el artículo de revisión de Cerezo Román y Madrid Marina¹ aparece la denominación de *procariontes* para las bacterias. Como este es un error muy difundido, se cree pertinente hacer la siguiente aclaración.

Karyon es una palabra neutra en griego (con el significado de nuez) y por tanto, tiende a perder la “n” final en sus derivados (cariotipo, cariocinesis, cariolinfa, carioplasma, cariosoma, etc.) al igual que los derivados de palabras neutras griegas como: metrón, electrón, etc.

Prokaryote es un neologismo inglés acuñado en 1963 a partir de: *Pro + kary + ote* (esto último por la terminación de *zygote*). En español este neologismo debe de ser “procarioto” o “procariota” o “procariote” (con la terminación de cigoto). Lo mismo es aplicable al neologismo inglés *eukaryote*, acuñado en 1943, y cuyo equivalente en español debe de ser “eucarioto” o “eucariote” o “eucariota”.

Referencia: 1.- Cerezo Román J, Madrid Marina V. Técnicas, estrategias y usos de biología molecular en medicina. Rev. Invest. Clin.1995. 47:487-98.

* Depto., de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán. Recibida el 17 de febrero de 1996.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| Presentación..... | i |
| Reglas para el trabajo en el laboratorio. | ii |
| Evaluación..... | iii |
| Práctica No 1 Técnicas de esterilización en Microbiología..... | 1 |
| Práctica No 2 Principales medios de cultivo y su preparación..... | 10 |
| Práctica No 3 Técnicas de aislamiento bacteriano..... | 17 |
| Práctica No 4 Morfología bacteriana y colonial..... | 29 |
| Práctica No 5 Preparación de frotis y tinciones..... | 37 |
| Práctica No 6 Requerimientos nutricionales de los microorganismos..... | 45 |
| Práctica No 7 Fermentación de la lactosa..... | 49 |
| Práctica No 8 Determinación de coliformes..... | 55 |
| Práctica No 9 Preparación de medio de cultivo agar leche y aislamiento de bacterias del ácido láctico..... | 62 |
| Práctica No 10 Obtención de ácido láctico y elaboración de yogurt empleando aislados de bacterias de la leche..... | 69 |
| Práctica No 11 Evaluación de productos comerciales antimicrobianos..... | 74 |
| Práctica No 12 Diferencia entre un agente bactericida y un bacteriostático..... | 78 |
| Práctica No 13 Prueba de sensibilidad a los antibióticos..... | 81 |
| Bibliografía..... | 89 |

PRESENTACIÓN

En los últimos años, las células microbianas han representado el material de estudio más comúnmente utilizado para las investigaciones sobre procesos vitales. Los organismos son también de esencial importancia en muchos de la vida humana: la práctica de la medicina, el desarrollo tecnológico (biotecnología), las prácticas agrícolas, la preparación de alimentos, la solución de problemas de contaminación, etc. La importancia de la microbiología como ciencia básica y como ciencia aplicada, difícilmente podrá ser sobrevalorada.

El presente manual pretende ser una guía para el trabajo de laboratorio del estudiante, proporcionándole además de los fundamentos teóricos, ideas claras y precisas que le permitan aprender las técnicas y procedimientos fundamentales que se emplean en el campo de la bacteriología.

“Señores, serán los microbios los que digan la última palabra”

Luis Pasteur

REGLAS PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO

- 1) Llegar a tiempo a la sesión de laboratorio. Después de 10 minutos el profesor se reserva permitir al alumno el acceso.
- 2) Para el ingreso al laboratorio es obligatorio cumplir con el “protocolo del reingreso a clases presenciales ante COVID-19”, portar cubrebocas, bata de manga larga, el cuestionario resuelto correspondiente a esa práctica.
- 3) Por causa justificada, las prácticas se pueden reponer con otro grupo, previa autorización.
- 4) Tener el manual de prácticas en las sesiones. Todas las indicaciones y metodología del trabajo se encuentran en el manual, por lo que no se permite trabajar sin él.
- 5) Leer la práctica antes de asistir a la sesión. En caso de dudas acudir a la bibliografía o con el profesor.
- 6) Tomar nota de todas las observaciones y resultados en el momento oportuno. Nunca confiarse a la memoria, ni a las notas de sus compañeros.
- 7) Entregar los reportes en el tiempo indicado por el profesor de laboratorio: no se aceptarán fuera de la fecha y hora señalada.
- 8) Aunque en algunas ocasiones se trabaje en equipo, presentar los reportes en forma individual.
- 9) El alumno debe guardar la debida compostura para escuchar las indicaciones del profesor.
- 10) El alumno que su promedio final no sea aprobatorio, automáticamente reprobará la materia.

EVALUACIÓN

- Se requiere del 100% de asistencia a las sesiones del laboratorio.
- Se calificará en escala de 0 a 10 cada informe de prácticas de acuerdo a la calidad del mismo.

El laboratorio se evaluará de la siguiente manera:

| | |
|---------------------------|------|
| Reporte de prácticas | 50% |
| Trabajo en el laboratorio | 50% |
| TOTAL | 100% |

La evaluación de laboratorio tiene un valor del 50% y la teoría del 50% ambos valores deben ser aprobatorios para obtener la calificación FINAL en la materia.

Reporte de práctica

1. El reporte a entregar consta de las siguientes secciones:
 - a. Resultados (Gráficas, Cálculos, Tablas o lo que se indique)
 - b. Esquemas, dibujos, fotos
 - c. Cuestionario
 - d. Conclusiones
 - e. Bibliografía



PRÁCTICA No. 1

TÉCNICAS DE ESTERILIZACIÓN EN MICROBIOLOGÍA

INTRODUCCIÓN

Existen diversos métodos físicos de esterilización y de inhibición del crecimiento microbiano, como pueden ser el calor, la filtración y la radiación, pero el más ampliamente usado es el calor, ya sea húmedo o seco, los cuales tienen diferente penetrabilidad.

El calor, de cualquier forma, es utilizado extensamente como un agente letal bacteriano y se puede aplicar a numerosos instrumentos, materiales y sustancias, con el propósito de matar a las bacterias que ellos contengan.

Este proceso se llama “**Esterilización**” y al material, cultivo o medio de cultivo sometido a éste, se le denomina entonces “**Estéril**”, es decir, desprovisto de toda forma viviente.

Cuando se efectúa experimentalmente la esterilización de una población microbiana, contenida en un medio de cultivo o en todo el material utilizado en microbiología de suma importancia conocer los diversos métodos de esterilización los cuales se dividen en:

- 1). *Métodos físicos* tales como: calor, rayos ultravioleta, filtración, etc.
- 2). *Métodos químicos*, en donde se utilizan sustancias bactericidas o bacteriostáticos como son alcoholes, fenoles, halógenos, detergentes, entre otros.

La elección del método de esterilización depende del tipo de material a esterilizar, así como la finalidad que se persiga.

La esterilización por calor es uno de los métodos más comúnmente utilizados en el laboratorio, es muy útil para la cristalería, los medios de cultivo y para la esterilización de los medios después de su utilización y este puede ser:

- a) Calor Húmedo
- b) Calor Seco
- c) Calor Directo



a) Calor Húmedo

Se utiliza para esterilizar medios de cultivo, la esterilización se hace por el vapor a presión en una autoclave (Chamberland) u olla de presión.

Descripción de la autoclave.

Construido según el principio de la Marmita de Papins, es un cilindro de acero inoxidable que consta de los siguientes elementos (Fig. 1a):


| | |
|--|---|
|  | <ul style="list-style-type: none">- Un fondo de acero inoxidable con resistencia eléctrica- Un nivel con llave de paso para fluido de agua al cual se puede fijar sólidamente una tapadera de acero inoxidable por medio de pernos- Un empaque o junta de hule para asegurar su hermeticidad- Una tapadera que contiene un indicador de presión, una válvula de seguridad y una espitia de escape de vapor- Un control de tres calores (bajo, medio y alto)- Un foco piloto- Una cesta metálica |
|--|---|

Figura 1. Una autoclave es un dispositivo que sirve para esterilizar el material de laboratorio, utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura para ello. Por lo general, la utilización de una autoclave inactiva todos los virus y bacterias, aunque recientemente se ha llegado a saber de algunos microorganismos, así como los priones, que pueden soportar las temperaturas de autoclave.

Descripción de la olla. Fig. (2)

Es de forma cilíndrica de acero inoxidable y consta de los siguientes elementos:

- Un cuerpo cilíndrico con topes herméticos
- Una tapa que contiene un indicador de presión y temperatura, una válvula de seguridad y una espitia de escape de vapor.

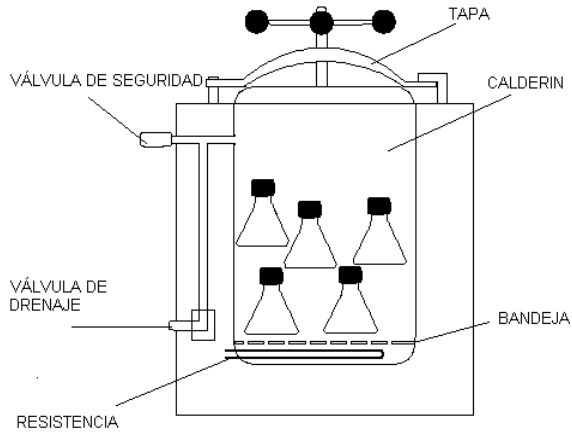


Figura 2. El tipo olla de presión es el más común, es un aparato para agua hirviendo a presión. Tiene una cámara vertical de metal provista de una tapa metálica fuerte que se aprieta y cierra herméticamente mediante un aro de goma. Se disponen en la tapa una espita para la salida del aire y el vapor, un indicador de presión y una válvula de seguridad. El agua del fondo de la autoclave se calienta mediante mecheros de gas exterior, un calentador eléctrico de inmersión o un serpentín de vapor.

b) Calor Seco

La esterilización se hace por medio de un horno que permite alcanzar temperaturas más elevadas (150-180°C) que no pueden soportar los medios de cultivo y el material de goma o plástico, se utiliza más para la esterilización del material de vidrio (matraces, pipetas, cajas de Petri, etc.) y en los instrumentos.

Descripción del Horno de Pasteur (Fig.3)

Es de forma rectangular, tiene doble pared que permite circular el calor producido por unos picos de gas o una resistencia eléctrica. Se utiliza para esterilizar material de vidrio, porcelana y también para objetos metálicos. El material deberá introducirse en el horno una vez limpio y seco, una vez introducido hay que procurar que estos no toquen las paredes de la estufa, porque alcanza temperaturas muy altas. Una vez introducido el material, se cierra el horno y se enciende, dejándolo calentar hasta 180 °C, dejándolo a estas temperaturas por espacios de tiempo variables, dependiendo del tipo de material que se ha introducido. Una vez transcurrido el tiempo deseado se apagará y se dejará enfriar totalmente antes de sacar el material.



Figura 3. El horno Pasteur como su nombre lo indica fue descrito por Luis Pasteur



c) Calor Directo

Se utiliza en asas bacteriológicas y agujas de inoculación. La esterilización se efectúa directamente en la flama del mechero hasta al rojo vivo del metal (Fig.4).

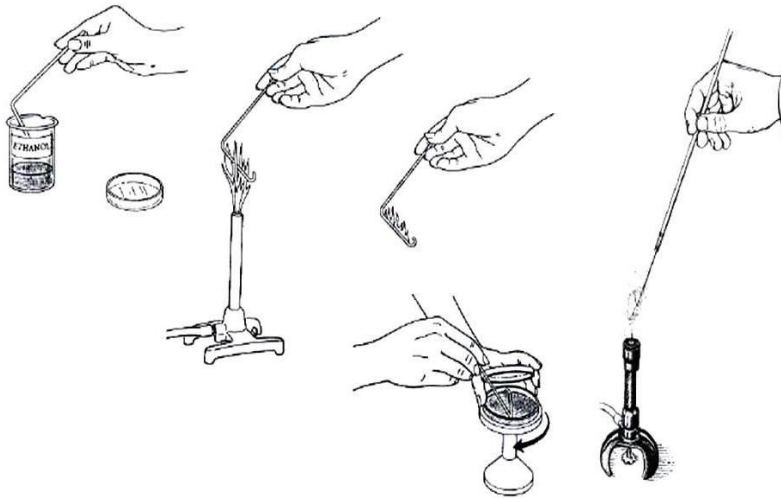


Figura 4. La esterilización adecuada del material es importante para obtener los resultados esperados.

OBJETIVO

Conocer y aplicar las técnicas de esterilización utilizadas en bacteriología, así como comprender la importancia de este proceso.

MATERIALES

- Medios de cultivo: SIM, caldo nutritivo, agar sangre, agar nutritivo, etc.
- Alcohol o fenol
- Cajas de Petri
- Tubos de ensaye
- Pipetas
- Matraz Erlenmeyer
- Asas y aguja de siembra
- Pipeteros
- Autoclave u olla de presión
- Horno de esterilización
- Papel revolución
- Algodón y gasas



METODOLOGÍA

A. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR HÚMEDO

Se utiliza principalmente la autoclave o la olla de presión, es útil para medios de cultivo.

AUTOCLAVE

1.- Lavar el material de vidrio (matraces) hasta dejarlos perfectamente limpios y libres de sales, para lo cual se lavan y después se les da un enjuague final con agua destilada.

2.- Colocar el o los medios de cultivo ya preparados (de acuerdo a las indicaciones del frasco) en los matraces o tubos de ensaye antes de su esterilización.

3.- Tapar el material de vidrio ya sea con sus tapaderas o fabricarlas con algodón y/o gasa.

4.- Depositar el material en la cubeta de la autoclave, cuidando de colocar un capuchón de papel aluminio en el cuello del material.

5.- Vaciar el agua destilada en la autoclave hasta donde indica la marca del nivel.

6.- Cerrar la tapa cuidando de apretar los pernos como lo indique el instructor.

7.- Encender y girar el reóstato (botón) en la posición "alto".

8.- Cuando el agua contenida dentro de la autoclave hierve, el vapor elimina el aire de la autoclave, el escape del vapor por la espitia (que estará abierta) es irregular. Un chorro continuo indica la eliminación completa del aire, con lo que se procede a cerrar la espitia, la temperatura y la presión suben enseguida.

9.- Cuando se ha obtenido la temperatura deseada de 121°C que corresponde a 1 Kg. de presión o 15 libras, girar el botón en la posición de "medio" lo cual nos permite conservar la temperatura y la presión deseada por un tiempo determinado de 15 minutos a 121°C con 1 Kg. o 15 libras de presión.

10.- Trascurridos los 15 minutos se coloca el reóstato en la posición de "OFF" (apagado), el manómetro indicará un descenso en la presión.

11.- Cuando la presión es nula o marca 0°C, se abre la espitia de escape de vapor, penetrando el aire al aparato. **Solamente entonces puede abrirse la tapa y retirar los objetos húmedos ya esterilizados.**



NOTA: para la cristalería el procedimiento es de la misma manera.

OLLA DE VAPOR

- 1.- Colocar en la olla de presión el agua suficiente para que el nivel llegue hasta la rejilla.
- 2.- Introducir el material perfectamente limpio y libre de sales con el medio de cultivo ya preparado para esterilizar (ya con tapones en el caso de matraz Erlen Meyer).
- 3.- Cerrar la olla herméticamente.
- 4.- Poner calor y esperar a que salga el aire contenido dentro de la olla.
- 5.- Cerrar la válvula y dejar que el manómetro marque 121°C, 1 Kg. o 15 libras de presión.
- 6.- Mantener la temperatura necesaria para que la presión permanezca constante durante 15 minutos.
- 7.- Transcurrido el tiempo, retirar la olla del fuego y **dejar que baje la presión hasta 0°C para poder destapar la olla.**

B. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR SECO

- 1.- El material de vidrio debe encontrarse limpio y libre de sales.
- 2.- Se procede a tapar el material ya sea con sus tapaderas o fabricarlas con algodón y/o gasa.
- 3.- Envolver en papel y llevarlo al horno (evitando el contacto con las paredes del horno), las extremidades de los objetos que llevan algodón o papel deben colocarse hacia arriba.
- 4.- Encender y controlar la calidad de la flama si el calentamiento es con gas.
- 5.- Para tubos de vidrio, pipetas (por separado) y cristalería en general, utilizar 170°C por espacio de 1 hora.
- 6.- Transcurrido el tiempo de esterilización se apaga el horno y se deja enfriar para sacar el material.

NOTA: Los pipeteros requieren de un tiempo de 2 horas.



C. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR DIRECTO

Se utiliza para asas bacteriológicas y agujas de inoculación.

- 1.- Estas se deben esterilizar antes y después de llevar acabo la siembra de cualquier tipo de bacteria.
- 2.- Poner el asa o aguja directamente en la parte azul de la flama durante algunos segundos.
- 3.- Cuando el metal se torna de color rojo, se retira y se enfría cerca de la llama del mechero.

REPORTE

Resultados:

1. Hacer un resumen de cada uno de las técnicas realizadas, comentando su experiencia personal.

| |
|---|
| A. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR HÚMEDO |
| B. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR SECO |
| C. TÉCNICA DE ESTERILIZACIÓN CON CALOR DIRECTO |



5. En base a tu respuesta anterior ¿Por qué no se utilizan las otras técnicas conocidas?

6. Completa la siguiente tabla con los datos de las diferentes formas de aplicar calor para la esterilización en autoclave, olla de presión y horno de Pasteur.

| | Temperatura | Presión | Tiempo |
|------------------|-------------|---------|--------|
| Autoclave | | | |
| Olla de presión | | | |
| Horno de Pasteur | | | |

7. ¿Por qué el asa bacteriológica se debe esterilizar siempre antes y después de usarse?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 2

PRINCIPALES MEDIOS DE CULTIVO Y SU PREPARACIÓN

INTRODUCCIÓN

El estudio adecuado de las bacterias, exige como requisito previo, poder cultivarlas en condiciones de laboratorio. Para lograr esto, es preciso conocer, los elementos nutritivos para la obtención de energía que será empleada para la biosíntesis y la reproducción celular y las condiciones físicas. Las exigencias nutritivas de las bacterias se han establecido después de dilatadas investigaciones, cuyos resultados han sido el desarrollo de numerosos medios de cultivo artificiales, estas necesidades nutritivas son muy diversas, debido a ello existen grandes diferencias.

Los medios de cultivo más comunes utilizados son los que están constituidos con peptonas, extractos de carne o carne parcialmente digerida y extractos de levadura llamados también medios basales.

Cuando hay que utilizar medios sólidos, se agregan agar a los medios líquidos, como agente coagulante o solidificante. La preparación de los medios de cultivo, ha sido reemplazada en gran medida por el uso de medios de cultivo deshidratados a los cuales se les agrega agua destilada, tales medios son estables y bien estandarizados con respecto a pH y concentración de materiales. Según el propósito para lo que son fabricados los medios de cultivo se pueden clasificar en:

- a) **Medios basales, básicos o generales:** Son medios simples que contienen en general los nutrientes esenciales para promover el desarrollo de microorganismos poco exigentes nutricionalmente *in vitro*, ejemplo: agar nutritivo (A.N.), caldo nutritivo (C.N.), agar soya triptosa (T.A.S.), caldo soya tripticasa (T.C.S.) y caldo cerebro corazón (B.H.I.).
- b) **Medios enriquecidos:** Son medios que han sido complementados con otros nutrientes que proporcionan factores de crecimiento y cuya finalidad es promover el desarrollo de microorganismos de requerimiento nutricional más exigentes, ejemplo: gelosa sangre (G.S.), gelosa chocolate (G.CH.).
- c) **Medios selectivos o inhibitorios:** Cuando una muestra contiene gran cantidad de microorganismos, su crecimiento puede ser excesivo por lo que es necesario suprimir su desarrollo y al mismo tiempo promover y/o seleccionar el crecimiento de los microorganismos de interés que pudieran encontrarse en dicha muestra, ejemplo: agar verde brillante (A.V.B.), agar *salmonella – shigella* (S.S).



- d) Medios diferenciales:** Son aquellos en los que se ponen de relieve propiedades (normalmente pruebas bioquímicas) que un determinado microorganismo posee y de esa forma se puede distinguir ese microorganismo de otros que también pueden crecer en ese medio. ejemplo: agar eosina y azul de metileno (E.M.B.), Mac Conkey (M.C.)
- e) Medios de transporte:** sirve para mantener varios microorganismos por un lapso corto de tiempo, ejemplo: Stuart, cary-blair.

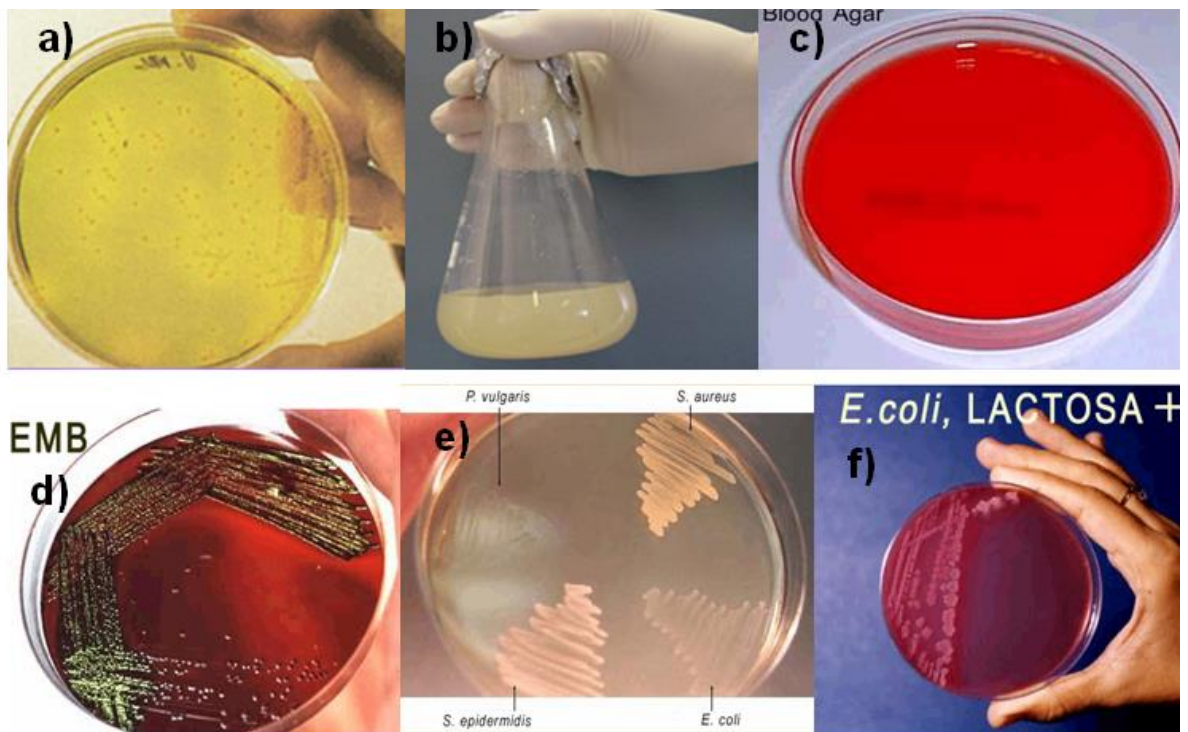


Figura 5. Tipos de medios de cultivo: a) y b) Medios generales; c) Medios enriquecidos (por ej. el agar-sangre); d) y e) Medios selectivos (por ej. Inhibidores de Gram⁺ y los medios para antibióticos); f) Medios diferenciales (por ej. el agar-Mac Conkey).

OBJETIVO

Conocer y preparar los medios de cultivo más comunes empleados en bacteriología.



MATERIALES

- Agar nutritivo
- Caldo nutritivo
- E.M.B.
- Agar (S-110)
- Medio SIM
- Agua destilada
- Cajas de Petri esterilizadas
- Tubos de ensaye
- Matraces Erlenmeyer
- Probetas.
- Balanza granataria
- Algodón o gasa estéril
- Marcador permanente

METODOLOGÍA

1.- Preparar 75 ml. o lo que indique su instructor de agar nutritivo como lo señala el frasco, esterilizar a 121°C por 15 min en autoclave u olla de presión. Vaciar el medio en cajas de Petri estériles, dejar solidificar. Marcar las cajas con lápiz graso o marcador.

2.- Preparar 70 ml. o lo que indique su instructor de agar (S-110) como lo indica el frasco, esterilizar a 121°C por 15 min en autoclave u olla de presión, vaciar en cajas de Petri estériles, dejar solidificar y rotularlas.

3.- Preparar la cantidad en mililitros que indique el instructor de E.M.B. según especificaciones del frasco, esterilizar, dejar enfriar un poco, vaciar en cajas de Petri estériles y rotular las cajas.

4.- Preparar la cantidad en mililitros que indique el instructor de medio SIM según especificaciones del frasco, distribuirlo en tubos de ensaye (7- 8 ml. c/u) esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

5.- Preparar 50 ml. o lo que indique su instructor de caldo nutritivo como lo indica el frasco, distribuirlo en tubos de ensaye (5 ml. c/u) esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

6.- Preparar la cantidad en mililitros que indique el instructor de medio Agar nutritivo según especificaciones del frasco, distribuirlo en tubos de ensaye (6 ml cada uno), esterilizar y dejarlos enfriar en superficie inclinada.

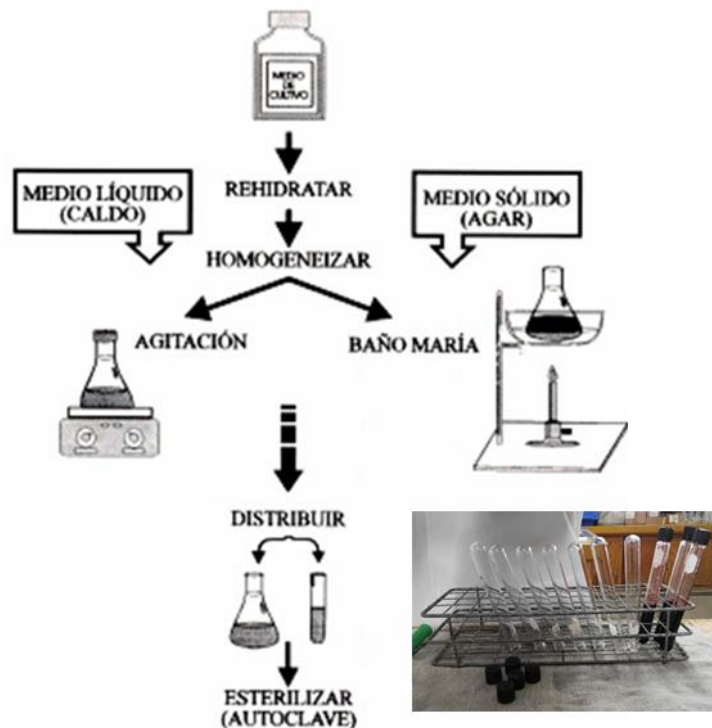


Figura 6. Antes de ser esterilizados en autoclave, los medios líquidos se distribuyen en los recipientes adecuados (tubos o matraces) y se tapan; en ningún caso la altura del líquido en el recipiente debe exceder un tercio del volumen total de éste. Si se trata de un medio que contenga agar (sólido o semisólido) suele ser preciso calentarlo (al baño María o al microondas) para fundir el agar antes de esterilizarlo en el autoclave. Una vez fundido se reparte en matraces o en tubos (nunca en placas de Petri), se tapa y se esteriliza.

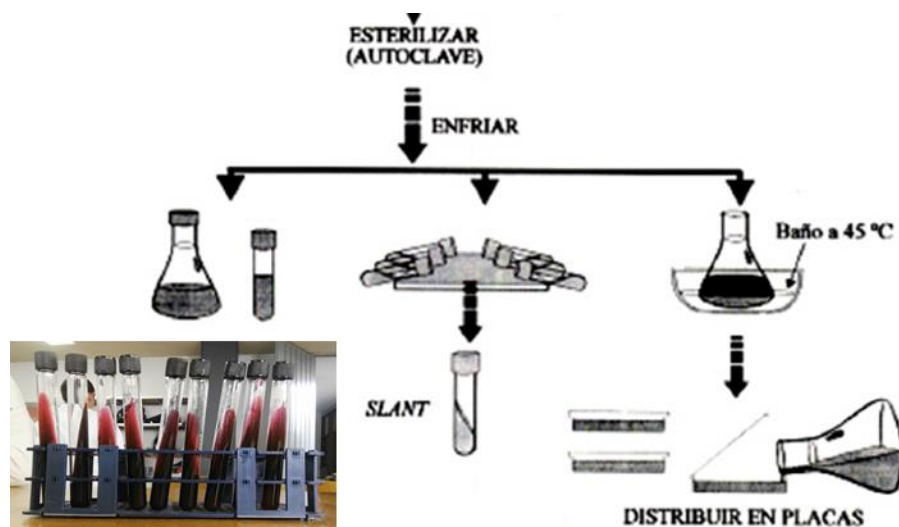


Figura 7. Finalizada la esterilización en al autoclave los medios líquidos se dejan enfriar a temperatura ambiente. Los medios sólidos contenidos en tubo deben inclinarse para que al solidificarse adopten la forma de agar inclinado, si tal es su finalidad.



REPORTE

Resultados

Elabora una tabla con los resultados:

CUESTIONARIO

1.- Describe ¿Cómo preparó todos y cada uno de los medios de cultivo?



2.- ¿Qué diferencia hay entre un cultivo y un medio de cultivo?

3.- Contesta correctamente

a. ¿Qué es el agar?

b. ¿A qué temperatura solidifica?

c. ¿Cuál es la función del agar en los medios de cultivo?

4.- ¿Qué sucede si el medio está muy frío y se desea vaciar en caja de Petri o en tubo de ensaye?

5.- ¿Por qué no se utiliza la gelatina como solidificante o coagulante para los medios sólidos?



6.- ¿Por qué es tan importante que el agua utilizada en la preparación de medios de cultivo sea destilada?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No 3

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO BACTERIANO

INTRODUCCIÓN

Una técnica muy común en el laboratorio de microbiología es la transferencia de microorganismos de un ambiente a otro con el propósito de cultivarlos. Es necesario tomar las debidas precauciones para evitar la contaminación de los cultivos.

Para el estudio e identificación de microorganismos éstos deben aislarse o separarse a partir de un cultivo mixto o de poblaciones que se encuentran en la naturaleza. Existen varias técnicas para el aislamiento de microorganismos y la obtención de cultivos puros, dentro de las más utilizadas se encuentran:

- a) Siembra por estrías en caja de Petri o tubo de ensaye.
- b) Vaciado en placa donde se obtienen colonias tanto en la superficie como en partes profundas del medio inoculado.
- c) Cultivo por dilución y agitación.
- d) Aislamiento de bacterias con una varilla angular de vidrio.
- e) Aislamiento de microorganismos extraídos con un aplicador de algodón.
- f) Siembra por picadura.

Después de que una población de microorganismos ha estado creciendo por cierto tiempo en el mismo tubo de ensaye o caja de Petri, debe ser transferido a un medio de cultivo nuevo para que pueda continuar su crecimiento y supervivencia.

OBJETIVO

Aprender las técnicas fundamentales empleadas para la transferencia y aislamiento de microorganismos.

MATERIALES

- Tubos de ensaye con caldo nutritivo
- Tubos de ensaye con agar nutritivo (superficie inclinada)
- Cajas de Petri con agar EMB
- Tubos de ensaye con medio SIM (superficie horizontal)
- Cajas de Petri con agar nutritivo
- Tubos de ensaye con S-110



- Asa y aguja de inocular
- Mechero
- Algodón
- Masking tape
- Kleen pack
- Muestra mixta

Cultivos:

- Bacillus subtilis*
- Escherichia coli*
- Staphylococcus aureus*
- Pseudomonas aeruginosa*
- Klebsiella sp.*

METODOLOGÍA

Técnica aséptica:

- 1.- Limpiar perfectamente la mesa de trabajo con jabón, secarla, aplicar una sustancia desinfectante. Ej. cloro al 1%.
- 2.- Lavarse las manos con jabón y después frotárselas con un algodón con alcohol al 70%, lejos del fuego.
- 3.- Colocar los tubos y demás material en una posición adecuada en la que se puedan alcanzar sin dificultad y sin peligro de quemarse.
- 4.- Trabajar siempre junto al mechero, ya que este proporciona una zona de esterilidad de aproximadamente 20 cm. de radio.
- 5.- Antes de realizar cualquier siembra, esterilizar el asa o aguja a fuego directo hasta el rojo vivo de la base a la punta y enfriar cerca del mechero.
- 6.- Para tomar el inóculo de siembra debe tocar con el asa una colonia seleccionada o asada si es líquido. Inocular y volver esterilizar.
- 7.- Durante la siembra, deben permanecer cerradas las puertas y ventanas y no se debe hablar o generar corrientes de aire.



Técnicas de sembrado.

1.- Inoculación de medios líquidos:

- a) Etiquetar el tubo que será inoculado (medio de cultivo empleado, microorganismo inoculado, número de equipo, sección y fecha).
- b) Tomar con una mano el tubo que contenga el cultivo y otro con caldo nutritivo estéril.
- c) Con la otra mano, tomar el asa y esterilizarla hasta el rojo vivo de base a punta dejar enfriar. Quitar y sostener los tapones de los tubos con los dedos meñique y anular libres de la mano que sujeta el asa, tener cuidado de no acercarlo demasiado al mechero.
- d) Flamear los bordes de ambos tubos, introducir el asa al cultivo, si es líquido tomar una asada y si el medio es sólido tocar una colonia tomando una pequeña muestra sin rasgar el medio.
- e) Introducir el asa con el inóculo dentro del tubo con el caldo y agitar el asa en círculos.
- f) Retirar el asa, flamear nuevamente los bordes de los tubos y colocar los tapones.
- g) Esterilizar el asa de la base a la punta.
- h) Incubar

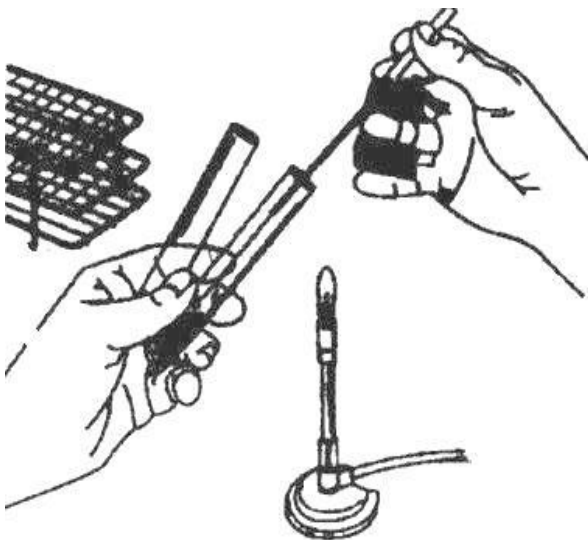


Figura 8. Método correcto de la inoculación con el asa en medio líquido.



Figura 9. Para la inoculación de un medio líquido a partir de un cultivo en medio sólido se utiliza un asa de siembra.



2.-Inoculación en medio inclinado

- a) Etiquetar el tubo que será inoculado (medio de cultivo empleado, microorganismo inoculado, número de equipo, sección y fecha).
- b) Tomar un tubo que contenga el cultivo y otro con el medio inclinado.
- c) Sujetar los tubos, remover los tapones y realizar los pasos asépticos como se explicó anteriormente.
- d) Esterilizar el asa de la base a la punta, dejar enfriar y tomar un inóculo del medio de cultivo.
- e) Introducir el asa hasta el fondo del tubo y deslizarla a manera de estrías sobre la superficie del medio hasta el extremo externo, sin repetir la operación.
- f) Flamear los bordes de los tubos y taparlos.
- g) Esterilizar el asa como se indicó anteriormente.
- h) Incubar.

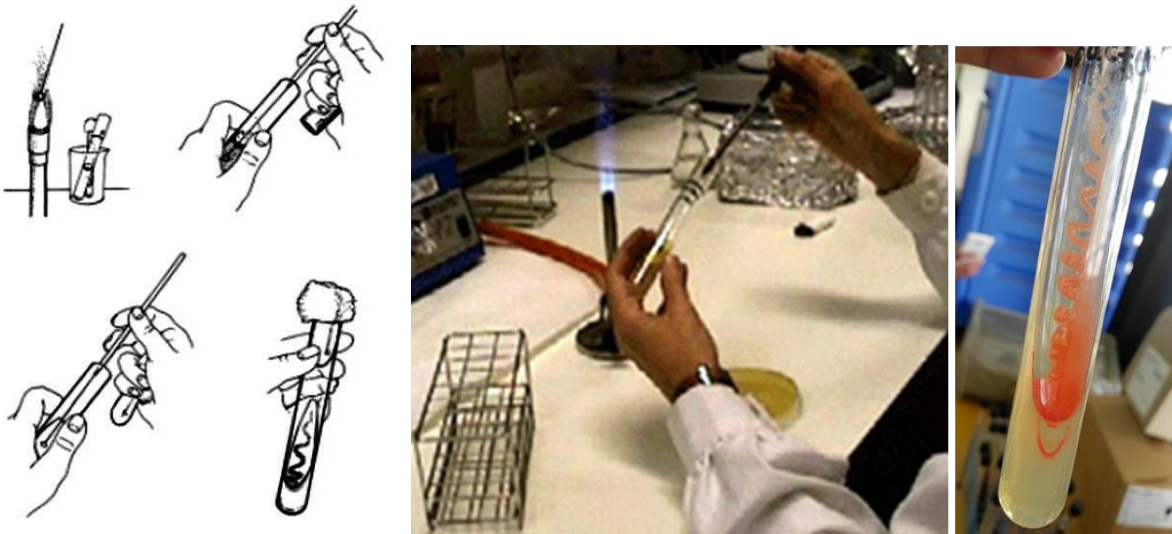


Figura 10 y 10a. Siembra en medio sólido inclinado



3.- Cultivo por picadura:

- a) Etiquetar el tubo que será inoculado (medio de cultivo empleado, microorganismo inoculado, número de equipo, sección y fecha).
- b) Tomar el tubo que contenga el cultivo y otro con medio de cultivo SIM.
- c) Realizar los pasos de flameado y remoción de tapones.
- d) Esterilizar la aguja de la base a la punta, enfriar y tomar una muestra de cultivo.
- e) Introducir la aguja de forma vertical en la parte central del medio sin llegar al fondo del tubo, sacarla por el mismo trayecto de la entrada sin repetir la operación.
- f) Flamear los bordes de los tubos y taparlos.
- g) Esterilizar la aguja como lo realizó anteriormente.
- h) Incubar.



Figura 11. Esquema de la siembra por picadura.



4.- Siembra por estrías en caja de Petri

Aislamiento primario de bacterias:

Todo el proceso se realizará en zona estéril, junto al mechero y abriendo la caja sólo que sea necesario. Los pasos son los siguientes:

- a) Etiquetar con marcador indeleble la caja (medio de cultivo utilizado, muestra empleada, No. de equipo, sección y fecha)
- b) Esterilizar el asa de siembra como se ha indicado y tomar una asada de la muestra mixta.
- c) Tomar la caja de Petri, reposarla sobre la palma de la mano, abrir la tapa con el pulgar y el dedo medio.
- d) Colocar el inóculo en el borde del agar y hacer una estría inicial sin despegar el asa, presionando, pero sin perforar el agar, hasta cubrir aproximadamente una cuarta parte de la caja como se indica en la figura 12.
- e) Bajar la tapa de la caja y esterilizar el asa.
- f) Girar la caja de Petri un cuarto de vuelta, levantar la tapa, enfriar el asa. NO enfriar el asa en la superficie de agar.
- g) Tocar una vez más la superficie de un extremo de la estría recién hecha con el asa y hacer un segundo grupo de estrías. Tener cuidado de no cruzar ninguna de las estrías originales.
- h) Tapar la caja y repetir los paso e, f y g.
- i) Incubar la caja de manera invertida.

Si se trata de un cultivo puro, se puede sembrar por estrías en un tubo de ensaye con superficie inclinada o bien en una caja de Petri realizando únicamente una estría en toda la superficie.

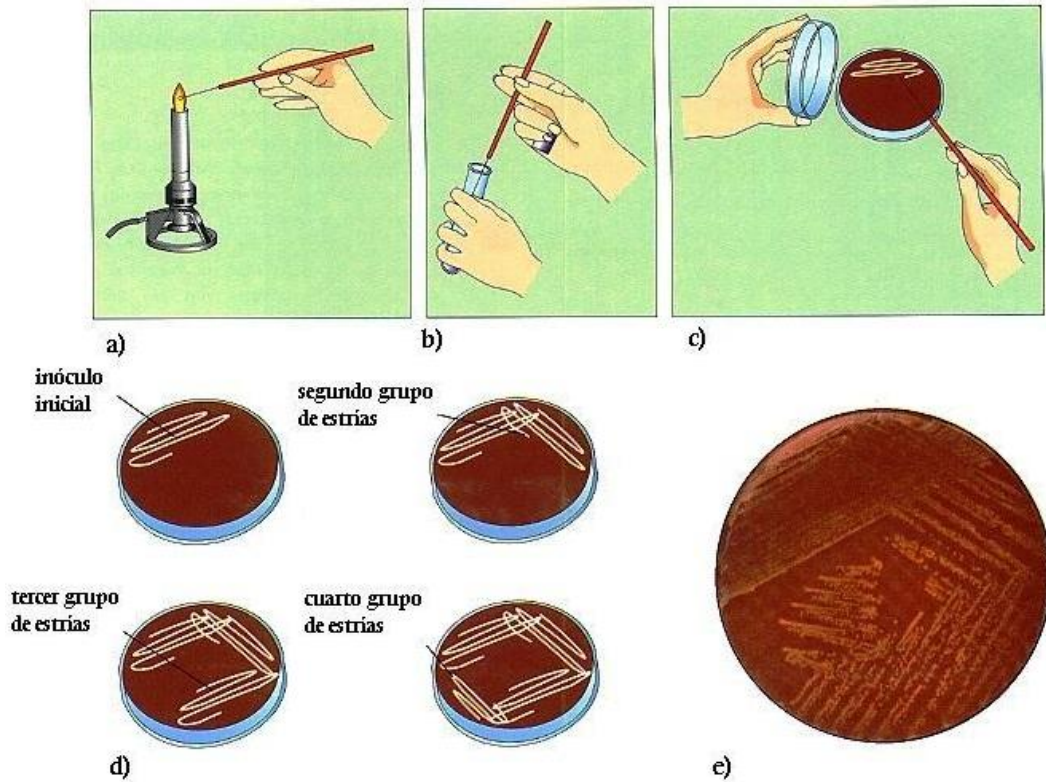


Figura 12. Método de aislamiento por siembra por estría en placa. Para obtener un cultivo axénico: (a) esterilizar un asa de siembra por flameado en la llama de un mechero, (b) introducirla en la suspensión bacteriana para recoger una muestra, (c) sembrar haciendo estrias sobre la superficie de un medio sólido en una placa Petri, y (d) volver a esterilizar el asa, tocar en la zona de la placa ya sembrada y hacer un segundo grupo de estrias en una región nueva de la placa. Repetir el proceso una tercera y una cuarta vez, hasta conseguir que los grupos de células se diluyan y se separen células aisladas. (e) Después de la incubación, se desarrollan colonias aisladas. Para estar seguro de que el cultivo es puro, repetir el proceso entero; para ello tomar una colonia aislada y sembrar por estrias una segunda placa.

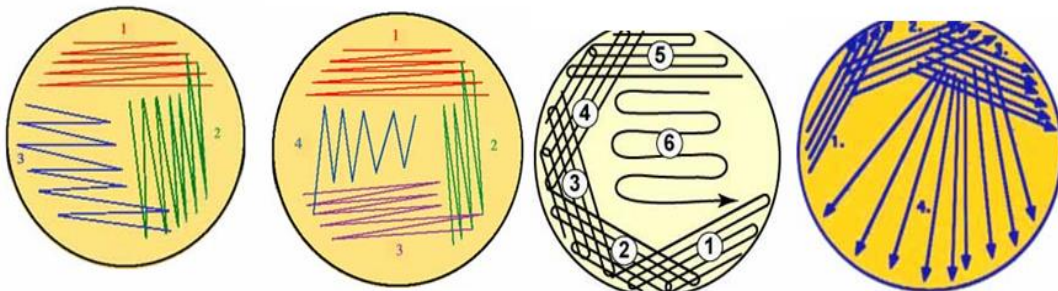
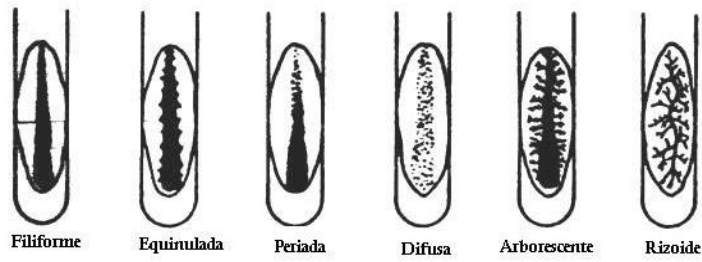


Figura 13. Algunos de los diseños que se pueden dibujar sobre el agar al inocular una caja de Petri.

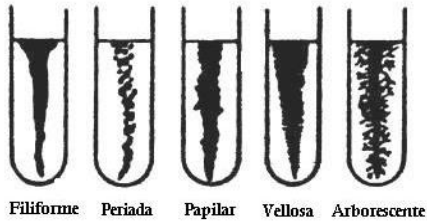


ESTRÍA EN AGAR- FORMA DE CRECIMIENTO

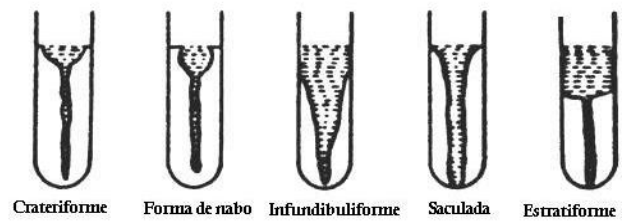


PICADURA EN GELATINA

LÍNEA DE PICADURA



LICUEFACCIÓN



CALDO DE NUTRIENTES - SUPERFICIE DE CRECIMIENTO



Figura 14. Características de los cultivos de bacterias



5.- Aislamiento de microorganismos extraídos con un aplicador de algodón

- a) Introducir el aplicador de algodón a un cultivo mixto.
- b) Trazar con el algodón unas líneas inoculando una pequeña zona en el borde de una caja de Petri con agar nutritivo.
- c) Cubrir la caja, sumergir el aplicador en solución desinfectante de cloro 1%, para posteriormente esterilizarlo en autoclave.
- d) Esterilizar el asa como lo has realizado y pasarla al sector inoculado con el algodón, realizando estrías por cuadrantes.
- e) Esterilizar el asa, invertir la caja e incubar.

REPORTE

Resultados

1. Completar el siguiente cuadro de los resultados de los microorganismos sembrados en medio líquido:

| Característica | Medio de cultivo: | | |
|----------------|-------------------|----------------|----------------|
| | microorganismo | microorganismo | microorganismo |
| Película | | | |
| Turbidez | | | |
| Sedimento | | | |
| Pigmento | | | |
| Color | | | |



2. Completar el siguiente cuadro de los resultados de los microorganismos sembrados en medio inclinado:

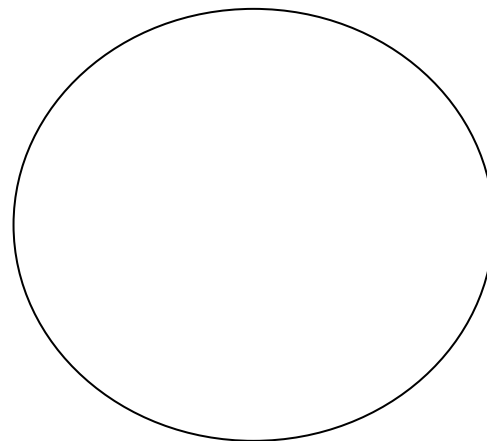
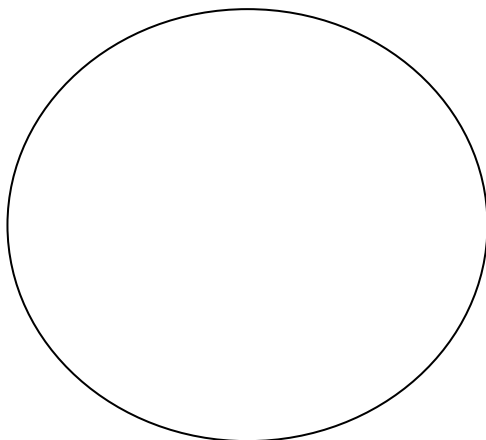
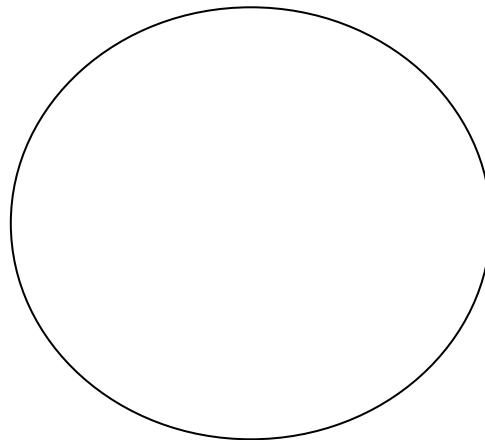
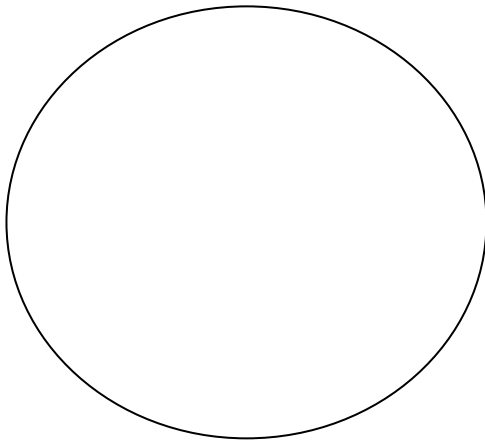
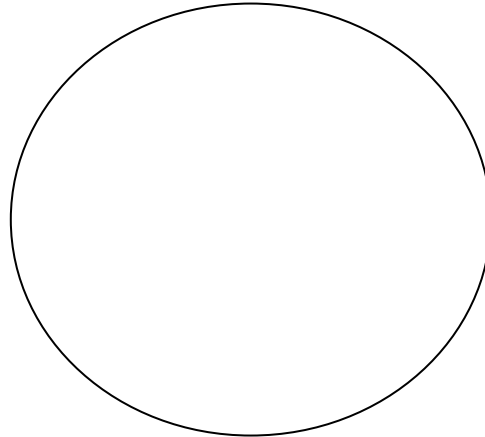
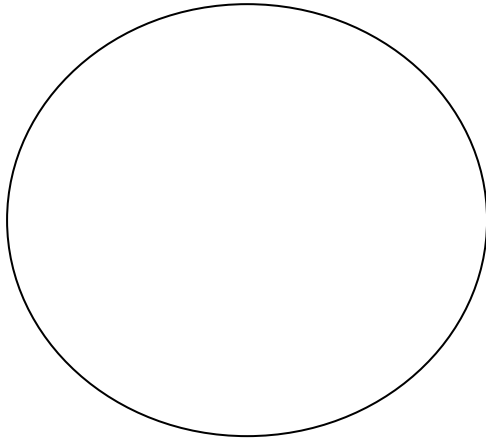
| Características | Medio | Medio |
|----------------------|----------------|----------------|
| | microorganismo | microorganismo |
| Forma de crecimiento | | |
| Pigmento | | |
| Consistencia | | |
| Color | | |

3. Completar el siguiente cuadro de los resultados de los microorganismos sembrados en el medio SIM

| Características | Cultivo | Cultivo |
|----------------------|---------|---------|
| Forma de crecimiento | | |
| Pigmento | | |
| Movilidad | | |
| Color | | |



4. Realizar esquemas de las estrías formadas en las cajas de Petri.





CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué es una cepa en bacteriología?

- 2.- ¿Qué es un cultivo mixto? menciona 3 ejemplos.

- 3.- ¿Por qué los cultivos en caja de Petri deben de manejarse de manera invertida?

- 4.- ¿Cómo se puede evitar la introducción y desarrollo de microorganismos contaminantes en un medio de cultivo?

- 5.- ¿Cuándo es recomendable utilizar el método de dilución en un cultivo?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 4

MORFOLOGÍA BACTERIANA Y COLONIAL

INTRODUCCIÓN

Las células bacterianas pueden presentar diversas formas, pero las más comunes son los bastones llamados **bacilos**, las esferas llamadas **cocos** y en forma de espiral o sacacorchos llamadas **espirilos**, **espiroquetas**, en forma de coma llamados **vibriones**.

Las formas más comunes son los bacilos, cuyo tamaño puede variar de tal manera que algunos son tan cortos que se confunden con los cocos; sus extremos pueden ser redondeados o rectos. Algunos al dividirse quedan alineados formando cadenas largas.

Las formas esféricas se presentan con frecuencia en agrupaciones coloniales de distintas maneras: pueden formar cadenas, recibiendo entonces el nombre de **estreptococos**; otros forman racimos irregulares, éstos son los llamados **estafilococos**; o se pueden agrupar en paquetes de formas muy regulares como las **sarcinas**. En ocasiones se ordenan en pares y reciben el nombre de **diplococos**.

Las bacterias en forma de espiral pueden ser cortos o largos, cuando son cortos pueden tener solo una vuelta por lo que parecen bacilos curvos y en este caso se conocen como vibriones, mientras que los espirilos presentan varias vueltas helicoidales, por lo que son más largos.

Las agrupaciones se forman cuando la bacteria se divide dando origen a muchas otras que cuando se desarrollan en un medio de cultivo aparecen en masas relativamente grandes que se aprecian a simple vista. El término **colonia** se aplica a cada una de las masas de crecimiento que se desarrollan sobre el medio sólido y se puede inferir que se trata de un cultivo puro al suponerse que se formó a partir de una sola célula bacteriana.

Las colonias presentan características propias de cada especie (forma, color, tamaño, elevación, tipo de bordes, etc.), por lo que pueden ser de utilidad en la identificación; por esta razón es importante en un estudio bacteriológico realizar un reconocimiento de la morfología colonial.



OBJETIVOS

1. Reconocer las diferentes características que presentan las colonias bacterianas.
2. Identificar las formas y tipos de agrupaciones que se pueden presentar en las bacterias.

MATERIALES

- Microscopio compuesto
- Asa microbiológica
- Portaobjetos
- Regla
- Marcador indeleble
- Cultivos de bacterias en caja de Petri

METODOLOGÍA

a) Estudio de la morfología colonial.

1) Tomar un cultivo en caja de Petri y seleccione para su estudio algunas colonias que se encuentren aisladas, procurando seleccionar una de cada tipo de los que hayan desarrollado.

2) Numerar cada una de las colonias seleccionadas para que pueda identificarlas (marcar los números con marcador permanente por fuera de la caja de Petri).

3) Tomar nota del color que presenta cada tipo seleccionado.

4) Anotar también el tamaño aproximado de las colonias, haciendo uso de una regla, sin destapar la caja de Petri o tubo de cultivo.

5) Analizar las características de forma, borde, superficie, consistencia y tipo de elevación que presentan las colonias.

6) Hacer esquemas de cada tipo de colonia.



b) Reconocimiento de las diferentes formas bacterianas.

1) Siguiendo siempre la técnica aséptica, prepare un frotis de cada una de las colonias seleccionadas para el ejercicio anterior (la técnica para la preparación del frotis se describe en la práctica de tinciones)

2) Aplique en cada frotis una técnica de tinción diferente.

3) Observe al microscopio usando el objetivo de inmersión e identifique la forma de las células bacterianas en cada una de las muestras.

4) Identifique el tipo de agrupación que presentan las bacterias.















| Forma | Borde | Elevación | Superficie |
|---|---|--|------------------------|
| Puntiforme  | Entero  | Plana  | Lisa o rugosa |
| Circular  | Ondulado  | Elevada  | Mate o brillante |
| Rizoide  | Lobulado  | Convexa  | Seca o cremosa |
| Irregular  | | Crateriforme  | Invasiva o superficial |
| Filamentosa  | Filamentoso  | Acuminada  | |

Figura 15. Aspectos más comunes de las diversas colonias microbianas aisladas sobre medio sólido.



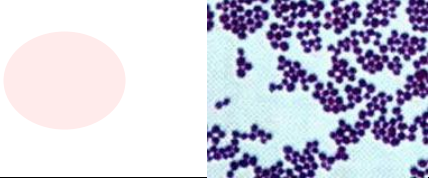
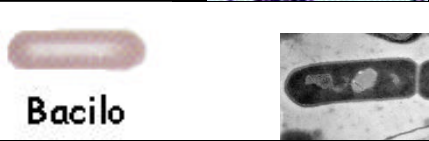




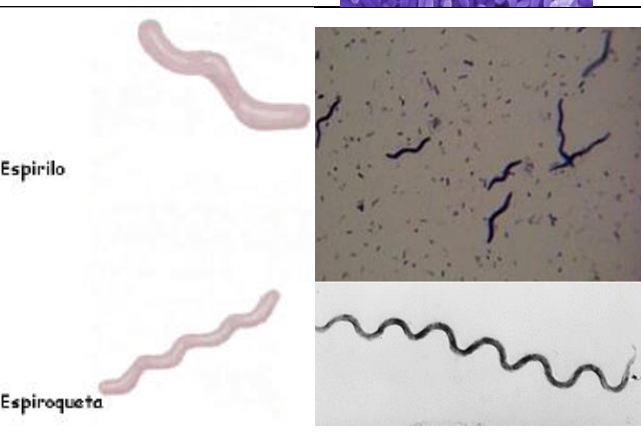
| | |
|--|--|
| <p>Coco. Bacterias en forma redonda, esferoides.</p> |  |
| <p>Bacilos: Bacterias de forma cilíndrica. Los bacilos pueden presentarse aislados o agrupados.</p> |  |
| <p>Cocobacilos: Ciertas especies se presentan como bacilos pequeños, redondos difíciles de distinguir de los cocos.</p> |  |
| <p>Diplobacilos: Pares de bacilos.</p> |  |
| <p>Estreptobacilos: Bacilos agrupados en cadenas.</p> |  |
| <p>Vibriones: Bacterias curvas (en forma de coma).</p> |  |
| <p>Bacterias en forma de espiral: Muchas bacterias poseen una forma semejante a bacilos largos retorcidos para formar espirales o hélices. Dependiendo de las especies, presentan diferencias significativas en el número y rigidez de las espiras y en la longitud. A estas bacterias se los denomina espirilos si son rígidas y espiroquetas cuando son flexibles.</p> |  |

Figura 16. Diferentes formas de bacterias. A la izquierda se presenta un dibujo y a la derecha el ejemplo de una especie bacteriana vista al microscopio.



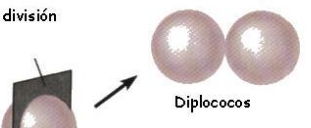
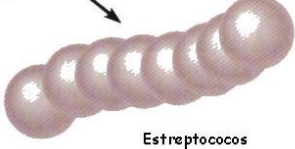
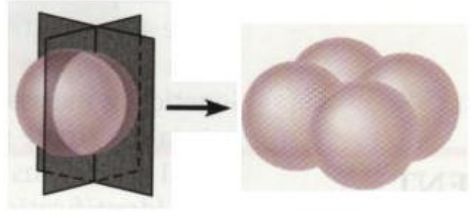
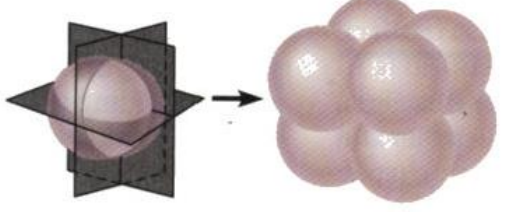

| | |
|--|---|
| <p>Diplococos: Pares de células</p> | <p>Plano de división</p>  <p>Diplococos</p> |
| <p>Estreptococos: Cadenas de cuatro o más células.</p> |  <p>Estreptococos</p> |
| <p>Tétradas: Son agrupaciones de cuatro cocos en una disposición cuadrada. Se dividen en dos direcciones perpendiculares.</p> |  <p>Tétradas</p> |
| <p>Sarcinas: Paquetes cúbicos de ocho células. Resultan de la división en tres direcciones perpendiculares.</p> |  <p>Sarcinas</p> |
| <p>Estafilococos: Se agrupan en forma de racimos, no siguen un patrón regular de orientación en divisiones sucesivas.</p> |  <p>Estafilococos</p> |

Figura 17. Los tipos de agrupación que pueden presentar las bacterias de forma esférica (cocos).



REPORTE

Resultados

1. Completa el siguiente cuadro de morfología colonial.

Morfología colonial

| <i>Colonia o microorganismo</i> | <i>Tamaño</i> | <i>Color</i> | <i>Forma</i> | <i>Bordes</i> | <i>Elevación</i> | <i>Superficie</i> | <i>Consistencia</i> |
|---------------------------------|---------------|--------------|--------------|---------------|------------------|-------------------|---------------------|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

Morfología bacteriana

| <i>Colonia o microorganismo</i> | <i>Forma bacteriana</i> | <i>Agrupación</i> | <i>Reacción al Gram</i> |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------|-------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |



2. Hacer esquemas de cada tipo de colonia.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuántos tipos de colonias encontró en sus cultivos?
2. ¿Qué indica la respuesta anterior?
3. ¿Qué tipo de agrupaciones encontró?
4. ¿Qué formas bacterianas no se encontraron en sus muestras?
5. Investigue a qué se debe que las bacterias formen las agrupaciones de forma típica.



6. ¿Se observó el núcleo de las bacterias? ¿Por qué?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 5

PREPARACIÓN DE FROTIS Y TINCIONES

INTRODUCCIÓN

Dado que por lo general las bacterias no tienen pigmentos y son incoloras en estado natural en su forma real. Algunos investigadores como Robert Koch, Paul Erlich y otros vencieron esta dificultad usando métodos de fijación (preparación de frotis) y tinción de bacterias ya que es necesario teñirlas para poder observar su morfología así como también poner de manifiesto algunas características de su estructura.

Los métodos de tinción pueden ser simples o diferenciales.

- A. Tinciones Simples: son aquellas en las que solo se utiliza un colorante ya que muchas bacterias tienen material ácido (RNA o DNA) distribuido en su célula, por lo que se colorea intensamente con colorantes básicos estos son colorantes nucleares ejemplo: fucsina básica, cristal violeta, azul de metileno entre otras.
- B. Las tinciones diferenciales son aquellas en las que se utilizan dos o más colorantes que ponen de manifiesto alguna(s) estructura(s) o un tipo de células se tiñen de un color y el resto de otro.

El método de tinción más utilizado es el de la tinción del Gram, ya que es la coloración más importante para bacterias fue ideada por Hans Cristian Gram en 1884, lo que permitió distinguir entre varias especies de bacterias que pueden presentar morfología colonial similar.

Cuando las bacterias retienen el complejo cristal violeta-yodo, tiñéndose de violeta, son bacterias gram positivas, las bacterias que se tiñen de rojo por la safranina son gram negativas.

Las células bacterianas Gram (+) se les adhiere el cristal violeta, porque hay disminución de la permeabilidad de la pared celular causada por el efecto deshidratante del alcohol, mientras que las Gram (-) el complejo sale por el aumento de la permeabilidad causada por la solubilidad de los lípidos de la pared celular al alcohol.

Existen también bacterias Gram variables (*Neisseria spp*) y bacterias Gram no reactivas (*Mycobacterium spp*) otros ejemplos de tinciones diferenciales son: la tinción ácido-alcohol-resistente (utilizada para diferenciar bacterias del género *Mycobacterium* de otros tipos) y la tinción de flagelos o de endósporas.



OBJETIVOS

1. Aprender a realizar frotis y preparaciones fijas de bacterias.
2. Conocer los métodos de tinciones, practicar la técnica de tinción simple usada en bacteriología.
3. Conocer y distinguir que es tinción diferencial así como aplicar la técnica de Tinción de Gram.

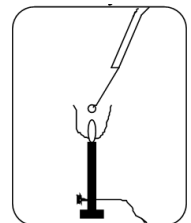
MATERIALES

- Cultivos de: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*
- Azul de metileno
- Cristal violeta 0.1% en solución acuosa
- Yodo lugol
- Alcohol-cetona (1:1)
- Safranina
- Aplicador estéril (sí el instructor lo cree necesario).
- Agua destilada
- Aceite de inmersión
- Papel seda
- Asa bacteriológica
- Marcador permanente
- Alcohol y algodón para limpiar su mesa
- Goteros y micro pipeta
- Mecheros
- Portaobjetos
- Microscopio compuesto

METODOLOGÍA

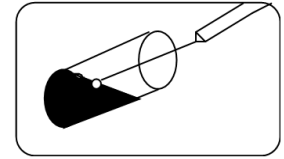
A. Preparación de Frotis y Fijado

1. Limpiar con alcohol el portaobjetos donde se realizará el frotis, dejarlo secar, una vez seco pasarlo por el mechero 2 o 3 veces.
2. Cuando este frío, marcar la cara donde se hará el frotis.
3. Calentar el asa de inoculación hasta que esté al rojo vivo el metal.

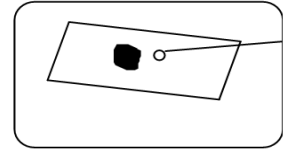




4.- Tomar el cultivo del que se hará el frotis y flamear la boca de este. Tomar la porción de la muestra que se va a examinar por medio de un asa.



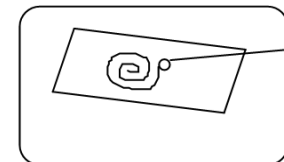
5.- Colocar la muestra sobre un portaobjetos limpio y sin grasa, debidamente marcado



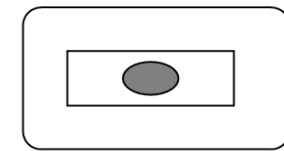
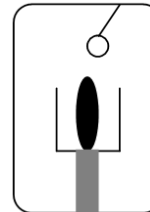
***Si la muestra se encuentra en un medio líquido, basta con colocar una pequeña gota con el asa estéril sobre el portaobjetos.

***Si la muestra está en un medio sólido, colocar una gotita de solución salina o agua destilada estéril sobre el portaobjetos y con el asa estéril se transfiere una pequeña muestra de bacterias en la gotita.

6.- Trazar con la muestra una espiral del centro a la periferia. Extienda con el asa la gotita para obtener un frotis **delgado y uniforme**. Secar al aire.



7.- Calentar nuevamente el asa para esterilizarla.

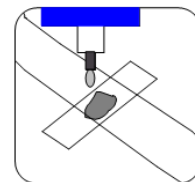


8.- Dejar secar el frotis cerca del mechero encendido durante 10 min o hasta que seque completamente.

9.- Fijar el frotis con calor suave sobre la flama del mechero, pasándolo tres veces a través de la llama con la muestra hacia arriba, de tal forma que pueda tolerarlo sobre el dorso de la mano.

B. Tinción Simple

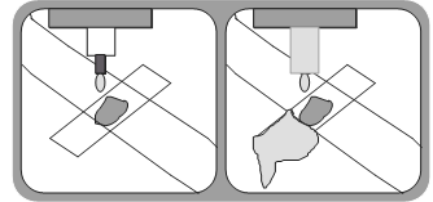
1. Cubra el frotis (*B. subtilis*) con la solución de azul de metileno durante 2 minutos.



2. Lave el portaobjetos, con una corriente suave de agua, de manera que el agua no incida directamente sobre la preparación hasta que ya no escurra colorante.



3. Deje secar el frotis al aire.
4. Enfocar y localizar la zona teñida con el objetivo de 10X, observar las bacterias al microscopio con el objetivo de 100X.



C. Hacer frotis de cada uno de los cultivos.

1. Dejar secar a temperatura ambiente.
2. Fijar al calor.
3. Agregar cristal violeta durante 1 minuto.
4. Lavar con agua y secar.
5. Observar a inmersión.

D. Repetir el inciso C, en lugar de cristal violeta usar safranina.

E. Opcional.

1. Con un aplicador tomar un exudado de su boca de preferencia por el borde gingival.
2. Hacer un frotis.
3. Teñir con Tinción Gram
4. Observar a inmersión e identificar cocos, bacilos, etc.

F. Tinción de Gram.

Consta de cuatro reactivos diferentes: el cristal violeta es el **primer** colorante o colorante primario que da color a todos los microorganismos del frotis. Enseguida se utiliza una solución del **yodo** (lugol), la que actúa como mordente (que aumenta o refuerza la unión, entre un colorante y un sustrato), el **tercer** reactivo es un decolorante (alcohol-cetona 1:1) que disuelve y arrastra el colorante primario, los organismos que resisten la decoloración y conservan una tonalidad azul son Gram (+), el **cuarto** reactivo es el colorante de contraste la safranina que se aplica como contra tinción ya que los organismos se destiñeron con el decolorante, ahora toman el color rojo de la safranina denominándose Gram (-).



PASOS A SEGUIR EN LA TÉCNICA DE GRAM

- 1.- Preparar los frotis como en la técnica de tinciones simples. y preparación de frotis y fijado.
- 2.- Preparar los frotis con cultivos de *S. aureus* y *E. coli*.
- 3.- Cubrir los frotis con cristal violeta durante un minuto.
- 4.- Lavar los portaobjetos con una corriente suave de agua.
- 5.- Cubrir los frotis con yodo – lugol durante 1 minuto.
- 6.- Lavar como se indicó en el paso 4.
- 7.- Decolorar con alcohol-cetona hasta que no escurra líquido azul.
- 8.- Lavar inmediatamente como se hizo en el paso 4.
- 9.- Cubrir el frotis con safranina durante 1 minuto.
- 10.- Lavar como en el paso 4.
- 11.- Observar al microscopio a inmersión. OB (100 X). Ver figura Tinción Gram.



Figura 18. Al finalizar el proceso de Tinción de Gram, las bacterias gram-positivas se tiñen de color púrpura-violeta y las bacterias gram-negativas se tiñen de color rojizo-rosado.









| Gram positivos (De violeta a azul claro) | Gram negativos (De rosa a rojo intenso) |
|--|--|
| Forma: cocos y bacilos (finos, gruesos, ramificados) Agrupaciones: racimos, cadenas, tétradas | Forma: cocos, bacilos y vibrios. Agrupaciones: aislados, en parejas (diplos) |
| <p>Cocos Gram positivos en racimos</p>  <p><i>Staphylococcus sp.</i></p> | <p>Cocos Gram negativos en diplos (diplococos)</p>  <p><i>Neisseria sp. y Moraxella sp.</i></p> |
| <p>Cocos Gram positivos en cadenas</p>  <p><i>Streptococcus sp.</i></p> | <p>Bacilos Gram negativos finos</p>  <p><i>Enterobacteriaceae como E. coli</i></p> |
| <p>Cocos Gram positivos en tétradas</p>  <p><i>Micrococcus sp.</i></p> | <p>Bacilos Gram negativos cocobacilos</p>  <p><i>Haemophilus sp.</i></p> |

Figura 19. Interpretación de resultados a partir de la tinción de Gram.

REPORTE

Resultados

1. Realizar esquemas de cada frotis realizado y observado en el microscopio



2. Dibujar y completar la tabla de morfología bacteriana de la práctica anterior, donde indique cada uno de los microorganismos observados su forma, agrupación y reacción al Gram.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué es necesario fijar el frotis al calor?

2. Ejemplos de tinción simple o colorantes básicos

3. Explica:
 - a) Las diferencias en composición química por estructura de las paredes celulares gram positivas y gram negativas.



- b) ¿Qué tipo de bacterias toma el colorante primario y que tipo el de contraste?
4. ¿Podría sustituirse el colorante primario por otro colorante en la tinción de Gram? Explica.
5. ¿Qué inconveniente encontraría si agrega primero safranina en esta técnica?
6. Completa la siguiente tabla

| Gram positivas patógenas | | Gram negativas patógenas | |
|--------------------------|------------------------|--------------------------|------------------------|
| microorganismo | Enfermedades que causa | microorganismo | Enfermedades que causa |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 6

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES DE LOS MICROORGANISMOS

INTRODUCCIÓN

Uno de los aspectos más importantes de cualquier estudio de los seres vivos es la **NUTRICIÓN**. Tal aspecto aborda los diferentes tipos de alimentos que un organismo incluye en su dieta.

Al igual que todos los seres vivos los microorganismos requieren una fuente de **NITRÓGENO** utilizable, proveniente de alguna sustancia que contenga dicho Nitrógeno; como las Proteínas o los aminoácidos. Pero muchos otros no requieren formas tan complejas de este elemento, los compuestos de amonio; inclusive el Nitrógeno en su forma natural gaseosa de hecho puede constituir su única fuente de Nitrógeno, todas ellas para que la célula produzca sus proteínas celulares.

Otro compuesto nutritivo son los **CARBOHIDRATOS** que por lo general proporcionan energía inmediata o rápida. La fuente de energía varía entre los microorganismos; algunos pueden emplear la mayoría de los carbohidratos, mientras que otros únicamente algunos o ninguno.

Muchos microorganismos requieren fuentes de energía muy compleja molecularmente, pero otros poseen requerimientos muy sencillos.

Idealmente, los distintos medios de cultivo que se emplean en Microbiología deberían ser del tipo llamado sintético, por lo que la fórmula química estructural se conoce con exactitud.

Otras sustancias nutritivas son en general las Sales Minerales que proporcionan iones o elementos que intervienen en el metabolismo de la célula.

En el estudio de la nutrición microbiana, es práctica común preparar una “dieta” completa que incorpore todos los factores esenciales para el crecimiento excepto aquel que se quiera probar para determinar si el microorganismo es capaz de degradar o no.

Los microorganismos necesitan para su subsistencia que el sustrato los provea de Agua, Carbono, Nitrógeno, Fósforo, Azufre y sales de sodio o de potasio, y que toman por diferentes procesos de asimilación.



Las bacterias se pueden clasificar de acuerdo a los requerimientos nutricionales en: Autotrofas y Heterotrofas. Las primeras son aquellas que transforman sustancias inorgánicas en orgánicas y las últimas, toman los elementos necesarios para su nutrición de compuestos orgánicos.

OBJETIVO

El alumno inoculará microorganismos en medios con diferentes contenidos de requerimientos nutricionales y diferenciará su crecimiento en los mismos.

MATERIALES

- Cultivo de 24 hrs. de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cereviceae* y *Streptococcus feacalis* o *Staphylococcus aureus*
- 4 cajas de Petri con:
- Únicamente agar
- Agar y minerales
- Agar, minerales y fuente de Carbono orgánico (glucosa)
- Agar, minerales, glucosa y fuentes de Nitrógeno (peptona)
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Marcador permanente

METODOLOGÍA

- a) Dividir las 4 cajas de Petri en 4 partes cada una.
- b) Inocular las 3 cepas en cada parte dividida, una parte quedará sin inocular.
- c) Incubar a 35°C / 48 hrs.
- d) Anote sus resultados y haga los esquemas de lo que realizó.
- e) Escriba sus observaciones y conclusiones.

REPORTE

Resultados

- A) Realizar esquemas del crecimiento observado en cada caja.



- B) Elaborar una tabla donde indique cada uno de los microorganismos observados, su crecimiento y los diferentes requerimientos nutricionales que asimiló.

CUESTIONARIO

1. Defina lo que es un Nutriente.
2. Enumere 3 sustratos como fuente de Carbono.
3. Enumere 3 sustratos como fuente de Nitrógeno.
4. Explique ¿Por qué los microorganismos tienen diferentes requerimientos nutricionales?



5. Con base en los resultados obtenidos. Explica con qué nutrientes se obtuvo el mayor crecimiento bacteriano.

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 7

FERMENTACIÓN DE LACTOSA

INTRODUCCIÓN

La fermentación de la lactosa, también llamada fermentación láctica, es el proceso celular donde se utiliza glucosa para obtener energía teniendo como producto de desecho la formación de ácido láctico.

Se produce en muchas bacterias (bacterias lácticas), también en algunos protozoos y en el músculo esquelético humano. Es responsable de la producción de productos lácteos acidificados tales como yogurt, quesos, cuajada, crema ácida, entre otros. El ácido láctico tiene excelentes propiedades conservantes de los alimentos.

Las bacterias difieren en los carbohidratos que pueden utilizar y en los tipos y cantidades de ácidos mixtos producidos. Estas diferencias de actividades enzimáticas constituyen una de las características importantes por las cuales se reconocen las diferentes especies.

La fermentación bacteriana de la lactosa es más compleja que la de la glucosa, ya que la lactosa es un disacárido compuesto de glucosa y galactosa unido por un enlace glucosídico.

La capacidad de un microorganismo para fermentar un carbohidrato dado, depende de las enzimas que pueda expresar o producir el microorganismo. Los productos finales de la fermentación varían de un microorganismo a otro.

Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Ciertas bacterias (lactobacilos), al desarrollarse en la boca utilizan la lactosa (azúcar de leche) como fuente de energía. La lactosa, al fermentar, produce energía que es aprovechada por las bacterias y el ácido láctico es eliminado. La precipitación de las proteínas de la leche, ocurre por el descenso de pH debido a la presencia de ácido láctico. En ausencia de oxígeno, las células animales convierten el ácido pirúvico en ácido láctico y este puede llegar a ser tóxico para la célula. Cuando se acumula en las células musculares produce síntomas asociados con la fatiga muscular.



El ácido láctico se produce mediante la fermentación alcohólica y fermentación láctica. En condiciones anaerobias (ausencia de oxígeno), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y pasan a la forma NADH . Para que puedan tener lugar las reacciones de la glucólisis que producen energía es necesario restablecer el NAD^+ por otra reacción.

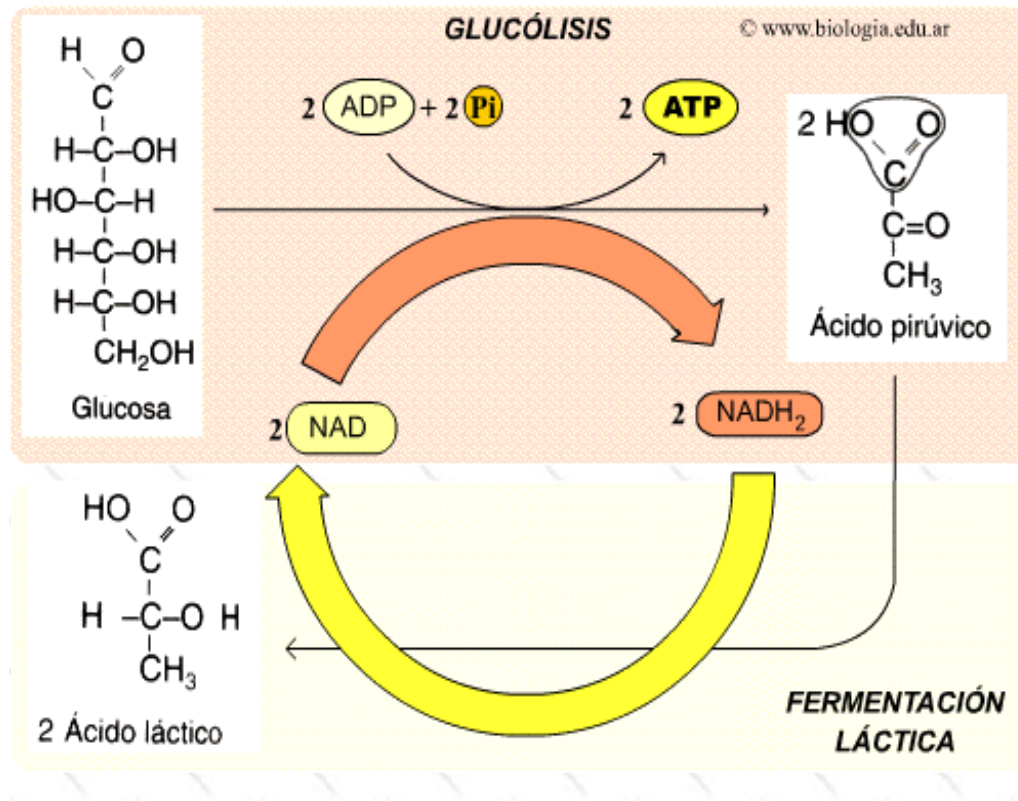


Figura 20. La Glucólisis, del griego *glycos*: azúcar y *lysis*: ruptura, es el primer paso de la respiración, es una secuencia compleja de reacciones que se realizan en el citosol de la célula y por el cual la molécula de glucosa se desdobra en dos moléculas de ácido pirúvico. Es el ciclo metabólico más difundido en la naturaleza, también se lo conoce como ciclo de Embden-Meyerhof.



OBJETIVO

Realizar una prueba presuntiva de fermentación de carbohidratos

MATERIALES

- Muestras problema de agua y alimentos
- Caldo lactosado
- Tubos de ensaye con agua estéril
- Tubos para campana Durham
- Algodón
- Asa de siembra
- Incubadora
- Termómetro
- Mechero
- Alcohol
- Pipetas estériles
- Pinzas estériles
- Papel aluminio estéril
- Balanza
- Marcador permanente

METODOLOGÍA

- Con el marcador permanente Etiquetar cada uno de los tubos que contiene caldo lactosado con los siguientes datos:

Tipo de muestra
Fecha
No. de equipo
Sección



Figura 21. Los datos deben marcarse perfectamente en cada tubo para evitar confusiones en los resultados.



- Con las muestras líquidas ejemplo fig. 23, medir 1 ml. y verterlo al tubo con caldo lactosado (fig. 24) mezclar perfectamente agitando el tubo, incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ durante 48 hrs.



Figura 23.-Muestras líquidas



Fig. 24.- Tubos con caldo lactosado inoculados

- Si la muestra es sólida, pesar un gramo del alimento y depositarlo en el tubo con agua estéril, agitar y tomar 1 ml. de esta muestra e incorporarla al tubo con el caldo lactosado. Incubar como se explicó en el paso anterior.



Figura 25.-Incubadora



Interpretación de resultados

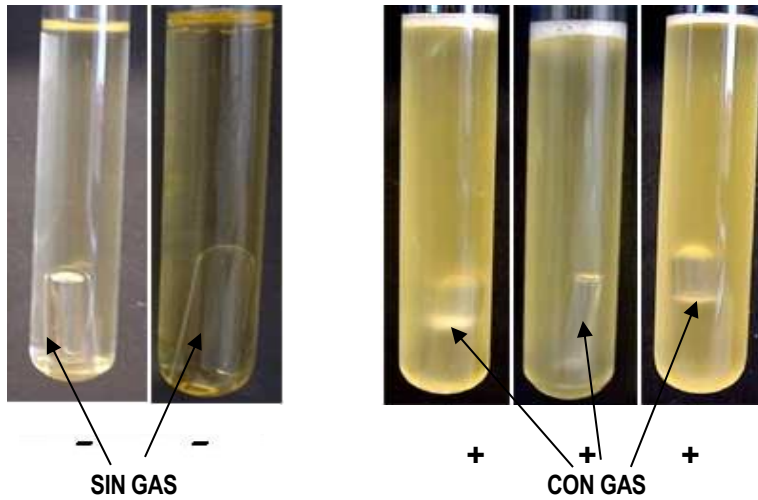


Figura 26. Tubos con campana Durham.

REPORTE

Resultados

A. Dibujar cada uno de los tubos e indicar si son positivos o negativos.



CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué compuestos químicos se forman en la fermentación de carbohidratos?

- 2.- ¿Cuál es la función de la campana Durham?

- 3.- ¿Qué significa la prueba presuntiva para la determinación de coliformes?

- 4.- Con base en la clasificación de medios de cultivo revisada en la práctica #2, ¿Qué tipo de medio es el caldo lactosado según sus componentes?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 8

DETERMINACIÓN DE COLIFORMES

INTRODUCCIÓN

Con el análisis bacteriológico del agua o de los alimentos se puede determinar parcialmente si son aptos o no para el consumo humano. Con este tipo de estudios es posible detectar a microorganismos que son muy numerosos en las aguas negras y en las heces fecales, son las bacterias coliformes fecales de la familia Enterobacteriaceae.

Cuando estos organismos se encuentran presentes en el agua o alimentos, nos indica que han sido contaminados con aguas negras o materia fecal. Puede ser que contengan bacterias que causen enfermedades gastrointestinales como la fiebre tifoidea o disentería.

OBJETIVO

Realizar una prueba confirmativa para coliformes.

MATERIALES:

- Tubos positivos de la práctica anterior
- Caldo bilis verde brillante
- Caldo EC
- Incubadora
- Baño María
- Termómetro
- Algodón
- Alcohol
- Asa bacteriológica
- Marcador permanente



METODOLOGÍA

- 1.- Separar los tubos positivos de la práctica anterior.
- 2.- Por cada tubo positivo, con el marcador permanente etiquetar un tubo con caldo EC y otro con caldo bilis verde brillante.
- 3.- **Determinación de Coliformes Totales:** Esterilizar el asa y tomar una asada de caldo lactosado e inocular el tubo con caldo bilis verde brillante, incubar a 36°C por 48 hrs.
- 4.- **Determinación de Coliformes Fecales:** Repetir el paso anterior pero ahora inoculando el tubo con caldo EC, incubar a 45°C en baño María durante 24 hrs.
- 5.- Realizar una tinción de Gram de las muestras positivas.

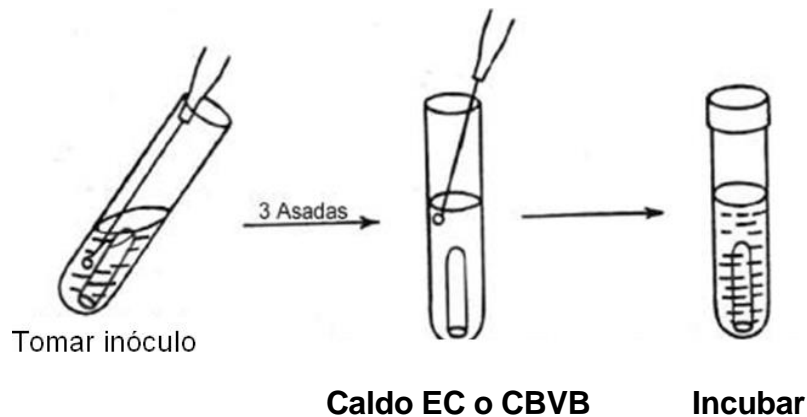


Figura 27. Forma correcta de inocular



Interpretación de resultados

La reacción es positiva cuando se produce fermentación de los carbohidratos del medio que provoca que este vire a amarillo y produzca gas que queda retenido en la campana Durham.



Con viraje

Sin viraje

Figura 28. El viraje de color del medio indica crecimiento de la bacteria inoculada con utilización de la lactosa como fuente de carbono produciendo ácido láctico que descende el pH y hace que el indicador verde brillante vire a amarillo.

Figura 29. El gas en la campana de Durham indica fermentación de la lactosa con formación de gas a esa temperatura de 37 °C.



sin gas

con gas



Figura 30. La determinación de coliformes se realiza mediante la utilización de medios de cultivo selectivos.

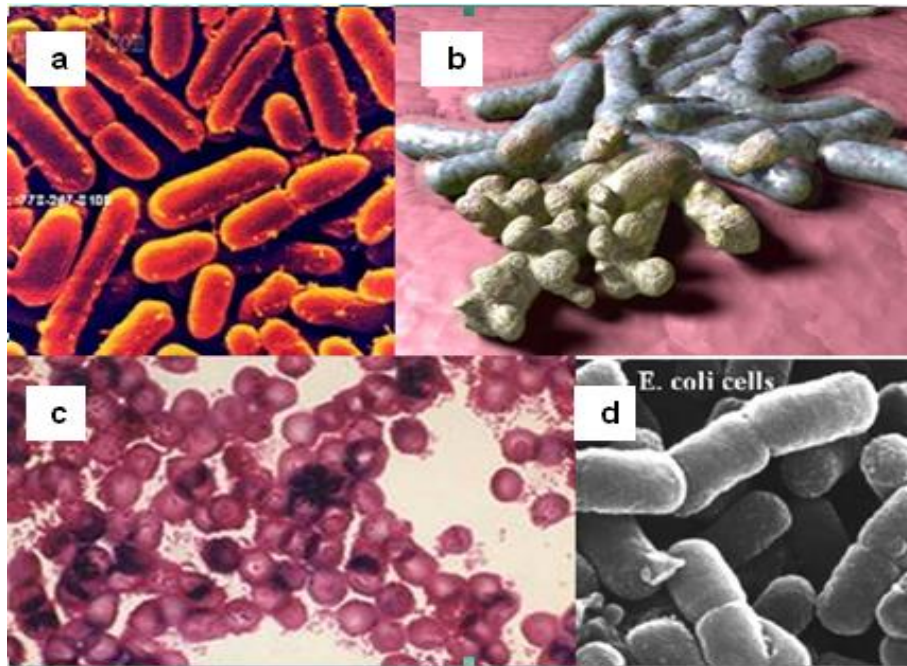


Figura 31. El grupo coliformes está formado por los siguientes géneros: a) *Enterobacter*, b) *Klebsiella*, c) *Citrobacter* y d) *Escherichia* (No todos los autores incluyen al género *Citrobacter* dentro de este grupo).



REPORTE

Resultados

A. Dibujar y reportar las muestras positivas como coliformes totales y/o fecales.

B. Indicar el sitio exacto donde fueron comprados los alimentos

CUESTIONARIO

1. ¿Qué características tienen las bacterias coliformes?



2. Menciona 3 géneros de bacterias coliformes indicando su importancia.

3. Completa el siguiente cuadro correctamente.

| Medio de cultivo | Componentes |
|-----------------------------|-------------|
| Caldo lactosado | |
| Caldo bilis verde brillante | |
| Caldo EC | |

4. Con base en la clasificación de medios de cultivo de la práctica #2, los medios utilizados en esta práctica, son diferenciales o selectivos, ¿por qué?

5.- Indica las diferencias entre coliformes totales y fecales.



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 9

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO AGAR LECHE Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS DEL ÁCIDO LÁCTICO.

INTRODUCCIÓN

Llamamos bacterias del ácido láctico a un grupo de bacterias Gram positivas, taxonómicamente relacionadas con el género *Bacillus*. No es por tanto sorprendente que sean capaces de producir endosporas bacterianas como estructuras de resistencia. Las bacterias del ácido láctico reciben este nombre por su capacidad de producir ácido láctico por fermentación de diversos azúcares.

Dentro de las bacterias del ácido láctico incluimos al género *Lactobacillus*, sobresaliendo las especies *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. johnsonii*. Otras bacterias como *Bifidobacterium breve* (actinobacteria) e incluso *Streptococcus salivarius* son consideradas también del ácido láctico.

Tanto los *Lactobacillus* como los *Bifidobacterium* son comunes en el tracto digestivo de mamíferos (incluido el hombre), donde mantiene relaciones de simbiosis con su hospedero y de antagonismo con bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium*, *S. enterica* y *Vibrio cholerae*.

Adicionalmente a su efecto contra enfermedades gastrointestinales *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son mejoradores de la digestión en humanos, utilizan fructooligosacáridos indigeribles por el hombre y son un factor contra inflamaciones del intestino y colon. Por lo anterior se les conoce en la literatura tanto científica como de divulgación como “probióticos”.

Las bacterias del ácido láctico son sencillas de cultivar, crecen rápidamente en leche que transforman en yogurt. Diversos productos lácteos de estas bacterias, son industrializados y comercializados con un alto valor agregado tanto por su sabor, como porque presuntamente son un vehículo para que estos organismos vivos se implanten en el intestino de quien los ingiere. Por otro lado, explotando la capacidad de estas bacterias para esporular, son utilizadas para formular medicamentos reconstitutivos de la microbiota intestinal.

Como se pudo notar en prácticas previas, un medio de cultivo líquido puede volverse sólido agregando agar bacteriológico. Basados en esto utilizaremos leche agregada con extracto de levadura (fuente de oligoelementos) y agar bacteriológico, como medio de cultivo para aislamiento de bacterias del ácido láctico.



OBJETIVO

El alumno conocerá y será capaz de aislar bacterias del ácido láctico empleando productos comerciales.

MATERIALES

- Cajas de Petri
- Varillas de vidrio en “L”
- Varillas de vidrio
- Hisopos de algodón
- Vaso de precipitados
- Matraces
- Pipetas de 5 ml
- Autoclave u olla de presión
- Mechero
- Balanza digital
- Microscopio
- Alcohol etílico 70%
- Leche ultra pasteurizada semidescremada
- Extracto de levadura
- Glucosa
- Agar bacteriológico
- Productos lácteos fermentados (diferentes en cada mesa de trabajo)
- Reactivos para tinción Gram

METODOLOGÍA

A. Preparación del medio de cultivo “Agar leche”

Vaciar 1 L de leche ultrapasteurizada en un vaso de precipitado.

Pesar en la balanza granataria 0.5 g de extracto de levadura, 3 g de glucosa y 16 g de agar bacteriológico.

Disolver lentamente el extracto de levadura, la glucosa y el agar bacteriológico en la leche agitando con una varilla de vidrio.

Calentar el medio de cultivo hasta alcanzar aproximadamente 85°C para disolver el agar (Fig. 32).



Vaciar el medio de cultivo en matraces, cuidando de no llenarlos a más de la mitad de su capacidad. Tapar los matraces con tapones de algodón o de aluminio (Fig. 33).

Esterilizar 15 min a 121 °C y 15 libras en autoclave u olla de presión.

Vaciar 30 ml aproximadamente del medio de cultivo en cajas de Petri estériles empleando la técnica aséptica.



Figura 32. Disolver el agar en medio de cultivo

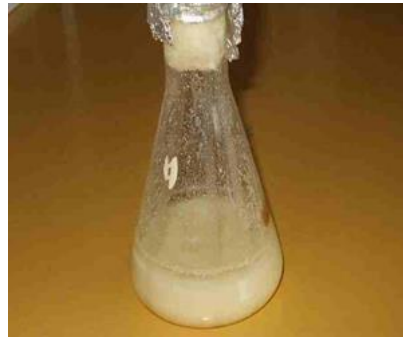


Figura 33. Vaciar y tapar

B. Aislamiento de bacterias del ácido láctico

Envolver y esterilizar las pipetas de vidrio por calor seco. Esterilizar los hisopos de algodón en autoclave u olla de presión.

Llenar con alcohol etílico una caja de Petri. Y sumergir en ella la varilla de vidrio en “L”, sacar la varilla y flamearla en el mechero.

Esperar un momento a que se enfríe.

Depositar 1 ml de producto lácteo fermentado comercial en cada una de las cajas Petri que contengan el medio de cultivo empleando la técnica aséptica.

Esparcir el producto lácteo fermentado en toda la caja de Petri utilizando la varilla de vidrio en “L” flameada y fría.

Alternativamente esparcir el producto lácteo fermentado utilizando el hisopo de algodón estéril.

Incubar a 37°C en anaerobiosis parcial y revisar las cajas a las 24 y 48 horas después. Y pasadas las 48 horas refrigere las cajas hasta la próxima práctica.



Realizar una tinción de gram y observar al microscopio según se realizó en la Práctica No. 5.



Figura 34. Depositar producto lácteo fermentado en las cajas Petri



Figura 35. Esparcir en la caja de Petri utilizando la varilla recién flameada



Figura 36. Producto lácteo fermentado esparcido en el medio de cultivo

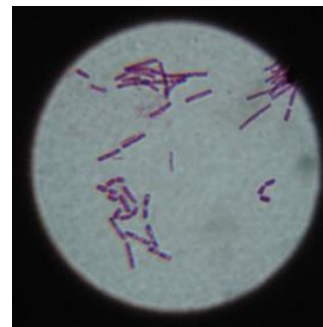


Figura 37. Tinción de gram al microscopio



REPORTE

Resultados

Realizar los esquemas de lactobacilos vistos al microscopio.

| | |
|------|------|
| 100X | 100X |
| 100X | 100X |

Describe la morfología colonial de las bacterias.



CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 10

OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO Y ELABORACIÓN DE YOGURT EMPLEANDO AISLADOS DE BACTERIAS DE LA LECHE.

INTRODUCCIÓN

La biotecnología industrial de alimentos emplea una gran variedad de bacterias para su propósito de transformar materias primas en productos comestibles de un mayor valor agregado.

Un ejemplo de lo anterior es la producción de bebidas alcohólicas empleando la bacteria *Zymomonas mobilis*. Otro es la producción de ácido láctico y yogurt empleado las bacterias *Lactobacillus ssp.* y *Bifidobacterium ssp.*

El ácido láctico es un producto de fermentación de los azúcares, a mayor concentración de azúcar en el medio, mayor concentración de ácido láctico. El yogurt es producido por la fermentación de la lactosa presente en la leche, y efecto de la interacción del ácido láctico con las proteínas de la leche. Es por lo anterior que es posible producir bebidas semejantes a yogurt agregando ácido láctico a la leche.

El yogurt tiene un valor nutricional semejante al de la leche, pero debido a la aceptación de su sabor, tiene un mayor valor económico.

OBJETIVO

El alumno será capaz de producir yogurt y ácido láctico empleando aislados de bacterias de la leche.

MATERIALES

- Asa bacteriológica
- Matraces o frascos con tapa
- Papel aluminio
- Autoclave u olla de presión
- Mechero
- Balanza digital
- Potenciómetro o tiras reactivas de pH
- Leche ultrapasteurizada



- Caldo nutritivo
- Glucosa
- Cajas de Petri con aislados bacterianos

METODOLOGÍA

A. Producción de ácido láctico

Esterilizar los matraces cubiertos con tapones de papel aluminio, alternativamente esterilizar los frascos con tapa.

Preparar el caldo nutritivo de acuerdo a las instrucciones (8 g/L), agregarle 0.5, 1, 2, 3 o 5 g/L de glucosa.

Esterilizar el medio de cultivo (15 min a 15 libras) en matraces, cuidando que no sean llenados a más de la mitad de su capacidad.

Colocar el medio de cultivo estéril en los matraces o frascos estériles, utilizando técnicas asépticas. Cuidar que los matraces o frascos sean llenados hasta el borde.

Rotular los frascos indicando la cantidad de glucosa que se adicionó a cada uno de los medios de cultivo (Fig. 38).

Esterilizar el asa en el mechero, tomar con el asa una colonia de bacteria del ácido láctico, e inocular con ella los frascos llenos de medio de cultivo.

Incubar los frascos a 37°C por 48 horas.

Como una medida de la cantidad de ácido láctico medir el pH del medio de cultivo (Fig. 39).



Figura 38. Frascos rotulados con el medio de cultivo



Figura 39. Medir el pH del medio de cultivo



B. Preparación de yogurt

Esterilizar los matraces cubiertos de papel aluminio o los frascos con tapa.

Llenar hasta el borde los frascos con leche ultrapasteurizada.

Esterilizar el asa en el mechero, tomar con el asa una colonia de bacteria del ácido láctico, e inocular con ella los frascos llenos de leche (Fig. 40).

Incubar los frascos a 37°C por 48 horas.

Refrigerar, hasta la próxima práctica. En caso de haber empleado frascos el yogurt podrá ser consumido por el alumno.

Medir el pH del yogurt (Fig. 41).



Figura 40. Inocular bacterias del ácido láctico en los frascos con leche



Figura 41. Medir el pH del yogurt

REPORTE

Resultados

A. Producción del ácido láctico. Completa la siguiente tabla:

| | |
|----------------------------|-----|
| Medio con 0.5 g de glucosa | pH= |
| Medio con 1 g de glucosa | pH= |
| Medio con 2 g de glucosa | pH= |
| Medio con 3 g de glucosa | pH= |
| Medio con 5 g de glucosa | pH= |



Realiza en papel milimétrico un gráfico de concentración de glucosa contra pH.

B. Anota las características organolépticas de tu yogurt

| | |
|--------|------------|
| Yogurt | pH |
| | Color |
| | Viscosidad |
| | Sabor |

Menciona las diferencias y semejanzas del yogurt producido y el producto comercial en cuanto a olor, sabor, color y viscosidad.

CUESTIONARIO

1) ¿Qué medio de cultivo produjo mayor cantidad de ácido láctico?



PRÁCTICA No. 11

EVALUACIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES ANTIMICROBIANOS

INTRODUCCIÓN

Desde que se tuvo conocimiento de que muchas enfermedades son ocasionadas por microorganismos, la humanidad ha estado buscando la forma de exterminarlos.

En la actualidad existen en el mercado infinidad de productos a los que se les atribuyen propiedades germicidas y que tienen muy diversos usos: pastas de dientes, líquidos desinfectantes, aromatizantes, entre otros.

Es interesante valorar el poder antimicrobiano que tienen este tipo de productos. Para ello existen técnicas como la de difusión en agar y la técnica de diluciones en tubo. En esta ocasión se aplicará la técnica en tubos, la cual consiste en agregar a un cultivo del microorganismo, una cantidad conocida del producto que se desea probar.

OBJETIVOS

- 1.- Evaluar la eficacia en la actividad antimicrobiana de diferentes productos comerciales.
- 2.- Comparar diferentes marcas de productos de este tipo.

MATERIALES

- Tubos con caldo nutritivo estéril
- Mechero
- Asa bacteriológica
- Diferentes agentes antimicrobianos comerciales
- Cultivos puros de *Escherichia coli* y *Staphylococcus sp.*
- Marcador permanente
- Pipetas estériles de 1ml
- Pipetero de Acero Inoxidable
- Horno Pasteur



METODOLOGÍA

- 1) En un tubo con caldo nutritivo estéril, con la pipeta esterilizada de 1ml agregar 0.1 ml. de solución del antimicrobiano que se desea probar.
- 2) Enseguida inocular en un tubo un cultivo puro de *Escherichia coli*. Como se muestra en la Fig.42
- 3) Repetir la operación del inciso 1 y 2 con *Staphylococcus sp.*
- 4) Agitar los tubos para distribuir uniformemente las bacterias.
- 5) Incubar durante 48 horas a 35 - 37°C.
- 6) Después de la incubación observar si hay desarrollo.



Figura 42. Es importante cuidar la asepsia durante la evaluación de los productos antimicrobianos, ya que así se sabrá en verdad cuál es su alcance y eficacia en el control de microorganismos indeseables.



Figura 43. Difusión en agar y diluciones en tubo para probar la eficacia de los productos antimicrobianos.



REPORTE

Resultados

Escribir los resultados a continuación:

| <i>Microorganismo</i> | <i>Tipo y marca del Agente antimicrobiano</i> | <i>Desarrollo</i> | <i>Efectividad</i> |
|-----------------------|---|-------------------|--------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

CUESTIONARIO

1.- Mencione dos de los diferentes efectos que pueden tener los agentes químicos sobre los microorganismos.

2.- ¿Qué aplicación tienen los agentes probados?



3.- ¿Qué indica un resultado con desarrollo microbiano en presencia del agente químico?

4.- ¿Cuál de los agentes probados tuvo mayor efectividad con *Escherichia coli*?

5.- ¿Cuál de los agentes probados tuvo mayor efectividad con *Staphylococcus aureus*?

6.- ¿Cuál de los microorganismos utilizados presentó mayor sensibilidad a los agentes químicos?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



PRÁCTICA No. 12

DIFERENCIA ENTRE UN AGENTE BACTERICIDA Y UN BACTERIOSTÁTICO

INTRODUCCIÓN:

Por sus efectos en los microorganismos los agentes químicos pueden ser de dos tipos básicos: *bactericidas* y *bacteriostáticos*.

Cuando un antibiótico mata a los microorganismos se dice que es bactericida; mientras que cuando simplemente impide su desarrollo se habla de un bacteriostático. Por lo general los agentes bacteriostáticos tienen un efecto reversible; es decir, que al eliminar el agente, los microorganismos vuelven a su actividad normal y pueden crecer si se les coloca en las condiciones que necesitan para su crecimiento.

OBJETIVO

Probar la acción bactericida o bacteriostática de algunos agentes químicos con efecto antimicrobiano.

MATERIALES:

- Tubos con caldo nutritivo estéril
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Tubos problema negativos de la práctica anterior
- Marcador permanente

METODOLOGÍA

- 1) Con el asa estéril tomar una asada del material contenido en cada uno de los tubos en que se probaron los agentes químicos de la práctica anterior (los tubos negativos).
- 2) Inocular por separado en tubos que contengan caldo nutritivo estéril.
- 3) Incubar a 37°C por 48 horas.



4) Después del tiempo de incubación, observar si hay desarrollo del cultivo.

NOTA: Se toman como positivos aquellos tubos en los que se presente turbidez en el medio y como negativos los que estén cristalinos (Fig. 34).

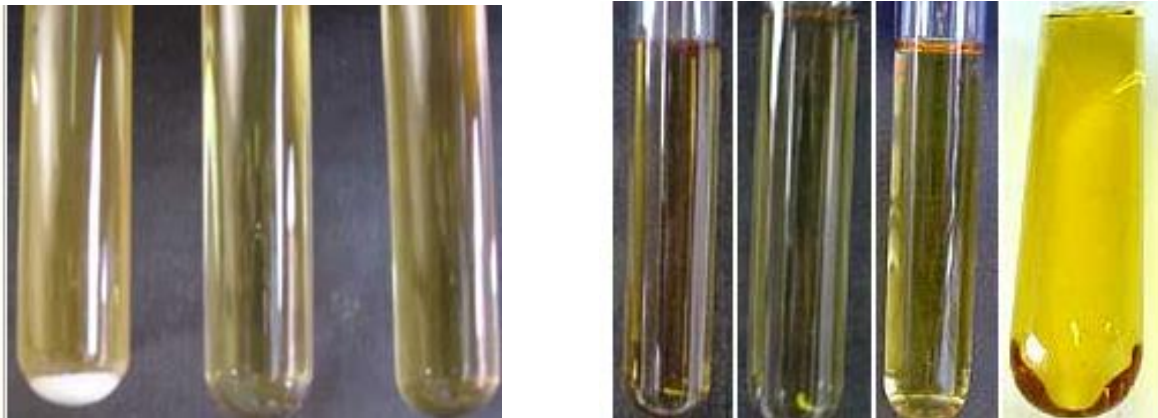


Figura 44. Tubos con microorganismos y dosis de productos antimicrobianos.

REPORTE

Resultados

Escribir los resultados a continuación:

| <i>Microorganismo</i> | <i>Tipo y marca del Agente antimicrobiano</i> | <i>Turbidez en el medio</i> | <i>Efecto del agente</i> |
|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |



PRACTICA No. 13

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS

INTRODUCCIÓN

Un antibiótico se ha definido como una sustancia producida por un organismo viviente, que inhibe el crecimiento o la actividad de otro organismo y que tiene una toxicidad selectiva.

El uso de los antibióticos tuvo su origen en 1929 cuando Fleming encontró que el hongo *Penicillium* inhibía el crecimiento de los estafilococos, desde entonces se han descubierto otros microorganismos productores de este tipo de sustancias y en la actualidad muchos se preparan por síntesis.

Aunque se han encontrado cientos de antibióticos diferentes, no todos se utilizan en medicina, ya que la mayoría de ellos presentan una alta toxicidad para el organismo humano. Los que se utilizan son aquellos que tienen efecto sobre los microorganismos, a concentraciones relativamente inofensivas para las células humanas.

No todas las sustancias con propiedades antibióticas actúan de la misma manera, sino que se pueden presentar diferentes mecanismos de acción.

La actividad antimicrobiana se mide *in vitro* para determinar: 1) la potencia de un agente antimicrobiano en solución; 2) la concentración de agentes en los líquidos del cuerpo o en los tejidos y 3) la sensibilidad de un microorganismo dado, a concentraciones conocidas de la sustancia.

En muchos casos de infección es necesario conocer la sensibilidad del microorganismo al antibiótico, incluso cuando se conoce la identidad del agente causal, ya que existen muchas cepas mutantes que se tornan resistentes.

La sensibilidad a los antibióticos se puede medir por un método de difusión en agar, o utilizando una técnica de dilución en tubo para determinar la *concentración inhibitoria mínima (CIM)*.

Existen varios aspectos importantes en la interpretación de los métodos de sensibilidad con discos, ya que la zona de inhibición de crecimiento depende de varios factores:

1.) *El poder de difusión del antibiótico en el medio.* Algunos antibióticos no difunden bien en el medio de cultivo utilizado.



2.) *El espesor del medio de cultivo.* Una capa gruesa del medio permite una mayor difusión vertical del antibiótico, disminuyendo entonces la difusión en la superficie; por estas razones la zona de inhibición resulta relativamente menor en las placas gruesas.

3.) *La colocación correcta del disco.* Mientras mayor sea la superficie del medio que toque el disco, mayor será la difusión del antibiótico, y por lo tanto, será mayor su efectividad.

4.) *Agentes bloqueadores.* Existen algunas sustancias con efecto bloqueador de la acción de los antibióticos. Por ejemplo, el ácido paraaminobenzoico bloquea la acción de las sulfonamidas; por lo tanto si quiere investigarse la sensibilidad a estas sustancias debe utilizarse un medio que no contenga este ácido.

5.) *El pH del medio.* La aureomicina da zonas de inhibición más anchas en los medios ácidos que en los alcalinos, mientras que para el caso de la estreptomycin los resultados son a la inversa.

6.) *La tasa de desarrollo de los microorganismos que se investigan.* Un microorganismo de desarrollo lento permite que un antibiótico de difusión rápida establezca un nivel bactericida en el medio ambiente antes de que el desarrollo produzca fenómenos visibles. Un microorganismo de desarrollo rápido, alrededor del mismo disco de antibiótico, podría alcanzar un nivel bastante alto antes de que se obtuvieran concentraciones bactericidas en el medio; en estas condiciones la zona de inhibición sería mucho menor.

OBJETIVO

Probar la efectividad de algunos antibióticos sobre dos cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

MATERIALES:

- Discos impregnados con diferentes antibióticos
- Pinzas para disección
- 2 Cajas de Petri con agar nutritivo estéril
- Mechero
- Pipetas estériles
- Hisopos estériles
- Cultivos puros de: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Marcador permanente



METODOLOGÍA

Método de Kirby-Bauer (difusión en agar)

- 1) Tomar una caja de Petri con agar nutritivo estéril.
- 2) Inocular cerca de la periferia del medio, con una asada llena de cultivo puro de *Escherichia coli*.
- 3) Con un hisopo estéril distribuir uniformemente el inóculo por toda la superficie del medio de cultivo como se ilustra en la Figura 45.
- 4) Sumergir en solución desinfectante el hisopo, para posteriormente esterilizarlo.
- 5) En otra placa hacer lo mismo con un cultivo de *Staphylococcus aureus*.
- 6) Enseguida colocar sobre la superficie sembrada, los discos impregnados de diferentes antibióticos, procurando que se adhieran bien al medio para que pueda efectuarse la difusión sin problemas.
- 7) Etiquetar las cajas con los datos correspondientes.
- 8) Incubar a 35°C por 48 horas.
- 9) Observar, interpretar los resultados y tomar nota de ellos.

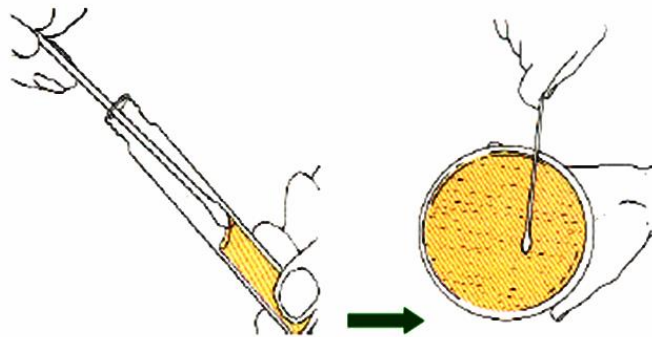


Figura 45. Forma correcta de inocular con hisopo



Interpretación de resultados:

Durante la incubación, el agente antimicrobiano difunde desde el disco hacia el agar; cuanto más se aleja del disco, menor será su concentración.

A una cierta distancia del disco se alcanza la MIC (concentración mínima inhibitoria); pasado este punto hay crecimiento, pero pasado este punto no hay desarrollo bacteriano, sino que se presenta una *zona de inhibición* (ver Fig. 46 y 48), y el diámetro de esta zona es proporcional a la cantidad de agente antimicrobiano añadida al disco y a la efectividad total del agente contra el microorganismo.

Cada disco debe tener especificada la concentración de antibiótico que contiene y después de la incubación, se podrá observar la presencia o ausencia de la zona de inhibición. Si existe esta zona deberá medirse el diámetro de la misma, hasta donde empieza el crecimiento bacteriano.

Las medidas de las zonas inhibitorias dadas en milímetros, se comparan con datos estándar para saber si realmente el microorganismo es sensible al antibiótico en cuestión (ver tabla).

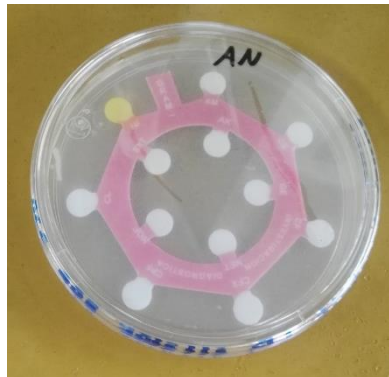


Figura 46. Disco de antibióticos (también llamado disco de Kirby-Bauer)

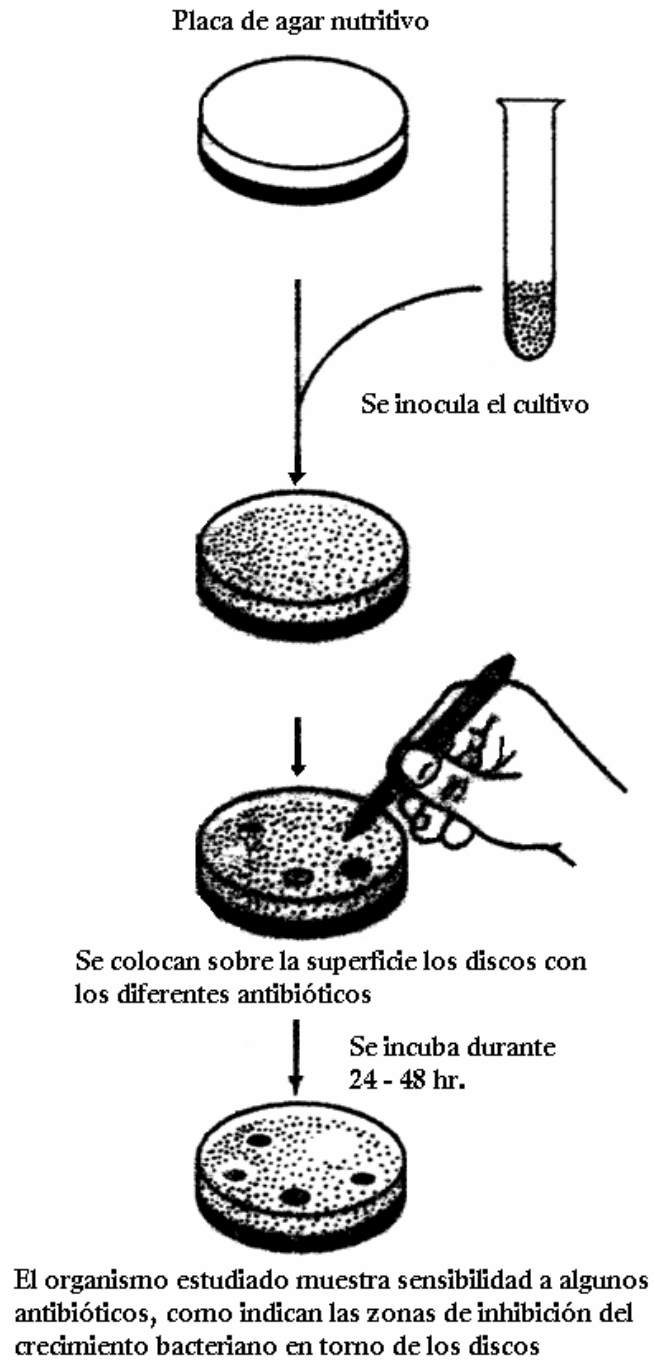


Figura 47. Método de la difusión en agar para determinar la actividad de los antibióticos.

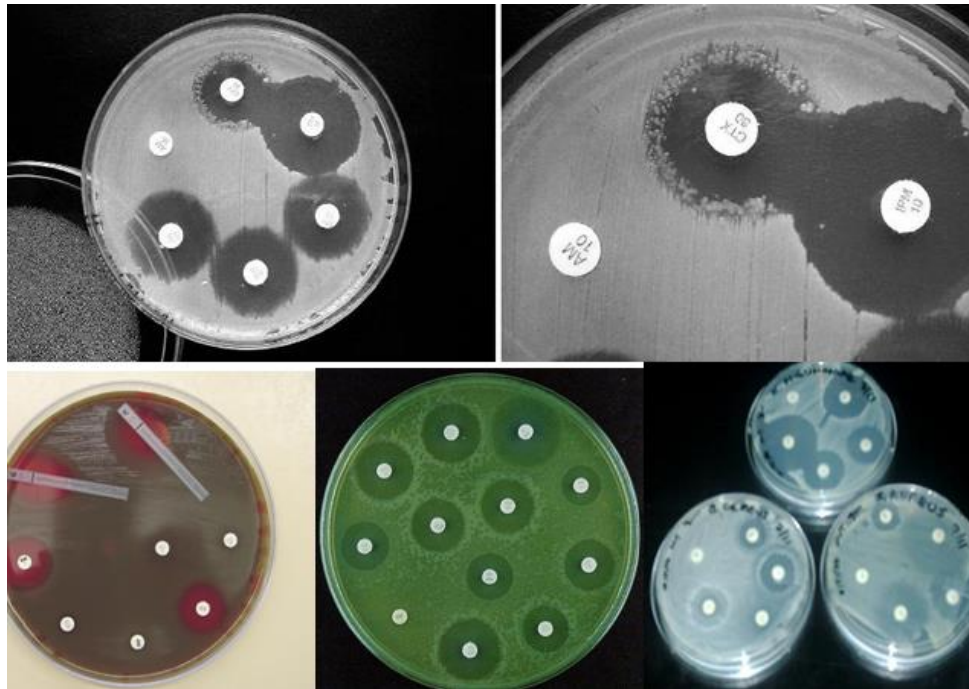


Figura 48. Después de la incubación se observan zonas de inhibición alrededor de los antibióticos que son efectivos.

REPORTE

Resultados

En el siguiente cuadro anote sus resultados:

- El nombre del antibiótico.
- El código que corresponde al antibiótico en el disco.
- El diámetro de la zona de inhibición, medida en milímetros.
- De acuerdo a las medidas del diámetro, compare en la tabla de datos del inserto estándar y anote si el microorganismo es sensible, intermedio o resistente al antibiótico.



4.- ¿Qué indica la ausencia de una zona de inhibición?

5.-¿Qué antibiótico recomendaría aplicar para el caso de una infección por *Staphylococcus aureus*?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

Alexander, S. y Strete D. 2000. Microbiology: A Photographic Atlas for the Laboratory. Spiral Bound. USA.

Álvarez M., Mendoza E. 1994. Manual Básico de Bacteriología. UNAM. 151 pp.

Atlas R., Bartha R. 2005. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Addison Wesley Longman. 677 pp.

Bradshaw J. 1976. Microbiología del laboratorio. Ed. Manual Moderno. 231 pp.

Brock, T. D., Madigan, M. T. Martinko, K. M. y Parker, J. 2004. Biology of Microorganisms. Décima edición. Prentice-Hall. USA. 986 pp.

Campbell, R. 1987. Ecología Microbiana. Ed. Limusa. México. 586 pp.

Cowan K. y Park. K. T. 2006. Microbiology systems approach. McGraw Hill International Edition. Boston. USA. 806 pp.

Holt, G. J., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., Williams S. T. 1994. Bergey. 1994. Manual of Determinative Bacteriology. 9a. Ed. Williams & Wilkins. Baltimore. 787 pp.

Johnson. T y Case, C. 2004. Laboratory Experiments in Microbiology 7th Edition. Edit. John Case. USA.

Madigan, M., Martinko, J. y Parquer, J. 2003. Brok Biology of Microorganisms. 10th. Edition. Prentice-Hall. US.

Pelczar M. 1982. Microbiología, Mc. Grall-Hill. 824.pp.

Prescott, H. K. 2004. Microbiología, Mc. Graww Hill 1240.pp.

Sánchez-Yáñez J. M. 2005. Tópicos selectos de microbiología. UMSNH 141.pp.

Stanier, R. Y., Adelberg, E. A. y Ingraham, J. L. 1989. Microbiología. Cuarta Edición. Editorial REPLA- España. 836.pp.

Tortora, F. C. 2001. Microbiology. Addison Wesley Longman 887 pp.