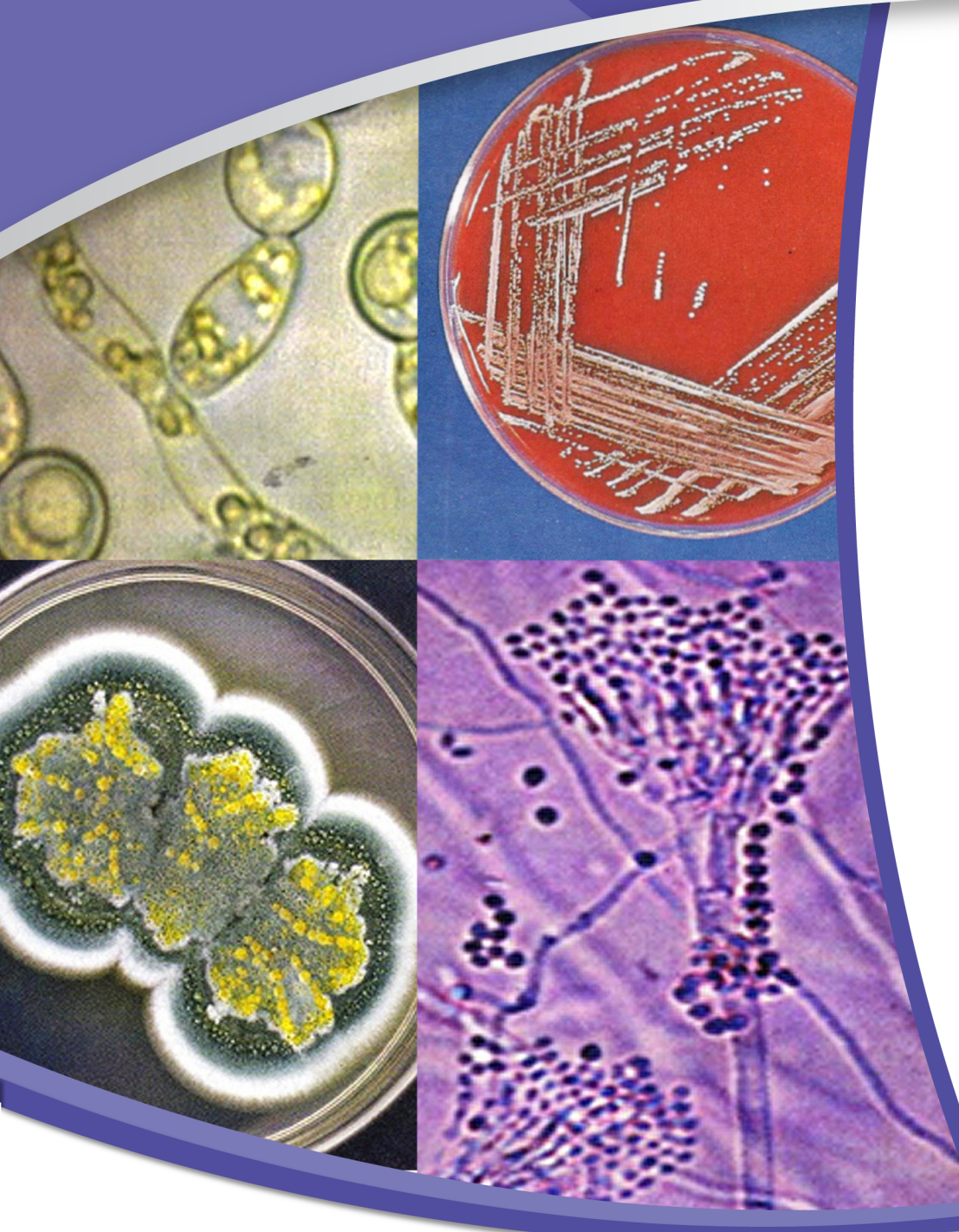




Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

Curso práctico de Microbiología



Rodolfo Velasco Lezama

Rafaela Tapia Aguilar



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Dr. Salvador Vega y León
Rector General

Mtro. Norberto Manjarrez Álvarez
Secretario General

UNIDAD IZTAPALAPA

Dr. José Octavio Nateras Domínguez
Rector de Unidad

Dr. Miguel Ángel Gómez Fonseca
Secretario de Unidad

Dra. Edith Ponce Alquicira
Directora de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Dra. Milagros Huerta Coria
Coordinadora de Extensión Universitaria

Lic. Adrián Felipe Valencia Llamas
Jefe de la Sección de Producción Editorial

Primera Impresión 2014

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina,
Del. Iztapalapa, C.P 09340, México D.F. Tel.: 5804 4600

Impreso y hecho en México/*Printed in Mexico*

Índice

Presentación	5
Normas para trabajar en el laboratorio de microbiología	7
Lavado de la cristalería empleada en el laboratorio de microbiología	9
Práctica 1 Preparación de material de laboratorio y medios de cultivo para esterilización	11
Práctica 2 Recuento de bacterias por la técnica de vaciado en placa	17
Práctica 3 Aislamiento de bacterias por el método de estría cruzada e identificación presuntiva por morfología colonial y microscópica	21
Práctica 4 Caracterización de bacterias mediante pruebas bioquímicas	27
Práctica 5 Curva de crecimiento de bacterias, agentes físicos y químicos que la modifican	31
Práctica 6 Sensibilidad bacteriana ante los antibióticos (antibiograma)	35
Práctica 7 Aislamiento de hongos microscópicos	41
Práctica 8 Identificación macroscópica y microscópica de hongos	45
Práctica 9 Titulación de fagos	51
Práctica 10 Identificación de protozoarios	55
Prácticas adicionales:	
Aislamiento y cultivo de bacterias anaerobias	59
Coeficiente fenólico	63
Pasteurización	67
Apéndice A Microscopía	71
Apéndice B Métodos de tinción	79
Apéndice C Preparación de medios de cultivo	81
Apéndice D Preparación e interpretación de pruebas bioquímicas	89
Apéndice E Formulación de las soluciones de trabajo	93
Apéndice F Uso del espectrofotómetro	97
Apéndice G Fotografías	99

Presentación

Esta obra se ha elaborado con el propósito de apoyar a los profesores y alumnos del curso práctico de Microbiología (clave 2341096) de la Licenciatura en Biología Experimental, no obstante, se puede utilizar en las prácticas de Microbiología General de otras licenciaturas de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, ya que en el manual se incluyen prácticas que son fundamentales en la formación de los estudiantes de ciencias biológicas, particularmente aquellas que enseñan al alumno a preparar y esterilizar materiales y medios de cultivo, su manejo en condiciones de esterilidad y utilización de acuerdo con su composición y estado físico. Además, diferentes técnicas para el cultivo de virus, bacterias y hongos.

En el presente manual se incluyen 10 prácticas que ayudarán a los estudiantes en la identificación de los microorganismos de acuerdo con su morfología colonial, morfología microscópica y por sus características metabólicas mediante la aplicación de pruebas bioquímicas, que conducen en este caso, a la identificación precisa de enterobacterias asociadas con la contaminación de los alimentos e infecciones gastrointestinales.

En las prácticas de curva de crecimiento y antibiograma se estudia el efecto que tienen las variaciones de pH y de temperatura sobre el crecimiento bacteriano y como se modifica la viabilidad de las bacterias ante antibióticos y agentes desinfectantes, respectivamente.

Para la selección y diseño de las prácticas se consideró que el curso experimental consta de 11 sesiones, por lo que se proponen 10 prácticas obligatorias, que proporcionarán los conocimientos fundamentales que debe adquirir el estudiante y que además complementan al curso teórico correspondiente. Adicionalmente, se incluyen otras prácticas que muestran aplicaciones de técnicas microbiológicas a campos específicos y que pueden ser utilizadas en forma opcional ante imprevistos.

El número, tipo de prácticas propuestas y el orden en el que se presentan son resultado de la experiencia de haber impartido el curso, en los tiempos por sesión y por trimestre asignados para ello, además que van a la par con su exposición en la teoría.

Las prácticas están diseñadas para que el alumno adquiera destreza manual, ejercite su capacidad deductiva, refuerce los conocimientos teóricos mediante la respuesta a cuestionarios, reportes y exámenes que se aplican en cada práctica.

Consideramos que con las habilidades y conceptos adquiridos en este curso, los alumnos podrán desempeñarse adecuadamente en cursos posteriores relacionados con la Bioquímica, la Biología Molecular y la Genética Molecular de microorganismos.

El manual se ha elaborado para que pueda servir como primera referencia de técnicas microbiológicas, aún cuando el alumno haya terminado sus estudios, es por esta razón que para una mejor utilidad hemos incluido apéndices referentes a preparación de medios de cultivo y disoluciones, tinciones e interpretación de pruebas bioquímicas. Se incluyen además fotografías de los resultados de pruebas bioquímicas.

Rodolfo Velasco Lezama

Rafaela Tapia Aguilar

Normas para trabajar en el laboratorio de microbiología

Debido a la naturaleza de los microorganismos, se requiere desarrollar habilidades que permitan un trabajo limpio, seguro, rápido y preciso; por ello es necesario enfatizar que se debe trabajar en un espacio limpio, sobre una superficie desinfectada y dentro del área de esterilidad que proporciona la llama del mechero.

Para disminuir los riesgos de contaminación de los cultivos y de las personas que trabajan en el laboratorio de microbiología, se recomienda seguir las medidas de seguridad que se mencionan a continuación:

1. Leer cuidadosamente los protocolos de prácticas. Al iniciar el trabajo en el laboratorio debe tener una idea clara del procedimiento a seguir, del uso de aparatos y asegurarse de contar con el material necesario.
2. Utilizar bata limpia, de manga larga, preferentemente de algodón y en buen estado.
3. Mantener fuera del área de trabajo todos los objetos personales.
4. Lavarse las manos al iniciar y al finalizar el trabajo. Se sugiere usar jabón líquido o en polvo.
5. Antes y después de trabajar, desinfectar la superficie de las mesas de laboratorio con solución germicida proporcionada por los profesores.
6. Para evitar fuentes de contaminación externa y accidentes, se recomienda sujetar el cabello largo detrás del cuello y traer las uñas cortas y limpias.
7. Encender la llama del mechero para proveer un área estéril de trabajo.
8. Evitar conversaciones innecesarias que conduzcan a riesgos y distracciones.
9. Por ningún motivo comer, beber, fumar, llevarse cualquier objeto a la boca o aplicarse cosméticos durante su estancia en el laboratorio.
10. Anotar la clave, la fecha y toda la información que permita la identificación del material durante la práctica.
11. Manejar con extrema precaución las pipetas con propipetas o bulbos.
12. Cuando se derramen líquidos, se rompan tubos o placas con cultivos o material contaminante, vierta benzal (1:10,000) o fenol (5%) y avise al profesor.
13. Cuando trabaje con material infeccioso de origen humano o animal utilizar adicionalmente guantes y cubrebocas.
14. No sacar los cultivos de laboratorio a menos que sea estrictamente necesario.
15. Cuando se requiera trabajar con sangre, suero, plasma, orina, saliva, etc., utilice únicamente sus propios fluidos para el estudio.
16. Evitar salir del laboratorio en forma innecesaria, así como la presencia de personas ajenas al curso.
17. Al finalizar la práctica el material debe estar debidamente clasificado como: Material para incubar, material sucio para esterilizar, material sucio para lavar y material limpio.
18. El material contaminado se esteriliza antes de lavarlo.
19. Localizar y familiarizarse con el uso de campanas de extracción, interruptores de corriente eléctrica, regaderas, extinguidores, mantas contra incendios, botiquín de primeros auxilios y salidas de emergencia.

Lavado de la cristalería empleada en el laboratorio de microbiología




Limpieza de la cristalería nueva

Debe tomarse precaución especial con la cristalería nueva, ya que puede tener esporas termorresistentes provenientes de su empaque. Para matar a los microorganismos, es conveniente hervir el material en solución detergente, dejar enfriar y enjuagar cuidadosamente con agua corriente y agua destilada. Se deja secar en el horno antes de prepararlo para su esterilización.

Limpieza de la cristalería usada

1. Toda la cristalería que contenga material contaminado debe esterilizarse en autoclave a 15 libras/pulgada² de presión durante 20 minutos.
2. Después de la esterilización del material contaminado, cuando los medios sean semisólidos esperar a la gelificación de estos para desecharlos, después colocar el material previamente esterilizado en una solución detergente y cepillarlo cuidadosamente.
3. Enjuagar con agua corriente por lo menos tres veces y después con agua destilada.
4. Dejar escurrir y secar en el horno.
5. Cubrir el material con papel para resguardarlo del polvo hasta su esterilización.

Bibliografía

-  Forre, A. W. y Ruff, L. W. Seguridad en el laboratorio. En: Zavala De Serratos, E. y Pérez Moreno, C. Editores: Métodos Selectos para el Pequeño Laboratorio de Química Clínica. México. 1984.
-  González de Buitrago, J. M. Tecnología y métodos de laboratorio clínico. Salvat Editores S.A. España. 1992.
-  Jayababu, M. Introductory practical microbiology. Alpha Science International Ltd. Oxford. 2007.

Práctica 1

Preparación de material de laboratorio y medios de cultivo para esterilización

Objetivo

El alumno aprenderá a preparar el material de vidrio, instrumental de laboratorio y medios de cultivo para su esterilización.

Introducción

El microbiólogo utiliza como herramienta fundamental el cultivo de microorganismos. Los medios de cultivo y el material de vidrio e instrumental que se utilizan deben estar limpios para su esterilización; así como protegerlos adecuadamente para que se mantengan estériles hasta su uso. Para comprobar la esterilidad de los medios de cultivo se dejan incubando a 37 °C durante 24 horas después de ser esterilizados y sólo se utilizarán si no aparece desarrollo microbiano.

El término esterilización es absoluto y comprende los mecanismos físicos o químicos que conducen a la eliminación de todo tipo de microorganismos, incluyendo su capacidad de reproducción; esto se consigue con agentes químicos a concentraciones adecuadas o con métodos físicos como el calor húmedo, calor seco, radiaciones ionizantes, no ionizantes, vibraciones sónicas y microondas. Los métodos físicos son los que se usan más frecuentemente en la esterilización y son los que se utilizarán durante este curso.

El agente esterilizante más sencillo y seguro es el calor, ya que inactiva enzimas y otros componentes proteínicos esenciales para el funcionamiento celular; puede aplicarse en forma seca o húmeda dependiendo del material que se quiere esterilizar.

La esterilización con calor seco consiste en crear una atmósfera de aire a temperaturas de 160 °C a 180 °C y con una exposición del material durante dos horas; se efectúa en hornos o estufas. Este proceso es recomendado para materiales de vidrio.

La esterilización con calor húmedo en autoclave consiste en una cámara doble en la cual el aire es desplazado completamente por vapor a saturación produciendo temperaturas superiores a las de ebullición; generalmente se opera a una presión de 15 libras/pulgada² y temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Este método es recomendado para la esterilización de material de vidrio, blancos y soluciones termoestables. Ver cuadro 1.

Cuadro 1. Condiciones óptimas para la esterilización de diversos materiales.

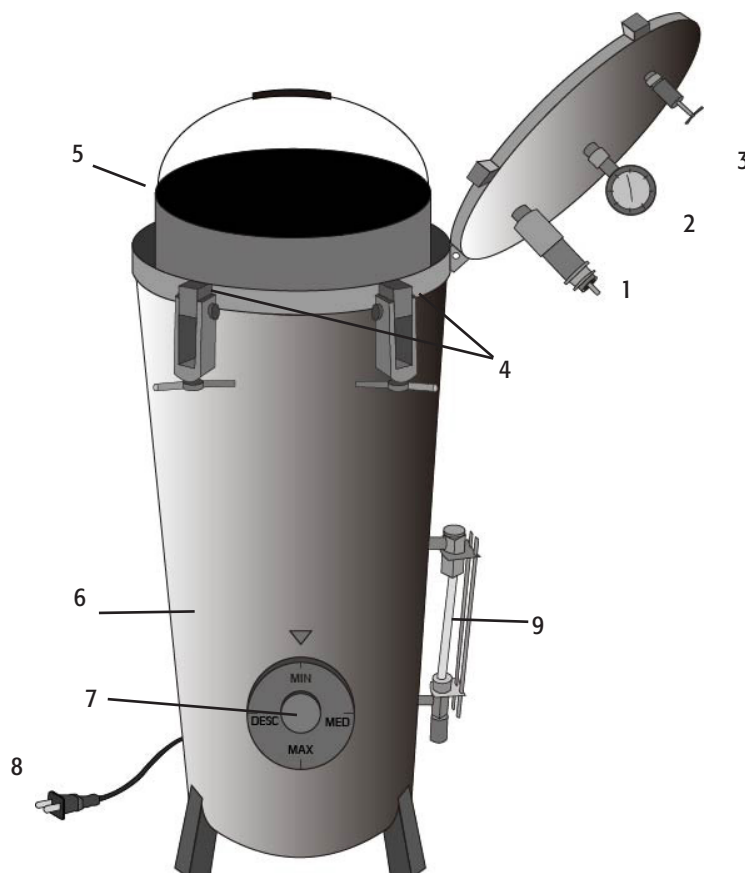
MATERIAL	Temperatura (°C)	Presión		Tiempo (minutos)
		Libras/pulg ²	kg/cm ²	
Medios de cultivo líquidos	115	10	0.72	15
Medios de cultivo con agar	121	15	1.09	15
Cultivos infectantes	126	19	1.5	15
Ropa, material de cirugía	126	19	1.5	20

Instrucciones generales para el manejo del autoclave (Ver figura 1):

1. Comprobar que el nivel de agua sea adecuado, de acuerdo al indicador del equipo.
2. Conectar el autoclave a la corriente eléctrica.
3. Colocar en el contenedor de aluminio el material por esterilizar.
4. Cerrar y atornillar la tapa con los cerrojos con bastidor de tuerca, apretando las tuercas por parejas diametralmente opuestas de forma que la tapa se acople perfectamente.
5. Abrir la válvula de seguridad y girar la perilla de control de calentamiento hasta la marca MAX (máximo).
6. Una vez que salga el vapor por la válvula de seguridad, esperar al menos 5 minutos para permitir que todo el aire del interior sea expulsado, posteriormente cerrar la válvula.
7. Vigilar el manómetro y la válvula de seguridad, al alcanzar la presión deseada disminuir la intensidad de calentamiento (llevar a la marca MIN, mínimo), para mantener constante las condiciones requeridas.
8. Al finalizar el tiempo de esterilización apagar la fuente de calor (girar la perilla de control de calentamiento a DESC, desconectar). Esperar a que descienda la presión a cero libras/pulgada² para abrir la válvula de seguridad y permitir que el vapor remanente salga libremente.
9. Abrir la tapa y sacar el material.

Figura 1. Autoclave

1. Tapón de seguridad
2. Manómetro
3. Válvula de seguridad
4. Cerrojo con bastidor de tuerca
5. Contenedor interior de aluminio
6. Cuerpo del autoclave
7. Perilla de control de calentamiento
8. Conector a corriente eléctrica
9. Indicador de nivel de agua



Material por grupo

- Agar de Infusión de Cerebro y Corazón (Agar BHI*)
- Infusión de Cerebro y Corazón (BHI*)
- Papel para envoltura tipo estraza
- Papel aluminio
- Cloruro de sodio
- Algodón
- Incubadora con termostato
- Autoclave
- Horno

Material por equipo

- 3 Matraces Erlenmeyer de 250 ml
- 10 tubos de 15 x 100 mm con tapón de rosca
- 5 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- 8 pipetas de 2 ml
- 5 pipetas de 5 ml
- 2 pipetas Pasteur
- Solución de Benzal 1:10,000
- Tijeras y pinzas rectas sin diente de ratón
- 8 cajas de Petri
- Una gradilla
- Mechero de Bunsen

* De sus siglas en inglés Brain Heart Infusion

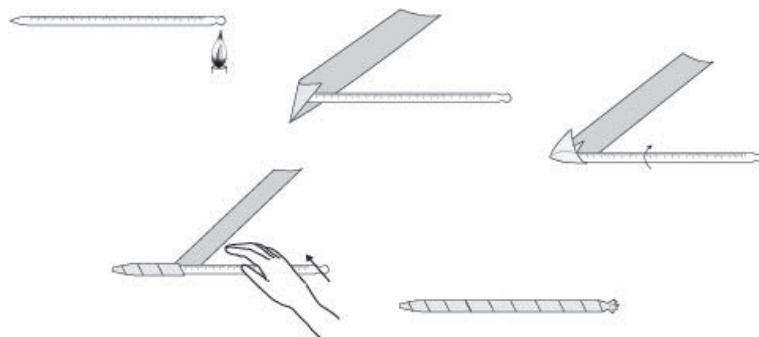
Desarrollo**Preparación de soluciones y medios de cultivo**

1. Preparar 50 ml de solución salina fisiológica (solución acuosa de NaCl al 0.85%), se distribuye un volumen de 4.5 ml en 10 tubos dispuestos en una gradilla y se cubren con tapones de rosca. Los tubos deberán estar debidamente rotulados, protegidos con cubiertas de papel de aluminio y colocados en un recipiente al momento de esterilizarlos.
2. En un matraz Erlenmeyer se preparan 25 ml de infusión de cerebro y corazón (BHI), se distribuye en 5 tubos de 15 x 100 mm con tapón de rosca, debidamente rotulados se colocan en un frasco de boca ancha o bote metálico que se cubre con papel aluminio.
3. En un matraz de 250 ml se preparan 50 ml de Agar de Infusión de Cerebro Corazón (Agar BHI), se cubre la boca del matraz con un tapón de algodón y gasa y se coloca sobre el tapón una cubierta de papel.

Preparación de material de vidrio para esterilización

1. Pipetas.

En la boquilla de la pipeta (esquema 1), se coloca un tapón de algodón de 1.0 cm de largo, de tal forma que el aire pase libremente a través del algodón; flamear el algodón que sale de la boquilla y envolver cada pipeta con papel de estraza en la forma indicada en el esquema 1, evitando así el contacto con el medio externo después de haber sido esterilizadas, pero que sea de fácil y rápido acceso para su utilización.

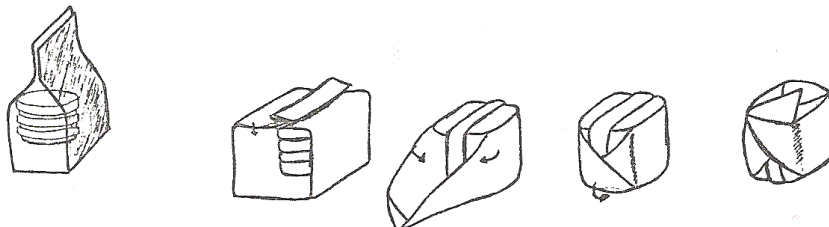


Esquema 1. Envoltura de pipetas

Marcar sobre el papel una flecha que indique el extremo de la boquilla, anotar el volumen de la pipeta, así como el tipo de división y colocar cinta testigo para registrar que han sido esterilizadas.

2. Cajas de Petri.

- a) Envolver con papel de estraza las cajas de Petri en forma individual o por grupo como se muestra en el esquema 2.

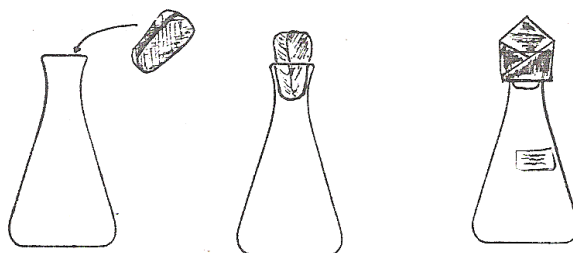


Esquema 2. Envoltura de cajas de Petri

- b) Invertir el paquete de tal forma que las cajas queden con la tapa hacia abajo y se les pega cinta testigo para su esterilización.

3. Matraces.

La boca de un matraz Erlenmeyer se cubre con un tapón de algodón y gasa, que a su vez se protege con un "gorro" de papel de estraza o de aluminio. Ver esquema 3.



Esquema 3. Preparación de matraz Erlenmeyer

Los matraces que contienen medios de cultivo y soluciones deben rotularse con cinta adhesiva y marcador indeleble escribiendo; contenido, fecha de preparación y nombre de quien lo preparó.

Preparación de diversos instrumentos

La regla general para la envoltura de material es que éste quede protegido del medio ambiente, pero que sea de fácil manejo una vez esterilizado.

Esterilización del material

El material de vidrio se coloca en el horno previamente encendido y se mantiene durante 2 horas a una temperatura de 180 °C.

Los medios de cultivo, las soluciones y el instrumental se meten al autoclave y se esterilizan a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos.

Manejo de material estéril

Limpiar la superficie de trabajo con una solución de benzal (1:10,000), prender el mechero y vaciar en las cajas de Petri el Agar BHI hasta $\frac{2}{3}$ partes de su capacidad en condiciones de esterilidad y dejar solidificar el medio a temperatura ambiente. Cada caja se rotula con marcador indeleble con el nombre del medio de cultivo, se apilan y se envuelven con papel de estraza (Ver esquema 2). El paquete se etiqueta con el nombre del medio de cultivo, fecha de preparación, nombre de quien lo preparó y se guarda en refrigeración con la tapa hacia abajo, hasta su utilización.





Prueba de esterilidad

Para comprobar la esterilidad de los medios de cultivo y las soluciones preparadas, se incuban a 37 °C durante 24 horas y sólo podrán ser utilizados si no presentan desarrollo microbiano.

Cuestionario

1. ¿Por qué se utilizan más comúnmente los métodos físicos que los químicos para la esterilización y en qué casos se utiliza cada uno de ellos?
2. ¿Qué es la cinta testigo, cuáles son los sensores químicos, su composición y el fundamento?
3. Defina los siguientes términos: Desinfectante, germicida, microbiostático, antiséptico, higienizante.
4. ¿Cuáles son los componentes esenciales de un medio de cultivo?
5. ¿Qué métodos físicos se utilizan para esterilizar medios de cultivo o soluciones inestables al calor?

Bibliografía

-  Black, G. J. Microbiology. Principles and explorations. 4th edition. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1999.
-  Challis, J. A. Sterilization, disinfection, and antiseptics. En: Goldman, E. & Green, L. E. (Eds.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2009: 3-10.
-  Jayababu, M. Introductory practical microbiology. Alpha Science International Ltd. Oxford. 2007.
-  Pommerville, J. C. Alcamo's fundamentals of microbiology. Jones and Barlett Publishers. Sudbury. 2011.

Práctica 2

Recuento de bacterias por la técnica de vaciado en placa

Objetivo

El alumno conocerá y ensayará una técnica para la cuantificación de bacterias en una muestra y aprenderá a trabajar en condiciones de esterilidad.

Introducción

El crecimiento de bacterias en cultivo puede seguirse mediante métodos directos o indirectos, entre los primeros destacan el conteo al microscopio, conteo por vaciado en placa y conteo automatizado con un contador de partículas tipo Coulter Counter, entre los métodos de conteo indirecto se pueden utilizar los de turbidimetría, determinación de nitrógeno, actividad metabólica, etc. El método más empleado para la cuantificación de microorganismos en suspensión es la medida de la turbidez por comparación con una serie de tubos calibrados por nefelometría o turbidimetría, utilizando como patrones suspensiones bacterianas con concentraciones conocidas de ellas.

La técnica de vaciado en placa consiste en depositar una alícuota de 0.1, 0.5 ó 1.0 ml del inóculo en una caja de Petri, adicionar medio de cultivo con agar fundido (45 °C aproximadamente) y homogeneizar mediante agitación rotatoria de la caja; al solidificar el medio los microorganismos quedan atrapados en el agar. Cada microorganismo se desarrolla y reproduce hasta dar origen a una masa visible de organismos (colonia). En soluciones suficientemente diluidas un microorganismo vivo da origen a una colonia, por esto se le nombra Unidad Formadora de Colonias (UFC), así mediante ésta técnica es posible conocer el número de bacterias vivas presentes en el inóculo.

La muestra original se diluye para determinar el número de bacterias viables a partir de una de las diluciones, multiplicando el número de UFC que aparece en la placa por el factor de dilución correspondiente. La cuenta de colonias puede hacerse por métodos electrónicos o manuales auxiliándose con el contador de colonias tipo Quebec.

La técnica de conteo por vaciado en placa se usa rutinariamente y con resultados satisfactorios en la cuantificación bacteriana en la leche, agua, alimentos y muchos otros productos. Esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes, sin embargo, se logra que el número de colonias contadas sea una estimación aproximada de la cifra presente en la muestra.

Mediante esta técnica y utilizando los medios de Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) o Papa Dextrosa Agar (PDA), se pueden cuantificar las levaduras presentes en una muestra dada.

Cuando se siguen fielmente las condiciones que se señalan para la realización de esta técnica, los resultados pueden llegar a ser reproducibles y confiables.

Material por grupo

- Contador de colonias tipo Quebec
- Incubadora con termostato
- Baño María a 45 °C
- Autoclave
- Horno
- Agar Tripton Extracto de Levadura o Agar de Infusión de Cerebro y Corazón (Agar BHI*)
- Papel para envolver tipo estraza

Material por equipo

Muestra: leche, aguas frescas, tierra o agua de albañal.

Material no estéril:

- canastilla o bote de lámina
- solución de Benzal 1:10,000
- Un matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Una gradilla de alambre
- Un mechero de Bunsen

Material estéril:

- 8 tubos de 15 x 100 mm con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- 8 pipetas de 2 ml
- 5 pipetas de 5 ml
- 8 cajas de Petri

*BHI. De sus siglas en inglés Brain Heart Infusion

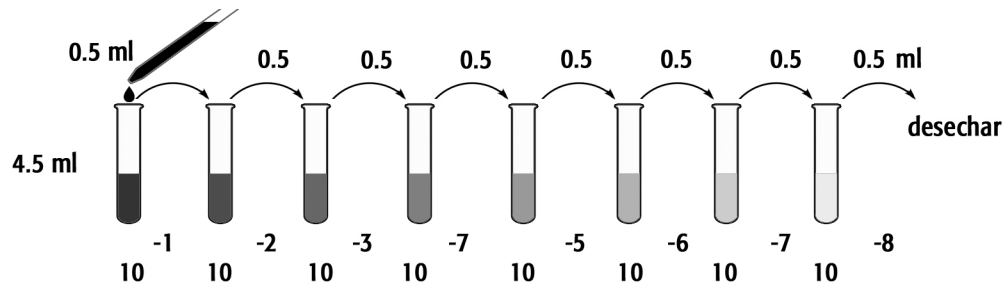
Desarrollo

1. Preparar y esterilizar por equipo 250 ml de agar Tripton Extracto de Levadura o Agar de Infusión de Cerebro y Corazón.
2. Colocar en una gradilla los tubos estériles que contienen 4.5 ml de solución salina fisiológica, numerarlos y preparar diluciones decimales de la muestra de 10^{-1} a 10^{-8} . Ver esquema 4.

Adicionar 0.5 ml ó 0.5 gr de la muestra en el tubo No. 1, homogeneizar mediante agitación manual y transferir 0.5 ml del tubo No. 1 al tubo siguiente, se homogeneiza y así sucesivamente, de tal manera que cada tubo contenga el material y volumen que se muestra en el cuadro 2.

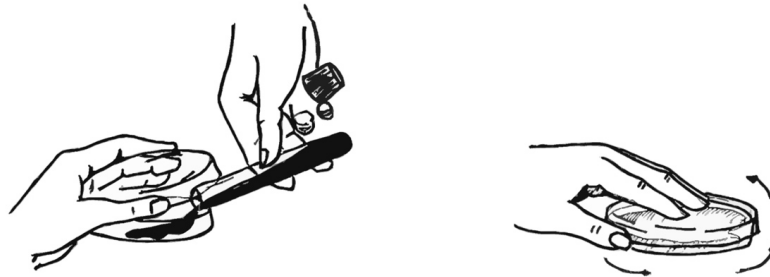
Cuadro 2. Preparación de diluciones decimales

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8
SOLUCIÓN SALINA	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml
MUESTRA	0.5 gr ó 0.5 ml	–	–	–	–	–	–	–
VOLUMEN DE TRANSFERENCIA	–	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
DILUCIÓN FINAL	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}



Esquema 4. Diluciones decimales

- Transferir 1 ml de cada una de las diluciones a cajas de Petri estériles, colocando la punta de la pipeta en el fondo de la caja mientras escurre el líquido.
- A las cajas de Petri se agregan 25 ml de Agar Triptona Extracto de Levadura fundido; se cubren y se agitan suavemente por rotación para que se distribuya homogéneamente el inóculo en el medio de cultivo. Es recomendable utilizar la misma técnica de agitación para todas las cajas, por ejemplo: 20 movimientos a la derecha y 20 movimientos a la izquierda. Ver esquema 5.



Esquema 5. Vaciado y agitación

- Las placas se dejan reposar de 30 a 60 minutos hasta que el medio solidifique. Se apilan, envuelven con papel de estraza y se incuban en posición invertida durante 24 a 36 horas a 37 °C.
- Seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias, registrar la dilución de la muestra en la placa y cuantificar las UFC en el contador tipo Quebec.

Reporte

Expresar el número de UFC por gramo o por mililitro de la muestra utilizada. Utilice la siguiente fórmula:





$$UFC/mL = \frac{\left(\begin{array}{c} \text{UFC en la} \\ \text{placa} \\ \text{seleccionada} \end{array} \right) \left(\begin{array}{c} \text{Dilución de la muestra} \\ \text{en la placa} \\ \text{seleccionada} \end{array} \right)}{1 \text{ ml} *}$$

* Si el volumen de la dilución que fue agregado a la placa no es de 1 ml, hacer el ajuste.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del método de las diluciones en la cuenta de microorganismos respecto a otros métodos de cuantificación?
2. ¿Por qué se utilizó el método de las diluciones y no otro de los mencionados en la práctica?
3. ¿Por qué se seleccionan para la cuantificación de colonias las placas que contienen entre 30 y 300 colonias?
4. ¿Qué condiciones de cultivo y de incubación se requieren modificar para cuantificar levaduras por este método?

Bibliografía

-  Health Protection Agency. Colony count by the pour plate method. National Standard Method W4, Issue 4, U.K. 2005.
-  Lee, P. S. Quantitation of microorganisms. En: Goldman, E. & Green, L. E. (Eds.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2009: 11-30.
-  Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. Microbiology. An evolving science. W.W. Norton. New York. 2009.
-  Vela, G. R. Applied food microbiology. Star Publishing Company. Belmont. 1997.

Práctica 3

Aislamiento de bacterias por el método de estría cruzada e identificación presuntiva por morfología colonial y microscópica

Objetivo

El alumno utilizará el método de estría cruzada para el aislamiento de bacterias a partir de varios substratos, obtendrá cepas puras e identificará presuntivamente a las bacterias en función de la morfología colonial y microscópica.

Introducción

En un hábitat natural; suelo, agua, sedimento acuático, materia orgánica en descomposición, hospederos, etc., las poblaciones microbianas son mixtas y diversas. En las enfermedades infecciosas los microorganismos aislados son predominantemente los agentes causales de la enfermedad. Para determinar las características morfológicas y fisiológicas de los microorganismos causantes de una infección e identificarlos taxonómicamente es indispensable separarlos y cultivarlos para así obtener las cepas puras.

Los métodos más comunes de aislamiento son el de diluciones sucesivas en medio líquido, diluciones en placa y estría cruzada en cajas de Petri.

Para el aislamiento e identificación de bacterias a partir de su hábitat, se utiliza una gran variedad de medios de cultivo, que de acuerdo con su composición nutricional se conocen como medios simples, enriquecidos, diferenciales, selectivos, donde cada microorganismo desarrolla una morfología colonial que permite su identificación.

Mediante la observación microscópica de preparaciones en fresco o frotos teñidos con una tinción simple o diferencial, se pueden poner de manifiesto estructuras como flagelos, esporas, cápsula, pared celular, gránulos metabólicos, etc. En microbiología, la tinción de Gram es la más empleada en el estudio de la morfología de bacterias, ya que estas son clasificadas según su reacción a los colorantes de esta técnica.

Material por grupo

- Autoclave
- Incubadora
- Papel para envolver tipo estraza
- Portaobjetos
- Agar MacConkey (Agar MC)
- Agar Sal y Manitol (Agar SM)
- Agar Infusión de Cerebro y Corazón (Agar BHI*)
- Agar Levine con Eosina y Azul de Metileno (Agar EMB**)
- Reactivos para las pruebas de catalasa y oxidasa:
 - Peróxido de hidrógeno al 3% (catalasa)
 - Diclorhidrato de tetrametilp-fenilendiamina al 1% (oxidasa)
- Soluciones para tinción:
 - Gram: Cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina
 - Cápsula: Rojo congo y mordente para cápsula
 - Esporas: Verde de malaquita y safranina

MUESTRA: Se utilizará una muestra diferente por equipo, la cual puede ser: leche bronca, agua estancada, agua de frutas, exudado faríngeo, un alimento en descomposición o macerado de una planta infectada con *Agrobacterium* sp.

Material por equipo

Material estéril:

- 4 placas de Agar BHI*
- Una placa de Agar EMB**
- Una placa de Agar SM
- Una placa de Agar MC
- Un frasco para colectar la muestra
- 5 aplicadores con punta de algodón

* Por sus siglas en inglés Brain Heart Infusion

**Por sus siglas en inglés Eosin Methylene Blue

Material no estéril:

- Un puente de tinción
- Una asa y porta asa
- Una pizeta con agua destilada
- Solución de Benzal 1:10,000
- Un microscopio óptico
- Un mechero de Bunsen
- Dos cajas de Petri de vidrio

Técnicas y métodos

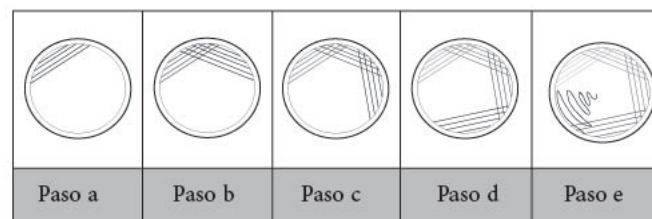
Técnica de aislamiento por estría cruzada.

1. Marcar la caja de Petri especificando tipo de muestra y medio utilizado. Trabajar en el área de esterilidad que provee la llama del mechero de gas.
2. Esterilizar el asa bacteriológica por incineración como se muestra en la figura 2.



Figura 2.

3. Enfriar el asa, tomar una asada de la muestra y colocar en un borde de la placa haciendo estrías continuas hacia el centro de la caja como se ilustra en el esquema 6.a.

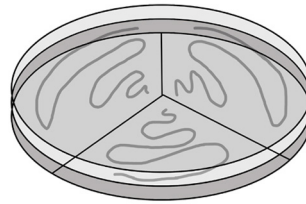


Esquema 6. Aislamiento por estría cruzada

4. Esterilizar el asa nuevamente, enfriar y hacer una segunda serie de estrías tocando la porción final de la primera estría como se indica en el paso b del esquema 6.
5. Repetir el punto 4 para hacer la serie de estrías que se muestran en los pasos c y d del esquema 6.
6. A partir del cuarto trazo hacer una estría amplia hacia el centro de la caja. Paso e, esquema 6.
7. Finalmente, esterilizar el asa.

Desarrollo

1. Sembrar la muestra por la técnica de estría cruzada en placas de agar BHI, MC, SM y EMB.
2. Incubar las cajas de Petri en posición invertida, durante 24 horas a 37 °C.
3. Seleccionar cuatro colonias con diferente morfología colonial considerando: Tamaño, color, luz reflejada, luz transmitida, elevación, bordes, etc. Escriba sus resultados en el cuadro 3. Resembrar cada colonia por estría continua para su purificación en Agar BHI, como se muestra en el esquema 7. Etiquete las cajas e incúbelas a 37 °C durante 24 horas.

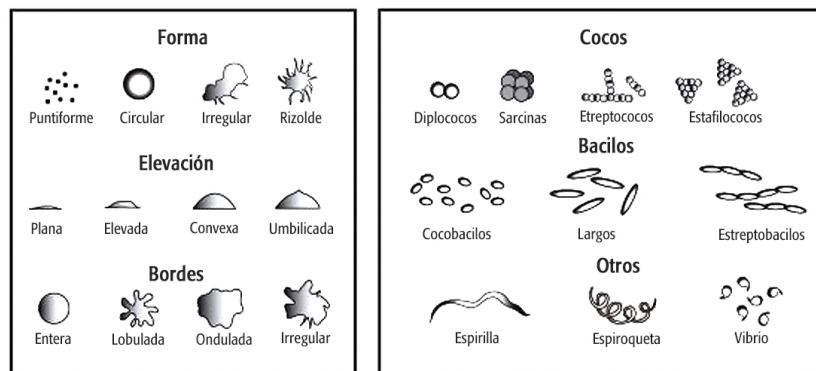


Esquema 7. Estría continua

4. Preparar tres frotis con cada una de las cepas puras. Teñir uno por el método de Gram para observar la morfología microscópica, otro frote para tinción de cápsula y el último para tinción de esporas. (Ver apéndice B). Observar con objetivo de inmersión.
5. Realizar las pruebas de catalasa y de oxidasa para una primera clasificación de las cepas purificadas. Es recomendable realizar las pruebas en cajas de Petri de vidrio y seguir las instrucciones del profesor. (Ver apéndice D)

Reporte

Con la ayuda del esquema 8 describa la morfología colonial y microscópica de las colonias seleccionadas y registre sus resultados en el cuadro 3.



Esquema 8. Morfología colonial y microscópica





Cuadro 3. Resumen de resultados

MUESTRA UTILIZADA:					
		Colonias Seleccionadas			
		1	2	3	4
Medio de cultivo de procedencia					
Morfología Colonial	FORMA				
	COLOR				
	DIÁMETRO				
	BORDES				
	LUZ TRANSMITIDA				
	LUZ REFLEJADA				
	ELEVACIÓN				
	CONSISTENCIA				
Morfología Microscópica	FORMA				
	Tinción de Gram				
	Tinción de Cápsula				
	Tinción de Esporas				
Prueba de Catalasa					
Prueba de Oxidasa					
IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA					

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las diferencias fundamentales entre medios de cultivo simples, enriquecidos, diferenciales, selectivos y de transporte y en qué situación se recomienda su empleo?
2. Mencione las diferencias entre una tinción simple y una tinción diferencial y dé un ejemplo de cada una.
3. ¿Cuál es el fundamento de la tinción de gram, y por qué es la más utilizada para la identificación de bacterias?
4. Mencione otros tipos de morfología colonial no incluidos en el esquema anterior.
5. ¿Qué información proporcionan las pruebas de oxidasa y catalasa en la identificación presuntiva de bacterias?

Bibliografía

-  Mudili, J. Introductory practical microbiology. Alpha Science International Ltd. Oxford. 2007.
-  Pommerville, J. C. Alcamo's laboratory fundamentals of microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. 2007.
-  Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. Microbiology: An introduction. 9th edition. Pearson/ Benjamin Cummings. San Francisco. 2007.
-  Winn, W. Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th edition. Lippincott, Williams & Wilkins. A Walter Kluwer Company. Baltimore. 2006.

Práctica 4

Caracterización de bacterias mediante pruebas bioquímicas

Objetivo

Mediante la utilización de pruebas bioquímicas el alumno determinará género y especie de las bacterias aisladas en la práctica anterior.

Introducción

Las características bacterianas de mayor valor taxonómico para su clasificación son: morfología colonial y microscópica, composición química de la pared celular, inclusiones celulares y productos de almacenamiento, presencia y composición de cápsula, producción de pigmentos, requerimientos nutricionales, capacidad para utilizar diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, los productos de fermentación, temperatura y pH óptimo de crecimiento, sensibilidad a los antibióticos, patogenicidad en animales, relaciones simbióticas, características inmunológicas y hábitat.

El esfuerzo más intenso por clasificar y organizar a las bacterias es el del Manual Bergey, en el cual éstas se clasifican de acuerdo a la morfología y la tinción de Gram en: Bacilos grampositivos, cocos grampositivos, bacilos gramnegativos, cocos gramnegativos, espirilas, espiroquetas y vibrios.

Anterior al empleo de las técnicas de biología molecular, la identificación presuntiva de la mayoría de los microorganismos se basó en las características fisiológicas y bioquímicas específicas, para estas últimas, se diseñaron pruebas sencillas para evidenciar la presencia o ausencia de una enzima, un grupo de enzimas o una vía metabólica completa. Éstas pruebas se han modificado, sustituido o perfeccionado en los últimos 75 años y se realizan en medios miniaturizados preparados en forma comercial, actualmente existe equipo automatizado para la realización de las mismas.

Después de un período de incubación adecuado, los resultados de las pruebas se leen al observar un cambio de color, turbidez o alguna reacción interpretada con facilidad, comparándolos contra su respectivo control.

Material por grupo

- Incubadora
- Campanas de Durham
- Reactivo de Ehrlich o de Kovacs

Pruebas bioquímicas

- Agar Hierro Triple Azúcar (Agar TSI*)
- Agar Lisina Hierro (LIA**)
- Caldo Rojo de Fenol con Glucosa (CRF-Glucosa)
- Caldo Rojo de Fenol con Lactosa (CRF-Lactosa)
- Caldo Rojo de Fenol con Sacarosa (CRF-Sacarosa)
- Medio Rojo de Metilo / Voges Proskauer (MR***-VP)
- Medio Movilidad-Indol-Ornitina (MIO) o Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM)
- Agar Citrato de Simmons (Agar CS)

Material por equipo

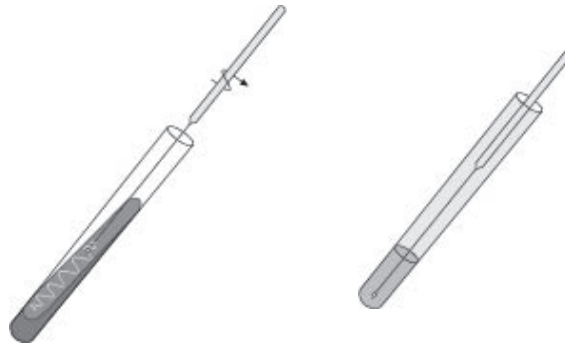
- Juego de pruebas bioquímicas para al menos dos de las cepas purificadas.
- Una gradilla
- Asa y porta asa
- Asa recta
- Microscopio óptico
- Mechero de Bunsen
- Solución de Benzal 1:10,000

- Agar Urea o Caldo Urea
- * De sus siglas en inglés Triple Sugar Iron
- ** De sus siglas en inglés Lisina Iron Agar
- *** De sus siglas en inglés Methyl Red

Desarrollo

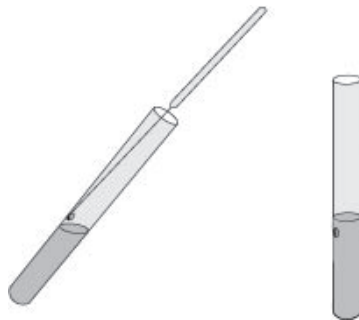
En esta práctica las pruebas fueron seleccionadas para la identificación de bacterias de la Familia Enterobacteriaceae. Su preparación, siembra e interpretación se pueden consultar en los apéndices C y D.

- a) Los medios TSI y LIA se preparan en tubo como un agar inclinado y con profundidad. Se siembran por estría en su superficie y por picadura vertical en la zona de profundidad, sin tocar las paredes del tubo. Ver esquema 9.
- b) El medio MIO se prepara en tubo como un agar semisólido, con una profundidad de ± 3 cm. Se siembra por picadura vertical en la zona de profundidad. Ver esquema 9.
- c) El medio CS se prepara en tubo como un agar inclinado y solo se siembra por estría en la superficie.



Esquema 9. Sembrado por estría y picadura en un medio sólido

- d) Los medios CRF con carbohidratos, caldo Urea y caldo MR/VP se preparan líquidos en tubo, para sembrarlos se inclina el tubo y con el asa se deja una pequeña porción de la colonia en la pared del tubo. Ver esquema 10.



Esquema 10. Sembrado en medio líquido

Incubar a 37 °C durante el tiempo indicado para cada prueba y leer los resultados.

NOTA: Todas las pruebas se leen directamente con excepción de las pruebas de Indol, Rojo de Metilo y la de Voges Proskauer en las que se utilizan reactivos, como se indica en el apéndice D.

Reporte

Para reportar los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas utilizadas en cada cepa, amplíe el formato de la práctica anterior, como se muestra en el cuadro 4 y registre todas las lecturas que se pueden hacer en cada prueba bioquímicas.

Cuadro 4. Resumen de resultados

MUESTRA UTILIZADA:					
		Colonias Seleccionadas Enumeradas			
		1	2	3	4
Medio de cultivo de Procedencia					
Morfología colonial					
Morfología microscópica					
Prueba de Catalasa					
Prueba de Oxidasa					
IDENTIFICACIÓN PRESUNTIVA					
PRUEBAS BIOQUÍMICAS					
TSI aerobiosis/anaerobiosis		/	/	/	/
LIA aerobiosis/anaerobiosis		/	/	/	/
MIO	{ Movilidad Indol Ornitina				
CITRATO DE SIMMONS					
CALDO UREA					
MR/VP		/	/	/	/
CALDO ROJO DE FENOL CON...	GLUCOSA				
	LACTOSA				
	SACAROSA				
IDENTIFICACIÓN CONFIRMATIVA					

Cuestionario

Mencione el fundamento e interpretación de cada una de las pruebas bioquímicas utilizadas.

Bibliografía

-  Janda, J.M. & Abbott, S. L. The family enterobacteriaceae. En: Goldman, E., Green, L. H. Practical handbook of microbiology. 2nd edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2009: 217-229.
-  MacFaddin, J. F. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^a edición. Editorial Médica Panamericana, S.A. de C.V. México. 2003.
-  Madigan, M. T. & Martinko, J. M. Brock biology of microorganisms. 11th edition. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River. 2006.
-  Manual BIOXON de Medios de cultivo y reactivos de diagnóstico. México. 2005.
-  Winn, W. Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th edition. Lippincott, Williams & Wilkins. A Walter Kluwer Company. Baltimore. 2006.

Práctica 5

Curva de crecimiento de bacterias, agentes físicos y químicos que la modifican

Objetivo

El alumno determinará mediante las técnicas de espectrofotometría y de vaciado en placa las fases del crecimiento de bacterias y el efecto que tienen agentes físicos y químicos sobre este.

Introducción

El crecimiento bacteriano es referido como un incremento en el número de bacterias en un medio de cultivo dado, resultado de la reproducción de las mismas. La mayoría de las bacterias se reproducen por fisión o división binaria y el tiempo que le toma a una bacteria captar los nutrientes y dividirse en dos es conocido como el tiempo de generación.

Cuando las bacterias son inoculadas en medio líquido, inicialmente sintetizan enzimas que les permiten aprovechar los nutrientes, por lo que aumentan de tamaño y volumen, esta etapa del crecimiento bacteriano es conocida como **fase lag**, de latencia o de adaptación, en donde la bacteria sintetiza también metabolitos y las enzimas necesarias para la duplicación de su material genético y multiplicación.

La siguiente fase se caracteriza por la reproducción constante de las bacterias; en donde cada una de ellas se dividirá y duplicará su número; al final de esta fase se tendrán 2^n bacterias; donde n es el número de veces que se multiplica la bacteria, esta etapa es conocida como **fase log**, de crecimiento exponencial o continuo.

Si la suspensión bacteriana se mantiene sin renovar el medio de cultivo, se agotan los nutrientes y el oxígeno, se acumulan metabolitos tóxicos, lo que origina la muerte de algunas bacterias, esta etapa es llamada **fase estacionaria**, debido a que se presenta un equilibrio entre el número de bacterias vivas y muertas, posteriormente, el número de células muertas excede al número de sobrevivientes hasta llegar a la muerte de casi todos los microorganismos, por lo que a esta se le denomina **fase de muerte** o decaimiento logarítmico.

El aumento en el número de bacterias y de levaduras en un cultivo líquido puede valorarse mediante la absorción de luz que presenta la suspensión celular, donde a mayor número de microorganismos mayor absorción de luz; si se traza una gráfica del tiempo de incubación en el eje de las abscisas y la absorción de luz en el eje de las ordenadas se observará que la fase de crecimiento continuo representa una línea recta. El crecimiento también puede evaluarse tomando una alícuota de la suspensión bacteriana en cada uno de los tiempos de lectura y sembrando en placas de agar nutritivo por la técnica de vaciado en placa.

Material por grupo

- Cepa de *Escherichia coli*
- Espectrofotómetro Bauch & Lomb (Spectronic 20)
- Incubadora con agitación (37 °C)
- Incubadora con agitación (45 °C)
- Nefelómetro de MacFarland
- Agar Infusión de Cerebro Corazón (Agar BHI*)
- Caldo Infusión de Cerebro y Corazón (BHI*)
- Potenciómetro
- Refrigerador

* De sus siglas en inglés Brain Heart Infusion

Material por equipo

Material estéril

- Un matraz Erlenmeyer de 500 ml con 300 ml de Caldo de Infusión de Cerebro Corazón (BHI)
- 200 ml de Agar Infusión de Cerebro Corazón (Agar BHI)
- 30 tubos con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- 11 tubos de 150 x 15 mm con tapón de rosca
- 15 cajas de Petri
- 10 pipetas de 10 ml
- 10 pipetas de 2 ml

Material no estéril

- Una gradilla
- Un mechero de Bunsen
- Una propipeta
- Solución de Benzal 1:10,000

Desarrollo

1. A partir de un cultivo de *Escherichia coli* de 18 horas proporcionado por el profesor, éste preparará una suspensión bacteriana ajustando su concentración con el tubo No. 1 de la escala del Nefelómetro de MacFarland.
2. Colocar en una gradilla 11 tubos estériles con tapón de rosca. Uno de ellos etiquetarlo como "blanco", los demás numerarlos del 1 al 10 y mantenerlos en refrigeración.
3. Preparar con anticipación 300 ml de Infusión Cerebro Corazón estéril con el pH asignado para cada equipo. El matraz y los tubos de cada equipo deben estar etiquetados con las condiciones de crecimiento correspondientes. Ver cuadro 5.
4. En condiciones de esterilidad, retirar una muestra del 10 ml del medio y conservarlo en refrigeración en el tubo etiquetado como "blanco".

Cuadro 5. Condiciones de crecimiento

Equipo	TEMPERATURA VARIABLE medio de cultivo con pH de 6.8	Equipo	pH VARIABLE temperatura de incubación de 37°C
1	4 °C	4	5.0
2	37 °C *	5	6.8*
3	45 °C	6	9.0

* son iguales condiciones de cultivo

5. En condiciones de esterilidad, el profesor depositará 0.10 ml de la suspensión bacteriana en el matraz de cada equipo. Incubar el matraz en agitación a la temperatura asignada.
6. En condiciones de esterilidad retirar una alícuota de 10 ml del cultivo de *Escherichia coli* contenido en el matraz a las 0, 2, 4, 6, 10, 24, 27, 30, 33 y 48 horas de incubación. Mantenerlas en refrigeración en los tubos numerados del 1 al 10 hasta su procesamiento. (Ver foto 12. Apéndice G)
7. Procesamiento de la alícuota:
 - a) Con las alícuotas de los primeros cuatro tiempos se preparan diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-4} , se coloca 1 ml de la última dilución en el fondo de una caja de Petri estéril debidamente rotulada (indicando tiempo correspondiente de la alícuota y dilución de la misma), adicionar medio fundido de Agar BHI y homogeneizar por rotación, dejar solidificar.
 - b) Con las alícuotas restantes preparar diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-7} , tomar 1 ml de las últimas dos diluciones de cada alícuota y realizar la misma operación que el punto "a".

- c) Envolver todas las cajas de Petri e incubar invertidas a 37 °C durante 24 horas. El paquete deberá rotularse con las condiciones de cultivo.
- d) Contar las Unidades Formadoras de Colonias en cada caja, con la finalidad de determinar UFC/mL a diferentes tiempos, (tubos numerados del 1 al 10).
- e) Con el volumen restante de cada alícuota leer absorbancia en el Espectrofotómetro a una longitud de onda de 575 nm. Utilizar como blanco el medio contenido en el tubo "blanco" (medio de infusión de cerebro corazón sin inocular, conservado bajo las mismas condiciones que el cultivo microbiano). Ver apéndice F para el uso del espectrofotómetro.

Reporte

- A. Escriba los resultados obtenidos en cada una de las condiciones de crecimiento utilizando el formato del cuadro 6.

Cuadro 6. Resumen de resultados

ABSORBANCIA							
		CONDICIONES DE CRECIMIENTO					
No. de tubo	Tiempo (horas)	TEMPERATURA VARIABLE			pH VARIABLE		
		4 °C	37 °C	45 °C	pH=5	pH= 6.8	pH=9
Blanco							
1	0						
2	2						
3	4						
4	6						
5	10						
6	24						
7	27						
8	30						
9	33						
10	48						

UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC/mL)							
		CONDICIONES DE CRECIMIENTO					
No. de tubo	Tiempo (horas)	TEMPERATURA VARIABLE			pH VARIABLE		
		4 °C	37 °C	45 °C	pH=5	pH= 6.8	pH=9
1	0						
2	2						
3	4						
4	6						
5	10						
6	24						
7	27						
8	30						
9	33						
10	48						

- B. Con los resultados obtenidos en cada "condición de crecimiento" trace una gráfica en papel milimétrico colocando en el eje "y" absorbancia y en el eje "x" tiempo de incubación en horas (absorbancia vs tiempo). En una gráfica se observará el efecto de la temperatura y en otra el efecto del pH sobre el crecimiento bacteriano.
- C. De la misma forma haga una gráfica UFC/mL vs tiempo.

Cuestionario

1. ¿Por qué se utiliza un cultivo de 18 horas de crecimiento de *Escherichia coli*?
2. ¿Cuáles son los agentes físicos y químicos que modifican el tiempo de generación de bacterias y levaduras?
3. ¿Qué es un Nefelómetro de MacFarland ?
4. Escriba la expresión matemática del crecimiento bacteriano y su significado.

Bibliografía

-  Bell, C., Neaves, P., Williams, A. P. Food microbiology and laboratory practice. Blackwell Publishing. Oxford. 2005.
-  Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª edición. El Manual Moderno. México. 2007.
-  Lim, D. Microbiology. 3rd edition. Kendall/Hunt Publishing Company. Dubuque. 2003.
-  Madigan, M. T. & Martinko, J. M. Brock biology of microorganisms. 11th edition. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River. 2006.
-  Race McCormick, T. R. The essentials of microbiology. Research & Education Association. Piscataway. 2001.

Práctica 6

Sensibilidad bacteriana ante los antibióticos (antibiograma)

Objetivo

El alumno conocerá y practicará algunos métodos para poner de manifiesto la actividad de los antibióticos sobre el crecimiento bacteriano.

Introducción

El tratamiento de una infección requiere el conocimiento no sólo del microorganismo que la produce, sino también de su sensibilidad a los agentes antimicrobianos.

Los antibióticos son sustancias producidas por microorganismos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. De acuerdo con su efecto sobre la viabilidad de las bacterias, se consideran bactericidas cuando destruyen a las bacterias y bacteriostáticos cuando impiden su división celular.

Los antibióticos pueden actuar a través de los siguientes mecanismos de acción:

1. Inhibición de la síntesis de pared celular
2. Inhibición de la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN)
3. Inhibición de la síntesis de proteínas
4. Alteración de la función de la membrana celular
5. Interferencia metabólica

Existen varios métodos para determinar la sensibilidad de un microorganismo ante un antibiótico, entre ellos destacan el de las diluciones y el de difusión. Las técnicas de dilución se utilizan para obtener datos cuantitativos de sensibilidad y pueden realizarse en medios líquidos o en placas con medio sólido. En las pruebas de difusión se utilizan discos de papel filtro impregnados con una concentración conocida del antibiótico, el cual difunde en el agar y alcanza concentraciones que impiden el crecimiento bacteriano, el diámetro de la zona de inhibición está directamente relacionado con la capacidad germicida del antibiótico.

Material por grupo

Cepa Gram positiva:

Staphylococcus aureus

Cepas Gram negativas:

Salmonella sp.

Escherichia coli

- Solución de Penicilina de 400,000 UI/mL
- Multidiscos contra bacterias Gram positivas
- Multidiscos contra bacterias Gram negativas
- Nefelómetro de MacFarland
- Caldo Mueller-Hinton (MH)
- Agar Mueller-Hinton (Agar MH)
- Agar Infusión de Cerebro y Corazón (Agar BHI*)
- Cloruro de sodio
- Incubadora
- Balanza
- Regla graduada

* De sus siglas en inglés Brain Heart Infusion

Material por equipo

Material Estéril

- Pinzas
- 6 Cajas de Petri
- 2 Varillas de vidrio acodadas
- 2 Pipetas graduadas de 1 ml
- 10 Pipetas graduadas de 2 ml
- 2 tubos de 15 x 150 mm con 3 ml de caldo Mueller-Hinton
- 10 Tubos de ensayo de 15 x 150 mm con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- 6 tubos de 40 x 100 mm con 18 ml de Agar Infusión de Cerebro y Corazón (Agar BHI), fundido
- 2 Placas de agar Mueller-Hinton (Agar MH)

Material no estéril

- Gradilla
- Un mechero de Bunsen
- Una asa y porta asa
- Solución de Benzal 1:10,000

Desarrollo

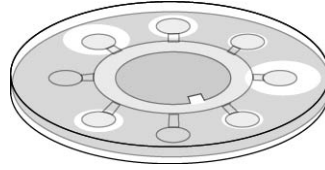
Método de Difusión

1. Se prepara un cultivo bacteriano de 18 horas en caldo Mueller-Hinton y se ajusta la concentración celular contra el tubo No. 1 de la escala del Nefelómetro de MacFarland.
2. Marcar dos placas de agar Mueller-Hinton. Colocar 0.1 ml de suspensión celular de *Staphylococcus aureus* en una placa y en la otra agregar 0.1 ml de *Salmonella* sp.
3. Sembrar las cepas por dispersión con una varilla de vidrio acodada como se muestra en el esquema 11.



Esquema 11. Sembrado por dispersión

- Con la ayuda de pinzas estériles colocar sobre la placa un multidisco contra bacterias Gram positivas o contra Gram negativas, presionando ligeramente para que la cepa y el disco entren en contacto. Ver esquema 12 y foto 11 del apéndice G.



Esquema 12. Antibiograma

- Incubar las placas a 37 °C de 18 a 24 horas.
- Reportar en el cuadro 7 el o los antibióticos que inhibieron la proliferación en cada placa y medir el diámetro de los halos de inhibición en mm.

Método de las diluciones

- Colocar en una gradilla 10 tubos de ensayo de 15 x 150 mm con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica estéril y marcarlos del 1 al 10.
- Agregar 0.5 ml de una solución de penicilina con 400,000 UI/mL al tubo 1, agitar y hacer diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-10} . Como se muestra en el cuadro 2 (Práctica 2).
- Colocar 2 ml de las diluciones 10^{-6} a 10^{-10} en cajas de Petri debidamente rotuladas y adicionar a cada una 18 ml de agar BHI estéril, mantenido a 42 °C, homogeneizar por rotación y dejar solidificar.
- Dividir cada caja en dos secciones, en una de ellas sembrar por estría continua *Staphylococcus aureus* y en la otra una cepa Gram positiva aislada en prácticas previas.
- Preparar como testigo una caja con medio de cultivo sin antibiótico y sembrar las bacterias en la forma mencionada anteriormente.
- Envolver las cajas de Petri e incubar invertidas a 37 °C durante 24 horas.
- Reportar en el cuadro 8 ausencia o presencia de crecimiento.

Reporte

Cuadro 7. Diámetro del halo de inhibición del crecimiento en mm

Antibiótico		<i>Salmonella sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ceftazidima 30 µg	CAZ		
Cefuroxima 30 µg	CXM		
Dicloxacilina 1 µg	DC		
Eritromicina 15 µg	E		
Penicilina 10 UI	PE		
Tetraciclina 30 µg	TE		
Ampicilina 10 µg	AM		
Cefalotina 30 µg	CF		
Cefotaxima 30 µg	CTX		
Gentamicina 10 µg	GE		
Pefloxacina 5 µg	PEF		
Trimetoprim Sulfametoxazol 25 µg	SXT		
Amikacina 30 µg	AK		
Carbenicilina 100 µg	CB		
Celtriaxona 30 µg	CRO		
Cloranfenicol 30 µg	CL		
Netimicina 30 µg	NET		
Nitrofurantoina 300 µg	NF		






Cuadro 8. Actividad de penicilina en placas de agar

No. DE PLACA	DILUCIÓN DE PENICILINA	INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	Cepa Gram positiva
1	10 ⁻⁶		
2	10 ⁻⁷		
3	10 ⁻⁸		
4	10 ⁻⁹		
5	10 ⁻¹⁰		
6	sin antibiótico		

Cuestionario

1. Explique la diferencia entre antibiótico y quimioterapéutico.
2. Describa el mecanismo de acción de los antibióticos utilizados en la práctica.
3. Mencione las características deseables para un antibiótico y que es un antibiótico de amplio espectro.
4. Mencione tres géneros bacterianos que son productores de antibióticos.
5. De acuerdo con sus resultados y con los efectos adversos que tienen los antibióticos. ¿Cuáles son los antibióticos de elección para eliminar a los microorganismos sembrados?

Bibliografía

-  Gladwin, M., Trastler, B. Clinical microbiology. 3rd edition. MedMaster, Inc. Miami. 2001.
-  Pommerville, J. C. Alcamo's laboratory fundamentals of microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. 2007.
-  Tortora, J. G., Funke, B. R. and Case, C. L. Microbiology. An introduction. 9th edition. Pearson Benjamin. San Francisco. 2007.
-  Wanger, A. Antibiotic susceptibility testing. En: Goldman, E., Green, L. H. (Eds.). Practical handbook of microbiology. 2nd edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2009.
-  Weeks, B. S. & Alcamo, I. E. Microbes and society. 2nd edition. Jones and Barlett Publishers. Sudbury. 2008.

Práctica 7

Aislamiento de hongos microscópicos

Objetivo

El alumno conocerá las técnicas más comunes para el aislamiento de hongos a partir de diferentes hábitats.

Introducción

Los hongos son organismos eucarióticos pertenecientes al reino fungi de la clasificación de Whittaker, son aerobios o anaerobios facultativos, su hábitat natural es el suelo, agua y restos orgánicos en descomposición, no son fotosintéticos, se nutren como saprófitos, algunos son parásitos o patógenos.

Los hongos secretan enzimas extracelulares que transforman a una gran variedad de sustratos orgánicos en nutrientes solubles, los cuales pasan a la célula por absorción o transporte activo. Es debido a la producción de enzimas extracelulares que los hongos microscópicos representan un verdadero problema para el hombre y su economía, ya que pueden atacar y degradar granos, frutas, jugos, leches descremadas, pieles, etc., algunos infectan al hombre y a varias especies animales. Por otra parte, el cultivo de hongos se ha utilizado en beneficio del hombre para la obtención de antibióticos, enzimas y otros metabolitos de importancia clínica o industrial.

Con base en lo anterior es necesario conocer los métodos de cultivo e identificación de hongos para su control, erradicación o propagación según sea el caso.

Material por grupo

- Agar Infusión de Cerebro Corazón (Agar BHI*)
- Agar Dextrosa Sabouraud (ADS)
- Incubadora a 28 °C
- Autoclave
- Solución de Azul de Algodón-Lactofenol
- Portaobjetos y cubreobjetos desengrasados
- Solución de antibióticos (10⁴ UI/mL de Penicilina y 10⁴ µg/mL de Estreptomina)

Material por equipo

Material Estéril

- Una placa de Agar Infusión de Cerebro Corazón con antibióticos (1% de solución de antibióticos)
- 2 Placas de Agar Dextrosa Sabouraud con antibióticos o Agar Micobiótico
- Un tubo de Agar Dextrosa Sabouraud inclinado
- 2 Placas de Agar Dextrosa Sabouraud

Material no estéril

- Muestra biológica: jitomate, fruta o tortillas con hongos
- Mechero de Bunsen
- Microscopio óptico
- Asa micológica y porta asa
- Solución de Fenol al 4%

* De sus siglas en inglés **B**rain **H**eart **I**nfusion

Desarrollo

Método de siembra para el aislamiento de hongos a partir de una muestra

1. En condiciones de esterilidad, tomar una asada de la colonia del hongo presente en la muestra y sembrarla por estría cruzada en placas de ADS y en BHI ambas con antibióticos e incubar a 28 °C durante 24 horas.
2. Al término de la incubación, seleccionar una colonia que se encuentre aislada y resembrarla en ADS en placa y en tubo por la técnica de punto.

Técnica de sembrado por punto (en tubo o placa)

- a) Esterilizar el asa micológica.
 - b) Tomar una pequeña muestra de la colonia con la punta del asa.
 - c) Presionar ligeramente la punta del asa contra el medio en el que se quiere resembrar en placa o en tubo.
3. Incubar a 28 °C de 24 a 48 horas.
 4. Observar morfología colonial del crecimiento obtenido.
 5. Verificar la pureza de la colonia mediante una observación en fresco por la técnica de montaje directo. En caso de presentarse contaminación repetir el procedimiento desde el punto 1.

Técnica de montaje directo

- a) Colocar una gota de azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos.
- b) Remover una pequeña porción de la colonia del hongo, en condiciones de esterilidad y colocarla en la gota del colorante.
- c) Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio a 10x ó 40x.

Aislamiento de hongos contaminantes ambientales

1. Utilizar dos cajas de Petri con Agar Dextrosa Sabouraud con Antibióticos o Agar Micobiótico.
2. Destapar solo una de las cajas y dejarla expuesta a diferentes ambientes (pasillos, jardines, cafetería, biblioteca, etc.) después de 10 minutos tapparla.
3. Incubar ambas cajas a temperatura ambiente durante 3 a 5 días. La caja que no se destapó servirá como testigo.

Reporte

1. Observe la morfología colonial de las cepas aisladas por sembrado en punto y la de las colonias desarrolladas en la caja expuesta al ambiente que se le haya designado, repórtelas siguiendo el formato del cuadro 9.

Cuadro 9. Resumen de resultados




	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
COLOR EN EL ANVERSO DE LA COLONIA			
COLOR EN EL REVERSO DE LA COLONIA			
DIÁMETRO DE LA COLONIA (mm)			
ESQUEMA			
NOMBRE PRESUNTIVO			

2. Mencione el número de colonias desarrolladas en las placas expuestas al medio ambiente y compare los resultados obtenidos en las placas expuestas a ambientes diferentes al asignado a usted.
3. Mencione otras características morfológicas que son de utilidad en la identificación colonial de hongos.

Cuestionario

1. Mencione las diferencias fundamentales entre un mohó y una levadura.
2. ¿Cuáles son las estructuras morfológicas de un mohó y cuál es su función?
3. Los mohos y levaduras también se pueden cultivar en medios líquidos (caldo). Mencione cual es la finalidad de este tipo de cultivo y como se valora el crecimiento del hongo.

Bibliografía

-  Maheshwari, R. Fungi. Experimental methods in biology. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2005.
-  Van, E. J. D., Jansson, J. K., Trevors, J. Y. (Eds.). Modern soil microbiology. 2nd edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2007.
-  Voss, K. A., Riley, R. T., Galineau-van Waes, J. B. Toxicity of fumonisis, mycotoxins from *Fusarium verticillioides*. En: Wilson, C. L. (Ed.). Microbial food contamination. 2nd edition. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2008.

Práctica 8

Identificación macroscópica y microscópica de hongos

Objetivo

El alumno aprenderá a identificar los hongos por su morfología colonial y microscópica.

Introducción

Los hongos son organismos ampliamente distribuidos en el ambiente, presentan reproducción sexual o asexual y crecen en forma de levaduras o de mohos. Las levaduras se desarrollan como organismos unicelulares o pluricelulares, la mayoría produce colonias cremosas de tamaño definido similar al de las colonias bacterianas, mientras que los mohos desarrollan colonias algodonosas, esponjosas o granuladas formadas de largos filamentos llamados hifas que pueden o no estar segmentados. El conjunto de hifas forman el micelio vegetativo y aéreo, el primero sirve al hongo para fijarse al sustrato y el segundo se encuentra en o sobre la superficie del medio de cultivo y lleva en la zona apical las esporas, que son las estructuras de reproducción, por lo que también se le conoce como micelio reproductor.

En algunos hongos las esporas están agrupadas en sacos (esporangiosporas) o libres sobre cuerpos carnosos y se les conoce como conidiosporas.

Los hongos pertenecen al reino fungi de la clasificación de Kendrick (2002). En el cuadro 10 se muestran las diferentes clases de hongos pertenecientes a la División Eumycota, sus características de crecimiento y tipo de reproducción.

Cuadro 10. Principales familias y sus características

CLASE	CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO	REPRODUCCIÓN ASEJUAL	REPRODUCCIÓN SEXUAL
Chytridiomicetos	Hifas no septadas (cenocíticas)	Esporas monoflageladas ZOOSPORAS	CHITIDIOSPORAS Gametos móviles
Zygomycetos	Hifas no septadas (cenocíticas)	Esporas encerradas ESPORANGIOSPORAS	ZIGOSPORAS
Ascomicetos	Hifas septadas	Esporas libres CONIDIOSPORAS	ASCOSPORAS
Basidiomicetos	Hifas septadas	Esporas exógenas FRAGMENTACIÓN	BASIDIOSPORAS

La presencia de hongos en un material determinado se establece mediante el examen directo de las muestras y su cultivo en Agar Dextrosa Sabouraud (ADS), Papa Dextrosa Agar (PDA) o Agar Rosa de Bengala.

Para la identificación microscópica de hongos se realizan preparaciones que se tiñen con la solución de azul de algodón-lactofenol, se observa en ellas la morfología de esporas y de micelio, además de estructuras especiales o características del hongo.

Material por grupo

- Cepas puras obtenidas de la práctica anterior
- Incubadora a 28 °C
- Agar Dextrosa Sabouraud (ADS)
- Solución de azul de Algodón-Lactofenol
- Portaobjetos y cubreobjetos desengrasados
- Cinta adhesiva transparente e incolora

MATERIAL POR EQUIPO

Material estéril

- Una placa de Agar Dextrosa Sabouraud (ADS)
- Una pipeta de 10 ml
- Pinza y Bisturí
- Solución de glicerol al 10%
- Un sistema para microcultivo (Caja de Petri con portaobjetos y cubreobjetos descansados sobre una varilla de vidrio acodada). Ver esquema 14

Material no estéril

- Puente de tinción
- Asa y porta asa
- Un mechero de Bunsen
- Microscopio óptico
- Microscopio estereoscópico
- Solución de fenol al 5%

Desarrollo

Para identificar a los hongos por su morfología microscópica se hacen preparaciones por montaje directo, montaje con cinta adhesiva y microcultivo.

1. Técnica de montaje directo

- Colocar una gota de azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos.
- En condiciones de esterilidad tomar con el asa una pequeña porción de la colonia del hongo y colocarla en la gota del colorante.
- Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio con objetivos de 10x ó 40x.

2. Técnica de montaje con cinta adhesiva

Este método permite observar la mayoría de las estructuras reproductivas sin alterar la morfología del hongo, sin embargo, **no es recomendable realizarlo para hongos provenientes de muestras clínicas.**

- Colocar una gota de solución de azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos.
- Cortar una tira de 9 cm de cinta adhesiva, tomarla por los extremos con una pinza de tal forma que el lado adhesivo quede al exterior. Ver esquema 13.



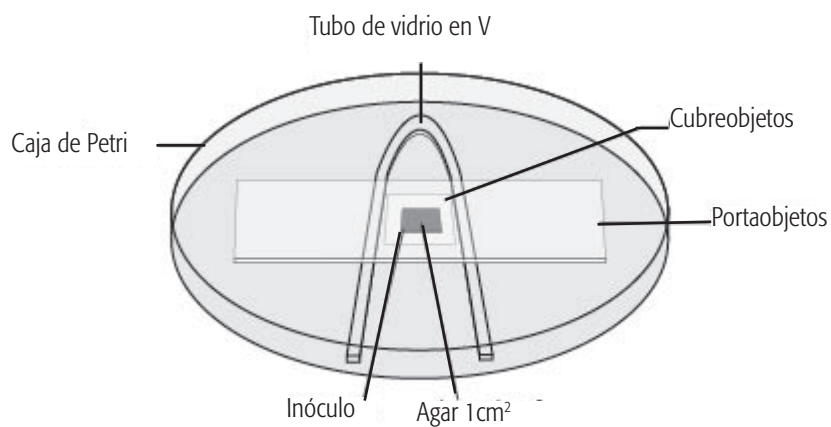
Esquema 13. Montaje con cinta adhesiva

- c) En condiciones de esterilidad presionar suavemente el lado adhesivo de la cinta contra la superficie de la colonia, depositar sobre el portaobjetos que contiene el colorante y presionar con un algodón para que la cinta se adhiera al portaobjetos.
- d) Observar al microscopio con los objetivos de 10x ó 40x, en caso necesario utilizar el objetivo 100x.

3. Técnica de microcultivo

Esta técnica se recomienda para observar esporas e hifas sin alterar la morfología macroscópica y microscópica *in situ*. Se recomienda también como método de mantenimiento permanente de hongos purificados.

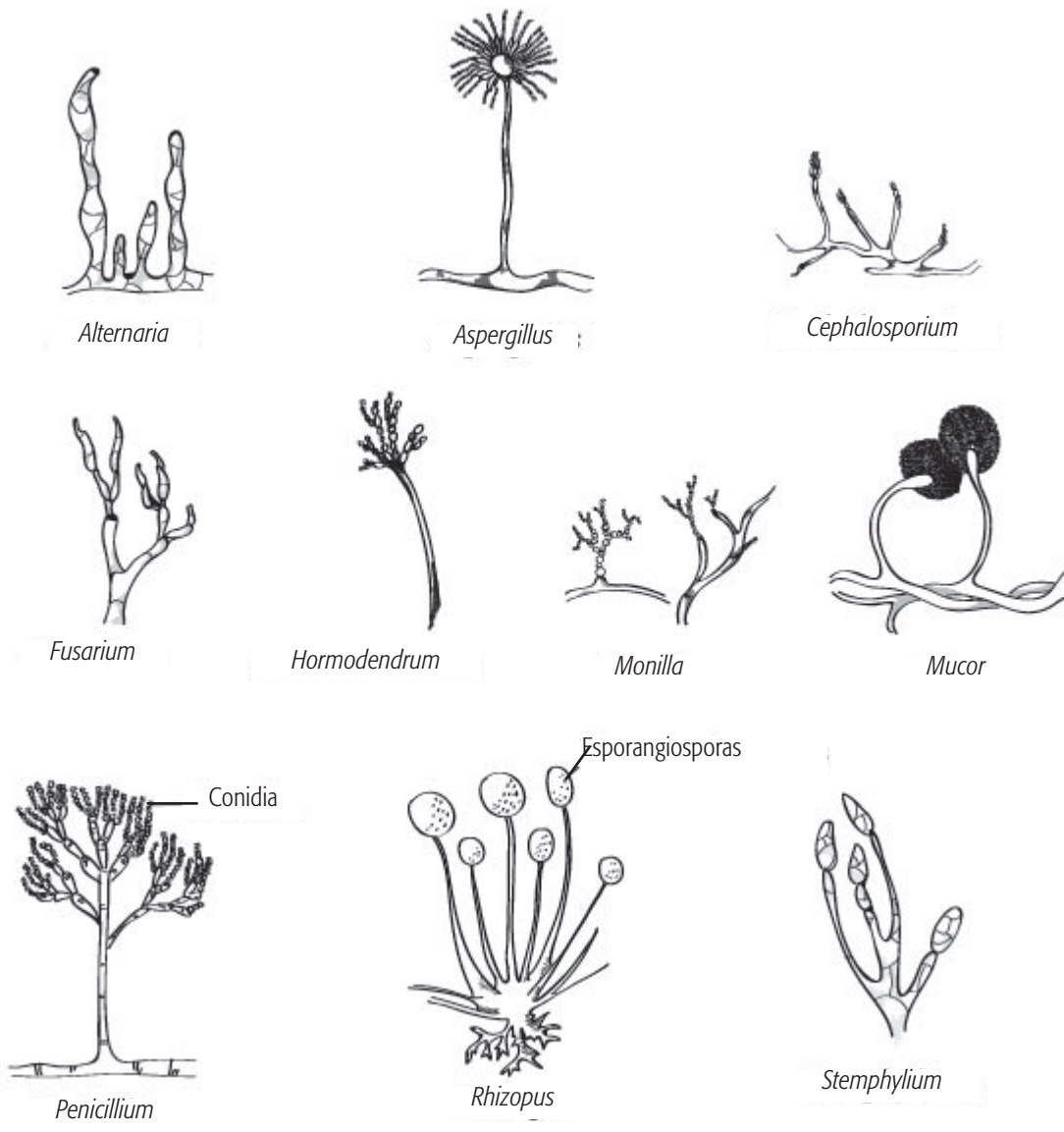
- a) Con un bisturí estéril cortar una pieza de 1 cm² del medio ADS, depositarla sobre el portaobjetos del aditamento para microcultivo.
- b) Con pinzas estériles colocar sobre el cubo de agar un cubreobjetos estéril.
- c) Sembrar por picadura los cuatro costados de este agar con la colonia de hongo que se desea estudiar. Ver esquema 14.
- d) Adicionar a la caja de Petri 10 ml de solución acuosa de glicerol al 10%, colocar la cubierta de la caja e incubar a temperatura ambiente durante siete días.
- e) Después de la incubación, observar al microscopio estereoscópico las colonias desarrolladas.
- f) Colocar una gota de solución de azul de algodón-lactofenol en un portaobjetos.



Esquema 14. Sistema de Microcultivo

- g) En condiciones de esterilidad, retirar el cubreobjetos del microcultivo y colocarlo sobre el portaobjetos con la gota de colorante.
- h) Observar al microscopio con objetivos de 10x y 40x la morfología de esporas, hifas, micelio, etc.

Tomando como guía el esquema 15 y los atlas de micología proporcionados por los profesores o los disponibles en la biblioteca, identifique los hongos aislados.



Esquema 15. Morfología microscópica de hongos

Reporte

- Haga esquemas de los hongos observados al microscopio y realice su reporte siguiendo el formato del cuadro 11. Para la identificación será necesario considerar tanto la morfología colonial como la microscópica.

Cuadro 11. Resumen de resultados





ESTRUCTURAS MICROSCÓPICAS	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
TIPO DE MICELIO			
TIPO DE ESPORAS			
COLOR DE ESPORAS			
ESTRUCTURAS ESPECIALES			
ESQUEMA INTEGRAL			
NOMBRE PRESUNTIVO			

- Mencione los cuidados que se deben tener para el mantenimiento de los microcultivos.

Cuestionario

1. Defina los siguientes conceptos: a) Hongos dimórficos y hongos oportunistas.
2. Haga esquemas de clamidosporas, artrosporas y blastosporas. Dé dos ejemplos de hongos que presenten estas estructuras.
3. Mencione las modificaciones necesarias para hacer del agar nutritivo un medio selectivo para el crecimiento de hongos.
4. ¿Cuáles son las familias de hongos patógenos para el hombre?
5. ¿Cuáles son los hongos que infectan a la papa y al maíz?
6. Investigación bibliográfica e importancia de uno de los hongos identificados.

Bibliografía

-  Beneke, E. S. and Rogers, A. L. Medical micology manual. 3rd edition. Burgess Publishing Company. Michigan. 1970.
-  Hazen, E. S., Gordon, M. A. and Reed, F. C. Laboratory identification of pathogenic fungi simplified. 3rd edition. Charles, C. Thomas Publishers. Springfield. 1973.
-  López, M. R., Méndez, T. L., Hernández, H. F. y Castañón, O. R. Micología médica. Procedimiento para el diagnóstico de laboratorio. 2^a Edición. Editorial Trillas. México. 2004.
-  Maheshwari, R. Fungi experimental methods in biology. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2005.

Práctica 9

Titulación de fagos

Objetivo

El alumno observará y cuantificará el efecto lítico del fago T_6 en un cultivo de *Escherichia coli*.

Introducción

Los virus son agentes infecciosos que actúan como transmisores de enfermedad o de herencia, en el primer caso, producen cambios perjudiciales en la célula hospedera dando lugar a alteraciones de las funciones celulares o la muerte. Como agentes transmisores de la herencia producen cambios en la información genética de la célula, siendo generalmente benéficos para las bacterias.

Los virus bacterianos llamados también bacteriófagos no se diferencian mucho de otros virus; su material genético está rodeado de una cubierta proteínica y la mayoría presenta un apéndice a manera de cola a través del cual inyecta su ácido nucleico a la célula hospedera.

De acuerdo con su efecto en la célula huésped se conocen dos tipos de virus bacterianos: el temperado (lisogénico) avirulento y el lítico o virulento. Con el tipo temperado se presenta un estado de latencia o lisogenia y la infección no suele hacerse aparente, en cambio cuando los fagos líticos infectan a las células, éstas producen nuevos viriones y finalmente estallan causándoles la muerte y la liberación de nuevos fagos infecciosos.

Material por grupo

- Cepa de *Escherichia coli* KL16
- Suspensión del fago T_6
- Agar Bacteriológico
- Agar Infusión Cerebro y Corazón (Agar BHI*)
- Autoclave
- Balanza granataria
- Caldo de Infusión Cerebro y Corazón (BHI*)
- Cloroformo
- Cloruro de sodio
- Contador de bacterias tipo Quebec
- Incubadora con agitación
- Probeta de 200 ml

Material por equipo

Material estéril

- 6 tubos de ensayo de 12 x 120 mm con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- Un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con 5 ml de Infusión Cerebro Corazón
- 2 tubos de vidrio de 25 ml para centrifuga, con tapón de rosca
- 2 tubos de 12 x 120 mm con tapón de rosca
- 5 tubos de ensayo de 13 x 100 mm con 3 ml de agar Infusión Cerebro Corazón al 0.75% fundido. (Agar BHI 0.75%)
- 5 cajas de Petri con Agar BHI
- 5 pipetas graduadas de 1 ml (1/100)
- 5 pipetas graduadas de 2 ml (1/100)
- Una pipeta graduada de 5 ml (1/10)

Material no estéril

- Un mechero de Bunsen
- Solución de Benzal 1:10,000
- Una gradilla
- Una propipeta

* De sus siglas en inglés **B**rain **H**eart **I**nfusion

Desarrollo

A) Propagación de bacteriófagos

1. En condiciones de esterilidad, inocular 5 ml del medio infusión cerebro corazón con la cepa de *Escherichia coli* KL16 e incubar a 37 °C durante 18 horas.
2. Mezclar 2 ml del cultivo anterior con 0.5 ml de la suspensión de fagos T₆ e incubar a 37 °C con agitación constante hasta que el cultivo de células pierda turbidez (aproximadamente 3 horas), en seguida adicionar 0.2 ml de cloroformo y centrifugar a 3,500 g durante 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Recuperar el sobrenadante por decantación en un tubo de ensayo estéril y eliminar el sedimento.

B) Titulación de fagos

1. A partir del sobrenadante obtenido en el punto anterior hacer diluciones decimales de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en tubos con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica, como se muestra en el cuadro 12.

Cuadro 12. Dilución de bacteriófagos

TUBO	1	2	3	4	5	6
Solución Salina Fisiológica	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml	4.5 ml
Sobrenadante con fagos	0.5 ml	–	–	–	–	–
Volumen de transferencia	–	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
DILUCIÓN	10⁻¹	10⁻²	10⁻³	10⁻⁴	10⁻⁵	10⁻⁶

2. En una gradilla colocar cinco tubos con tapón de rosca estériles con 3 ml de agar BHI al 0.75%, manteniéndolos en baño maría a 40 °C.
3. Depositar en uno de los tubos 0.1 ml de la dilución 10⁻⁴ y 0.1 ml del cultivo de *Escherichia coli* sin infectar, mezclar y verter en una caja de Petri con Agar BHI solidificado.
4. Repetir el punto 3 con las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶. Etiquetar las cajas de Petri.
5. En los dos tubos restantes se colocan 0.2 ml de *Escherichia coli* y 0.2 ml de la suspensión de fagos, respectivamente.
6. Incubar las cajas de Petri invertidas durante 18 horas a 37 °C y contar el número de placas líticas en las diluciones 10⁻⁴ a 10⁻⁶.





Reporte

1. Registre el número de placas líticas en cada una de las diluciones.
2. Calcule la concentración de fagos/mL en la suspensión original.
3. Indique el título de los fagos.

Cuestionario

1. Describa brevemente el ciclo lítico y lisogénico de un bacteriófago.
2. Explique qué es una placa lítica y cómo se desarrolla.
3. ¿Cuáles son las aplicaciones prácticas de la titulación de bacteriófagos?

Bibliografía

-  Cann, J. A. Principles of molecular virology. 3rd edition. Academic Press. San Diego. 2001.
-  Dieckmann, T. & Zumwalt, M. Structure and dynamics in viral RNA packaging. En: Cheng, R. H. & Miyamura, T. (Eds.). Structure-based study of viral replication. World Scientific Publishing Co. Danvers. 2008.
-  Primrose, S. B. and Dimmock, B. J. Introduction to modern virology. Vol. 2. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1980.
-  Strohl, W. A., Rouse, H., Fisher, B. D. Microbiology. Lippincott's illustrated reviews. Harvey, R. A., Champe, P. A. (Eds.). Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 2001.

Práctica 10

Identificación de protozoarios

Objetivo

El alumno identificará los diferentes tipos de protozoarios con base en su movilidad y características morfológicas.

Introducción

Los protozoarios son organismos eucarióticos pertenecientes al reino Protozoa de Kendrick, unicelulares y aerobios. Pueden ser de vida libre o formar diferentes tipos de asociaciones con otros organismos. Su hábitat natural es el agua dulce, agua salada, lugares húmedos, suelo; algunos de ellos forman parte de la flora normal de animales. Obtienen sus nutrientes por ingestión (fagocitosis), su nutrición es heterótrofa ya que la mayoría carece de clorofila. Excepto los parásitos, la mayoría son saprófitos.

Los protozoarios presentan reproducción asexual o sexual, la primera por fisión, gemación o esquizogonia y la segunda por conjugación. Las amibas y otros protozoarios presentan las fases de trofozoito y la de quiste, la primera es un estado viable o forma activa, mientras que la segunda es una forma de resistencia ante la falta de nutrientes o presencia de los agentes externos físicos o químicos que amenazan la viabilidad del microorganismo.

Varias propiedades de los protozoarios son usadas en su clasificación, entre ellas; el método para la obtención de nutrientes, métodos de reproducción, organización celular y locomoción. La mayoría de los protozoarios de importancia médica o agrícola están incluidos en alguno de los siguientes phyla: Sarcomastigophora, Ciliophora, Apicomplexa y Microsporidia. Ver cuadro 13.

Cuadro 13. Características de los principales grupos de protozoarios

Phylum	Nombre común	Locomoción	Habitats
Sarcomastigophora	Flagelados	Flagelos	Agua fresca, algunos son parásitos
	Amibas	Pseudópodos	En agua fresca y marina, algunos son parásitos
Ciliophora	Ciliados	Cilios	
Apicomplexa	Esporozoarios	Generalmente inmóviles	Parásito de animales
Microspora	Microsporidios	No móviles	Parásito intracelular obligado

Material por grupo

- Preparaciones fijas de protozoarios
- Material Biológico:
Agua estancada, heces de perro, cultivo de amibas
- Algodón
- Barniz de uñas transparente
- Centrífuga clínica
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- 500 ml de Solución Salina Fisiológica (estéril)
- Solución de Formol al 10%
- Solución de Lugol al 2%
- Éter
- Gasa
- Papel para envoltura

Material por equipo

Material estéril

- 3 Pipetas Pasteur
- 50 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- Un tubo con tapón de rosca con 10 ml de Solución Salina Fisiológica
- 2 Tubos de centrifuga de 15 ml
- 2 Frascos de boca ancha de 250 ml
- Un embudo con gasa

Material no estéril

- Microscopio óptico
- Mechero de Bunsen
- Solución de Benzal 1:10,000
- Gradilla
- Una propipeta
- Matríz Erlenmeyer de 250 ml

Desarrollo

Observación de amibas

1. Con una pipeta Pasteur deposite una gota del cultivo de amibas (proporcionado por el profesor) en un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar sobre la muestra un cubreobjetos deslizándolo hacia abajo.
2. Para evitar la pérdida de humedad, sellar los bordes de la preparación con barniz de uñas transparente y examinar al microscopio con objetivos 10x y 40x.
3. Utilice como guía para la identificación el esquema 16.

Procesamiento de muestras

Agua estancada

Centrifugar la muestra a 2,000 rpm durante cinco minutos, eliminar el sobrenadante por decantación y colocar una gota del sedimento en un portaobjetos, colocar un cubreobjetos y observar la preparación a 10x y 40x.

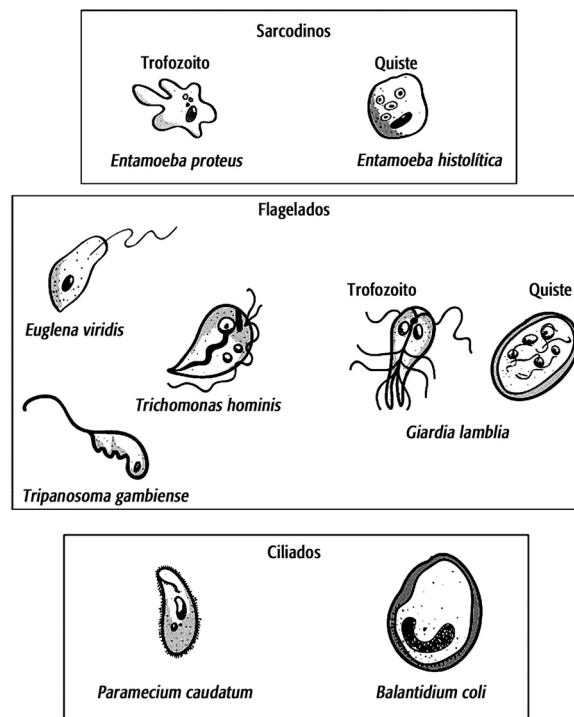
Heces de perro

Las muestras fecales frecuentemente contienen escaso número de protozoarios, por lo que es necesario concentrar la muestra para detectar la presencia de estos microorganismos. Los métodos más comúnmente usados para tal propósito son el de flotación y el de sedimentación, este último se utilizará en la práctica.

Método de Sedimentación

1. Colectar la muestra en un frasco limpio de boca ancha.
2. Suspender una porción de materia fecal del tamaño de una nuez en 10 ml de solución salina fisiológica y mezclar por agitación.
3. Filtrar la suspensión anterior a través de una gasa colocada sobre un embudo y recibir el filtrado en un tubo de centrifuga de 15 ml.

4. Centrifugar a 2,000 rpm durante dos minutos.
5. Decantar el sobrenadante y lavar el sedimento con 10 ml de solución salina fisiológica, centrifugar nuevamente y repetir este punto dos veces más.
6. Decantar el último sobrenadante y al sedimento añadir 10 ml de formol al 10%, mezclar y dejar en reposo durante cinco minutos.
7. Añadir 1 ml de éter, tapar el tubo y agitar vigorosamente (destapar el tubo para igualar presiones).
8. Centrifugar a 1,500 rpm durante dos minutos, eliminar con pipeta Pasteur el sobrenadante.
9. Resuspender el sedimento en el líquido remanente y transferir una gota a un portaobjetos que contiene por separado una gota de solución salina y otra de lugol al 2%.
10. Colocar un cubreobjetos y examinar al microscopio a 10x y 40x.
11. Auxiliándose del esquema 16 y atlas de parasitología para la identificación de los microorganismos, hacer esquema de los protozoarios observados.



Esquema 16. Algunos protozoarios más comunes




Reporte

Haga esquemas de los especímenes observados en las diferentes muestras.

Cuestionario

1. ¿Qué información se obtiene de una preparación en fresco y de una preparación fija?
2. Mencione el género y especie de protozoarios no parásitos de cada clase.
3. Liste el género y especie de dos parásitos patógenos de cada clase.
4. Mencione tres protozoarios causantes de infecciones intestinales.
5. ¿Cuáles son los protozoarios asociados con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida?

Bibliografía

-  Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª edición. El Manual Moderno. México. 2008.
-  Campbell, N. A., Williamson, B., Heyden, R. J. Biology. Exploring life. Pearson Prentice Hall. Upper Saddle River. 2004.
-  Sadava, D., Hillis, D. M., Heller, H. C., Berenbaum, M. R. Life. The science of biology. 9th edition. Gordonsville. 2011.

Aislamiento y cultivo de bacterias anaerobias

Objetivo

El alumno conocerá los medios y métodos de cultivo para el aislamiento de bacterias anaerobias.

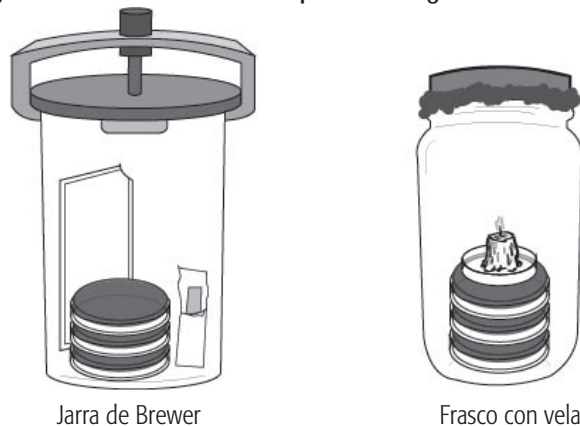
Introducción

Las bacterias anaerobias frecuentemente colonizan el cuerpo humano y causan infecciones severas. Los microorganismos anaerobios estrictos no forman colonias en presencia del oxígeno, para cultivarlos se emplean medios de cultivo con agentes reductores como el tioglicolato de sodio, que se combina con el oxígeno disuelto y lo elimina del medio de cultivo.

Cuando los microorganismos anaerobios son cultivados en cajas de Petri, el oxígeno es eliminado mediante la incubación de las cajas en una jarra de Brewer sellada, que contiene Bicarbonato de sodio, Borohidruro de sodio y agua (Sistema Gas Pak).

La anaerobiosis también se puede generar quemando una vela dentro de un frasco de vidrio en el cual se han colocado previamente las cajas de Petri sembradas. En la figura 3 se muestran ambos sistemas.

Figura 3. Sistemas de incubación para microorganismos anaerobios



Jarra de Brewer

Frasco con vela

Material por grupo

Cultivo de 24 horas de:

- *Bacillus* sp
- *Clostridium* sp
- Muestra de suelo
- Caldo Tioglicolato
- Balanza granataria
- Baño maría
- Incubadora a 37 °C
- Jarra para anaerobiosis
- Equipo para tinción de Gram y de esporas.
- Portaobjetos desengrasados
- Cloruro de sodio

Material por equipo

Material Estéril

- Un tubo con Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- 2 Tubos con 5 ml de Caldo Tioglicolato
- 4 Cajas de Petri con el medio de caldo tioglicolato adicionado de Agar al 1%. (Agar Tioglicolato)

Material no estéril

- Gradilla
- Una asa y porta asa
- Un mechero de Bunsen
- Solución de Benzal 1:10,000
- Un frasco de 250 ml
- Un microscopio óptico

Desarrollo

Aislamiento de bacterias anaerobias a partir del suelo

1. Colectar la muestra de suelo en un frasco limpio y seco.
2. Pesarse un gramo de la muestra y adicionar a un tubo de ensayo que contenga 5 ml de agua destilada o solución salina fisiológica estéril, agitar vigorosamente y dejar sedimentar durante 10 minutos.
3. Tomar una asada del sobrenadante y sembrar por estría cruzada en una caja de Petri con Agar Tioglicolato. Etiquetar la caja.
4. Agitar nuevamente el tubo que contiene la muestra de suelo y calentar a ebullición durante 10 minutos.
5. Dejar sedimentar 10 minutos y tomar una asada del sobrenadante para sembrar una caja de Petri con Agar Tioglicolato. Etiquetar la caja.
6. Incubar a 37 °C las cajas en posición invertida durante 48 horas en una jarra de anaerobiosis.
7. Sembrar por separado en Agar Tioglicolato cepas de *Clostridium* sp y de *Bacillus* sp. como testigos e incubar junto con las placas anteriores.
8. Preparar frotos de las colonias desarrolladas y teñir por el método de Gram. En caso necesario hacer la tinción para organismos esporulados.

Cultivo de microorganismos anaerobios en medio líquido

Colocar 0.5 ml del sobrenadante del paso 5 en un tubo con Caldo Tioglicolato, en un segundo tubo con el mismo medio inocularlo con una asada de un cultivo de 24 horas de *Clostridium* sp, incubar ambos tubos a 37 °C durante 24 horas. Preparar un frote, teñirlo por el método de Gram y observarlo al microscopio con el objetivo de inmersión.

Reporte

1. Describa la morfología colonial y microscópica de las colonias desarrolladas en las placas de Agar Tioglicolato. Siga el formato propuesto en el cuadro 14.

Cuadro 14. Resumen de resultados





COLONIA No.	GRAM	FORMA	ESTRUCTURAS ESPECIALES
1			
2			
3			
4			

2. Para las cepas sembradas en Caldo Tioglicolato describa la zona y tipo de crecimiento en el tubo.

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los microorganismos anaerobios que más frecuentemente infectan al hombre?
2. Mencione los sitios del cuerpo humano que son colonizados por los anaerobios patógenos.
3. Mencione otros métodos diferentes a los utilizados en la práctica para lograr la anaerobiosis en un cultivo líquido.
4. ¿Cuál es el propósito de sembrar la muestra antes y después del calentamiento a ebullición?
5. Mencione los microorganismos anaerobios que contaminan los alimentos y su importancia.

Bibliografía

-  Ahmad, F., Hughes, J. B., Bennett. Biodegradation of hazardous materials by clostridia. En: Dürrer, P. (Ed.). Handbook of Clostridia. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2005. 831-854.
-  Dürrer, P. The genus *Clostridium*. En: Goldman, E., Green, L. H. Practical handbook of microbiology. 2nd edition. CRC Press. Taylor and Francis Group. Boca Raton. 2009. 339-353.
-  Murray, R. P. and Citron, D. M. General processing of specimens for anaerobic bacteria. En: Hausler, Jr. W. J., Hermann, K. L., Isenberg, H. D. and Shadomy, H. (Eds.). Manual of clinical microbiology. 5th edition. American Society for Microbiology. Washington, D. C. 1995.
-  Tortora, J. G., Funke, B. R. and Case, C. L. Microbiology. An introduction, 9th edition. Pearson Benjamin. San Francisco. 2007.

Coeficiente fenólico

Objetivo

Evaluar la capacidad de un agente desinfectante en referencia al fenol.

Introducción

Los desinfectantes son descritos como agentes antimicrobianos usados sobre instrumentos o superficies estructurales. Si el desinfectante elimina los microorganismos se dice que ha habido una desinfección, si elimina también las estructuras de resistencia se logra la esterilización. Joseph Lister fue el primero que introdujo y practicó la cirugía aséptica en 1867 al usar ácido carbólico como germicida (fenol).

Actualmente, el fenol es usado como un agente químico de referencia para determinar la efectividad de otros desinfectantes, comparando su actividad germicida contra la del fenol. Para ello, se hacen diluciones del fenol para determinar cual de ellas mata al microorganismo en diez minutos pero no en cinco y se procede de manera similar con el desinfectante de prueba, la dilución del desinfectante que cumple esta condición es dividido por la dilución del fenol y el cociente resultante es llamado coeficiente fenólico.

Por ejemplo: si la dilución del fenol que mata en 10 pero no en 5 minutos es 1: 90 y la dilución del desinfectante de prueba que mata en 10 pero no en 5 minutos es 1: 450, el coeficiente fenólico será.

$$\text{Coeficiente Fenólico} = \frac{450}{90} = 5$$

La determinación del coeficiente fenólico debe hacerse con organismos de prueba estándar como *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis* o *Staphylococcus aureus*, si se usan otros microorganismos la comparación no es válida.

Material por grupo

- Cultivo de 24 horas de *Staphylococcus aureus*
- Agente desinfectante de prueba
- Agua destilada
- Fenol
- Una Probeta de 100 ml
- Dos Pipetas de 5 ml
- Incubadora a 37 °C
- Caldo Nutritivo
- Nefelómetro de MacFarland

Material por equipo

Material Estéril

- 20 Tubos de 16 x 150 mm
- 30 Tubos de 16 x 150 mm con 5 ml de caldo nutritivo
- 20 Pipetas de 5 ml

Material no estéril

- Un mechero de Bunsen
- Una Gradilla
- Solución de Benzal 1:10,000
- Propipeta
- Una asa con porta asa

Desarrollo

1. Preparar diluciones acuosas de fenol: 1:80, 1:90, 1:100, 1:110 y 1:120 y de un agente desinfectante proporcionado por el profesor
2. Se colocan en una gradilla 10 tubos de 16 x 150 mm y se rotulan del 1 al 10. En el tubo 1 se colocan 5 ml de la dilución de fenol 1:80, hacer lo propio con los tubos 2 al 5 en los que se depositan las diluciones de fenol 1:90, 1:100, 1:110 y 1:120, respectivamente.
3. En los tubos 6 al 10 depositar 5 ml de las diluciones correspondientes del agente desinfectante de prueba.
4. Paralelo a la primera serie de 10 tubos se colocan 2 series mas con caldo nutritivo. La segunda serie se rotula "5 minutos", la tercera "10 minutos".
5. Colocar 0.5 ml de un cultivo líquido de 24 horas de *Staphylococcus aureus* (ajustado a la concentración correspondiente al tubo No. 1 de la escala del Nefelómetro de MacFarland), a cada tubo de la primera serie y agitar inmediatamente.
6. A los 5 minutos tomar una asada de cada tubo de la 1ª serie e inocular en el tubo correspondiente de la 2ª serie.
7. A los 10 minutos tomar una asada de cada tubo de la 1ª serie e inocular en el tubo correspondiente de la 3ª serie. Ver cuadro 15.

Cuadro 15. Coeficiente fenólico

Tubo	1ª Serie	2ª Serie	3ª Serie
	DESINFECTANTE	5 MINUTOS	10 MINUTOS
1	FENOL 1:80		
2	FENOL 1:90		
3	FENOL 1:100		
4	FENOL 1:110		
5	FENOL 1:120		
6	Desinfectante 1:80		
7	Desinfectante 1:90		
8	Desinfectante 1:100		
9	Desinfectante 1:110		
10	Desinfectante 1:120		




8. Incubar la 2ª y 3ª serie de tubos a 37 °C durante 24 horas.
9. Registrar los resultados en los espacios correspondientes del cuadro anterior. Presencia de crecimiento (+) o ausencia de crecimiento (-), el crecimiento es interpretado por la turbidez desarrollada en el caldo.
10. Determinar las diluciones de fenol y del agente desinfectante que mataron a *S. aureus* a los 10 minutos pero no a los 5 minutos de exposición.
11. Calcular el coeficiente fenólico del agente desinfectante de acuerdo con la siguiente fórmula

$$\text{Coeficiente Fenólico} = \frac{\text{Factor de dilución del desinfectante que mata a los 10' pero no a los 5'}}{\text{Factor de dilución de fenol que mata a los 10' pero no a los 5'}}$$

Cuestionario

1. Exprese el coeficiente fenólico del agente desinfectante de prueba y su significado.
2. ¿Cuál es la importancia práctica de la determinación del coeficiente fenólico de un desinfectante?
3. ¿Por qué se toma en cuenta que el agente químico mate a los microorganismos a los 10 minutos pero no a los 5 minutos?

Bibliografía

-  Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A. Microbiología de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª edición. El Manual Moderno. México. 2008.
-  Challis, J. A. Sterilization, disinfection, and antisepsis. En: Goldman, E. & Green, L. E. (Eds.). CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. 2009. 3-10.
-  Jayababu, M. Introductory practical microbiology. Alpha Science International Ltd. Oxford. 2007.

Pasteurización

Objetivo

El alumno aprenderá uno de los métodos para efectuar la pasteurización de leche.

Introducción

La pasteurización fue desarrollada por Louis Pasteur en la década de 1850 para eliminar los microorganismos que perjudicaban la producción del vino y cerveza. En 1870 este método se aplicó a la leche para eliminar las bacterias patógenas, principalmente *Mycobacterium tuberculosis*.

La forma tradicional del método consiste en calentar la leche en un tanque a 62 °C durante 30 minutos y enfriarla inmediatamente en hielo, otro método consiste en hacer pasar el producto a través de un cilindro caliente a 71 °C durante 15 ó 17 segundos, este método es recomendable para muestras de leche con baja concentración de bacterias.

Un nuevo método llamado de ultrapasteurización (UP), consiste en calentar el producto entre 135 °C y 140 °C durante unos cuantos segundos, seguido de un brusco enfriamiento a temperaturas menores de 32 °C, utilizando ciclos más prolongados. Este proceso permite almacenar la leche hasta por 180 días en su envase cerrado, sin necesidad de refrigeración, aunque modifica ligeramente el sabor de la leche.

En cualquiera de sus modalidades la pasteurización no esteriliza al producto, ya que las bacterias termodúricas o esporuladas pueden sobrevivir. Sin embargo, sí destruye a las bacterias productoras de enfermedades que son transmitidas por la leche.

Material por grupo

- Leche contaminada con:
Escherichia coli
- Agar Nutritivo
- Cloruro de sodio
- Baño maría a 62 °C
- Baño de hielo
- Incubadora a 37 °C

Material por equipo

Material Estéril

- 20 Pipetas de 1 ml
- Un tubo de 16 x 150 mm con tapón de rosca
- 16 Tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 4.5 ml de Solución Salina Fisiológica (NaCl 0.85%)
- 12 Cajas de Petri con Agar Nutritivo
- 2 Varillas de vidrio acodadas

Material no estéril

- Una gradilla
- Un mechero de Bunsen
- Solución de Benzal 1:10,000
- Una propipeta
- Contador de colonias tipo Quebec

Desarrollo

Cuantificación de bacterias viables en leche contaminada con *Escherichia coli*.

1. Colocar en una gradilla ocho tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 x 150 mm que contengan 4.5 ml de solución salina fisiológica. Rotular los tubos del 1 al 8.
2. Adicionar al tubo uno 0.5 ml de leche, agitar y transferir 0.5 ml al tubo dos.
3. Repetir el paso anterior hasta llegar al tubo ocho, logrando con ello diluciones de 10^{-1} a 10^{-8} .
4. Colocar 0.1 ml de la dilución 10^{-8} en la superficie de una placa de Agar Nutritivo y sembrar por dispersión con una varilla de vidrio acodada, hacer lo propio con las diluciones 10^{-7} a 10^{-3} . Rotular las cajas con la dilución correspondiente.
5. Incubar las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 horas.
6. Contar el número de Unidades Formadas de Colonias (30 a 300 UFC) en cada placa contable.
7. Calcular UFC/0.1 mL de la leche contaminada. (Ver práctica 2).

Pasteurización de leche contaminada

Colocar un tubo con 10 ml de leche en un baño maría y calentar a 62 °C durante 30 minutos, transferir inmediatamente después a un baño de hielo y mantenerlo ahí hasta el momento de preparar las diluciones correspondientes para cuantificación de bacterias.

Cuantificación de bacterias viables en la leche pasteurizada

1. Colocar en una gradilla ocho tubos de ensayo con tapón de rosca de 16 x 150 mm que contengan 4.5 ml de solución salina fisiológica. Rotular los tubos del 1 al 8.
2. Realizar el mismo procedimiento indicado en los puntos 2 a 6 en la cuantificación de bacterias viables en la leche contaminada, en este caso utilizamos la leche pasteurizada.
3. Calcular UFC/0.1 mL de la leche pasteurizada. (Ver práctica 2).

Reporte

Anotar los resultados de la cuenta de bacterias viables llenando el cuadro 16. Compare sus resultados con los de otros equipos y discútalos.




Cuadro 16. Cuenta viable antes y después de la pasteurización de leche contaminada

	LECHE NO PASTEURIZADA	LECHE PASTEURIZADA
UFC/0.1 mL		
UFC/mL		

Cuestionario

1. ¿Qué productos alimenticios deben ser pasteurizados?
2. ¿Cuáles son los microorganismos que pueden ser transmitidos por la leche?
3. ¿Cuáles son los microorganismos que resisten la pasteurización?

Bibliografía

-  Mudili, J. Introductory practical microbiology. Alpha Science International Ltd. Oxford. 2007.
-  Pommerville, J. C. Alcamo's laboratory fundamentals of microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. 2007.
-  Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. Microbiology: An introduction. 9th edition. Pearson/Benjamin Cummings. San Francisco. 2007.

Apéndice A

Microscopía

Objetivo

El alumno revisará los conceptos básicos de microscopía aprendidos en cursos precedentes y conocerá las diferentes técnicas microscópicas empleadas en el estudio de los microorganismos.

Introducción

La tecnología moderna ha permitido a los microbiólogos el empleo de una amplia variedad de instrumentos para la observación de los microorganismos, entre ellos el microscopio de luz y el microscopio electrónico. Ambos operan bajo el mismo principio, la energía es proyectada hacia un objeto (microorganismo), sale del mismo y crea una imagen en un dispositivo sensible, el cual puede ser una pantalla de televisión, una película fotográfica o el ojo humano. La imagen revela la forma, tamaño y otras estructuras o características del espécimen observado.

Microscopio de luz

El sistema base del microscopio usado en el laboratorio de microbiología es el microscopio de luz o de campo claro, en el cual la luz pasa directamente a través de sus lentes hasta alcanzar el ojo del observador. También se le conoce como microscopio compuesto porque tiene dos sistemas de lentes, los objetivos y los oculares.

En la figura 4 se muestran los componentes del microscopio de luz y en el cuadro 17 las funciones de cada uno de ellos.

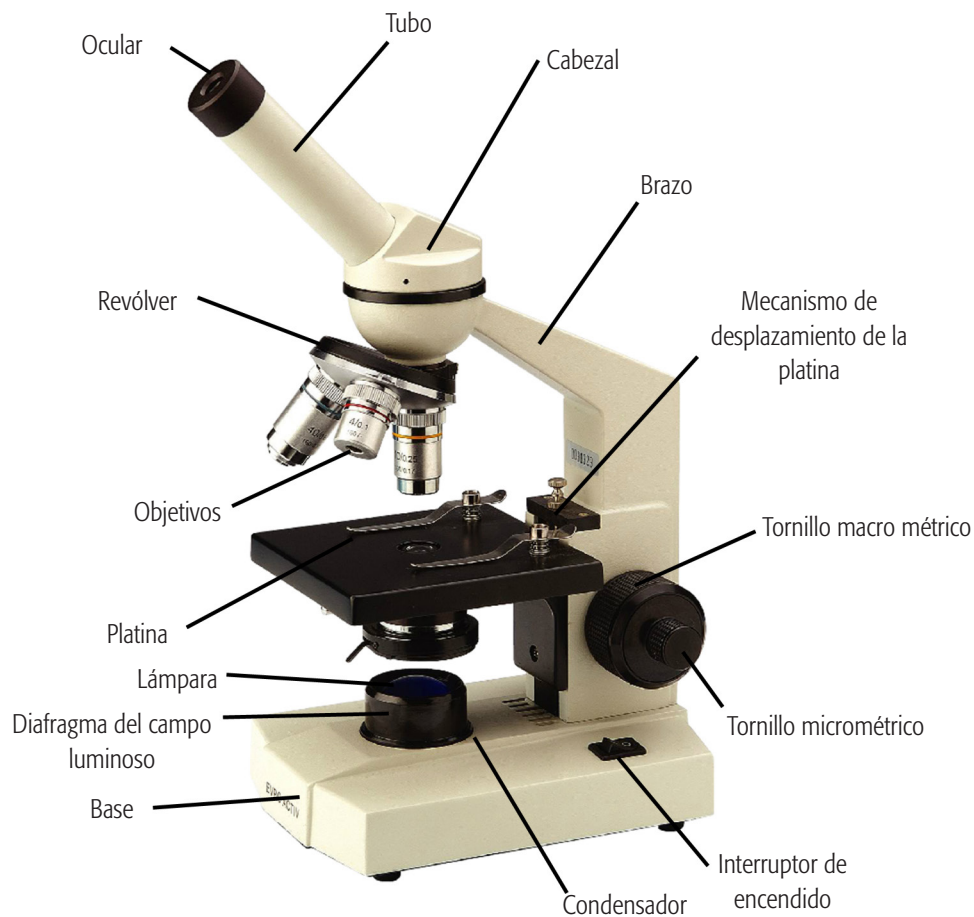


Figura 4.

Cuadro 17. Componentes del microscopio y sus funciones

Componentes	Funciones
Lentes oculares	Amplifican la imagen formada en los objetivos
Tubo	Transmite la imagen del objetivo al ocular
Revolver	Soporte rotatorio que permite el cambio de los objetivos
Objetivo	Lente primaria que aumenta la imagen del espécimen generalmente 10x, 40x y 100x (veces), conocidos como seco débil, seco fuerte e inmersión, respectivamente
Brazo	Soporte de la parte media superior del microscopio y conexión con la parte inferior
Platina	Soporte de la laminilla con el espécimen por analizar, puede tener pinzas para sujetar la laminilla o un sistema deslizable
Condensador	Condensa la luz en forma de cono para impedir que escape
Diafragma	Se abre y cierra para controlar la cantidad de luz que pasa al condensador
Filtro	Selecciona la luz que ilumina al espécimen
Tornillo macrométrico	Mueve el cuerpo del microscopio junto con la platina para tener enfoque aproximado
Tornillo micrométrico	Mueve el cuerpo del microscopio muy lentamente, proporciona una imagen definida
Fuente de luz	Lámpara, fuente luminosa
Base	Soporte o apoyo global del microscopio

En el microscopio, la luz se proyecta a través de un condensador, el cual la enfoca en forma de cono, la luz atraviesa una abertura en la platina y alcanza al portaobjeto con el espécimen formando una imagen magnificada, después la luz entra al objetivo y forma una imagen magnificada más oscura que el fondo, llamada imagen real debido a que puede ser proyectada en la pantalla. De esta manera la imagen se amplifica en dos ocasiones, la primera por el lente objetivo y la segunda por el lente ocular.

La amplificación total es determinada multiplicando el aumento del objetivo por el aumento del ocular. Así con objetivo de 10 y el ocular 10x, el aumento será 100x, con los objetivos de 40 y 100 será 400x y 1000x, respectivamente. En la figura 5 se muestra la trayectoria de la luz en el microscopio.

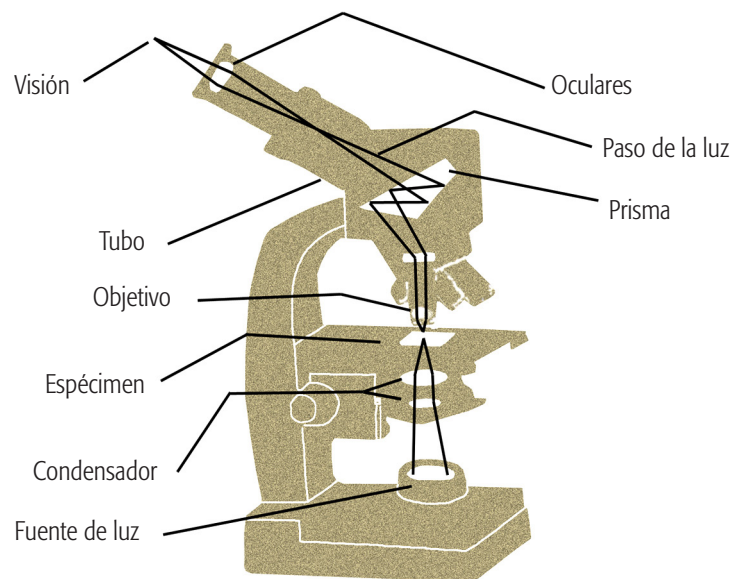


Figura 5. Trayectoria de la luz en el microscopio

Las lentes deben tener un buen poder de resolución, esto es, transmitir la luz sin alteración y capacidad para distinguir claramente dos puntos colocados a una distancia específica. El poder de resolución (PR) indica el tamaño del objeto más pequeño que se puede ver claramente, varía de un lente objetivo a otro y se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$PR = \frac{\lambda}{2 \times AN}$$

Lambda representa la longitud de onda y es usualmente de 550 nm, es el punto medio entre los límites de luz visible. AN significa la apertura numérica de las lentes. Este dato está impreso en el lente objetivo por el fabricante y se refiere al tamaño del cono de luz que entra al objetivo. Para un objetivo de 10x con apertura numérica de 0.25, el poder de resolución se calcula de la siguiente manera.

$$PR = \frac{550 \text{ nm}}{2 \times 0.25} = \frac{550 \text{ nm}}{0.50} = 1100 \text{ nm ó } 1.1 \mu\text{m}$$

Lo que significa que cualquier objeto más pequeño que 1.1 μm no puede ser visto, pero un objeto más grande sí.

Al aplicar la fórmula anterior a un objetivo de inmersión de apertura numérica de 1.25, el poder de resolución es.

$$PR = \frac{550 \text{ nm}}{2 \times 1.25} = \frac{550 \text{ nm}}{2.50} = 220 \text{ nm ó } 0.22 \mu\text{m}$$

Un objeto mayor a 0.22 μm puede ser visualizado, incluyendo a la mayoría de las bacterias con excepción de las clamidias, sin embargo los virus no pueden ser vistos. En el cuadro 18, se muestran algunos datos de los objetivos

Cuadro 18. Características principales de los objetivos

Amplificación	Apertura numérica	Distancia de trabajo (mm)	Diámetro del campo (cm)
10x seco débil	0.25	1.80	2.00
40x seco fuerte	0.65	0.73	1.00
100x inmersión	1.25	0.12	0.05

Al pasar de una lente de bajo poder a una lente de inmersión, se observa una imagen borrosa debido a que la luz al abandonar el portaobjetos es atrapada por el aire, sin embargo los objetivos de 10x y 40x son lo suficientemente anchos y logran recuperar dicha luz, pero el objetivo de inmersión es tan angosto que la luz se pierde, porque el índice de refracción de 1.5 es casi idéntico al índice de refracción del vidrio, de esta manera el aceite provee una imagen homogénea y clara del objeto al corregir el índice de refracción de la luz. La microscopía de campo claro se utiliza para observar microorganismos teñidos o para la cuenta de microorganismos en cámaras cuentaglóbulos o de Petroff Hausser.

Microscopía de campo oscuro

En la microscopía de campo oscuro, el fondo permanece oscuro y sólo el objeto es iluminado al emplear un condensador que tiene un disco opaco que impide que la luz entre directamente al material en observación y sólo entra al lente objetivo la luz difractada por el espécimen, el cual se ve iluminado contra un campo oscuro. La microscopía de campo oscuro se utiliza para observar a los microorganismos vivos, no visibles en campo claro, no fácilmente teñibles o cuya morfología es alterada por la tinción. Se utiliza en la detección del *Treponema pallidum*, agente etiológico de la sífilis. En la figura 6 se muestra la trayectoria de la luz en campo oscuro.

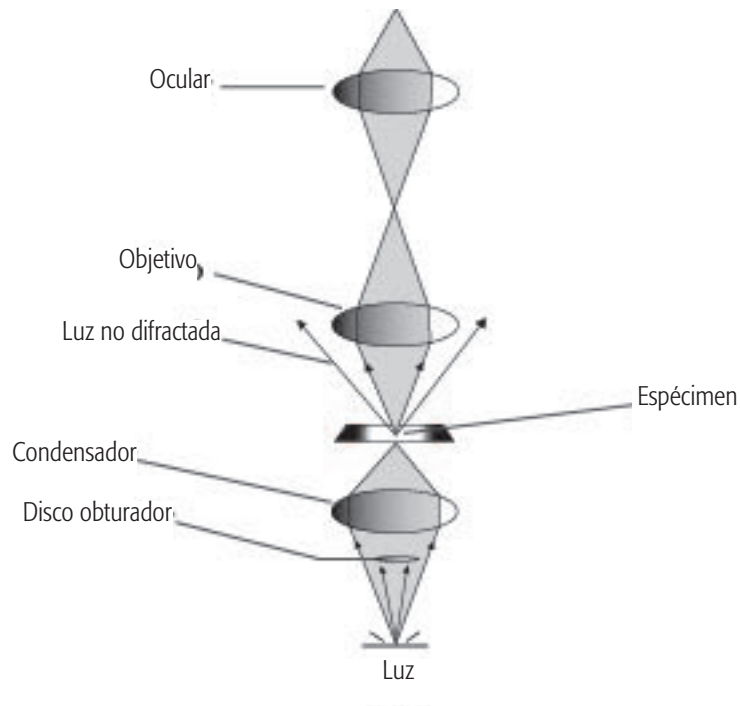


Figura 6. Trayectoria de la luz en campo oscuro

Microscopio de contraste de fases

El contraste de fases se basa en las diferencias en el índice de refracción de los componentes del espécimen observado. Se utilizan condensadores especiales y filtros que dispersan el rayo de luz y lo desfazan ligeramente. El haz de luz separado pasa a través y alrededor del objeto microscópico, la luz es difractada diferencialmente, lo que se manifiesta como diferentes grados de brillantez contra un fondo oscuro, se observan claramente detalles de las estructuras internas de la célula no visibles en el microscopio de campo claro. Esta técnica permite observar a los organismos vivos sin necesidad de teñirlos o fijarlos, en microbiología es de gran ayuda particularmente para observar estructuras internas en hongos y protozoarios.

Microscopio de fluorescencia

En la microscopía de fluorescencia el espécimen se cubre con colorantes fluorescentes como la fluoresceína y se ilumina con luz ultravioleta, se excitan los electrones del colorante que se mueven hacia niveles energéticos superiores, sin embargo, regresan rápidamente a su estado de energía original y el exceso de energía se manifiesta como luz visible (fluorescencia). Así, los organismos cubiertos con el colorante se ven fluorescentes.

Una aplicación de esta técnica es la inmunofluorescencia, en la cual la fluoresceína se mezcla con anticuerpos y se pone en contacto con la muestra que contiene el microorganismo desconocido, si los anticuerpos son específicos contra dicho agente, se enlazan y lo cubren; cuando se iluminan con luz ultravioleta se ven fluorescentes. Mediante esta técnica se pueden detectar bacterias u otros organismos patógenos aún dentro de las células, tejidos o en cualquier muestra clínica.

Microscopio electrónico

En el microscopio electrónico se utiliza como fuente de energía (iluminación) un haz de electrones de longitud de onda corta (0.005 nm), lo que incrementa el poder de resolución del sistema a fracciones de nanómetros y permite observar estructuras menores a 0.02 μm como virus, estructuras celulares finas y moléculas de gran tamaño como el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Debido a que la fuente de luz es un flujo de electrones, el espacio por el que atraviesan debe estar libre de partículas o de materia que reduzca su energía, los electrones deben fluir en tubos a los que se les hace vacío. El microscopio electrónico se enfoca mediante el cambio de lentes magnéticas más que moviendo las lentes como en el microscopio de luz; los magnetos atraen a los electrones hacia el objeto y son absorbidos o dispersados dependiendo de la densidad de las estructuras dentro del objeto y al proyectarse sobre una pantalla forman una imagen que esquematiza la estructura del espécimen analizado.

Existen dos tipos de microscopio electrónico; el de transmisión y el de barrido.

Microscopio electrónico de transmisión

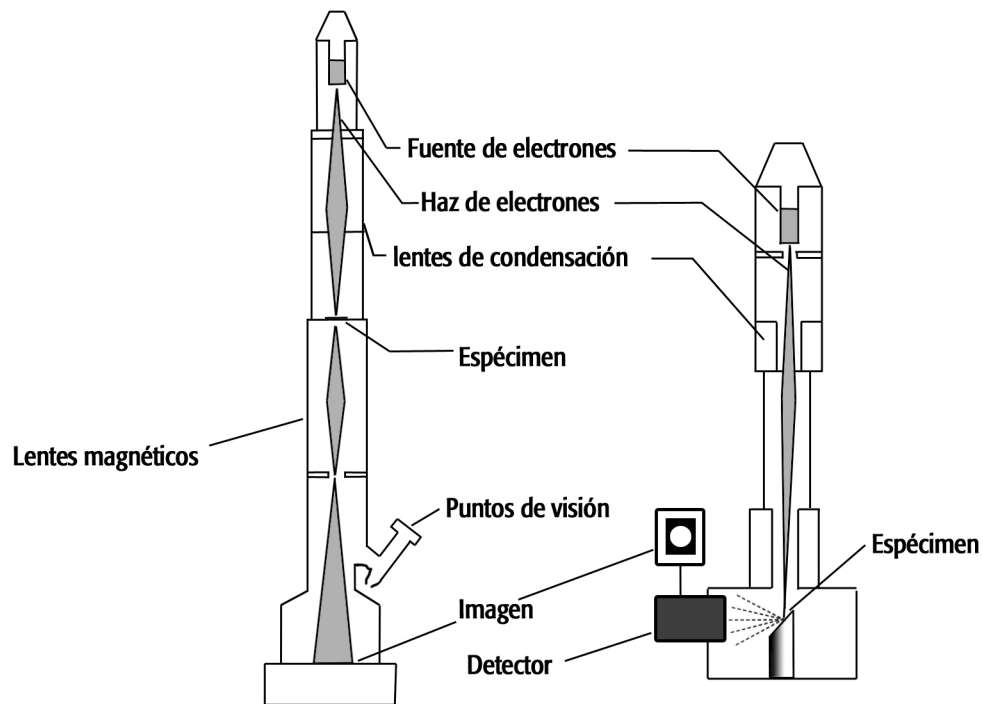
El microscopio de transmisión se usa para fotografiar estructuras detalladas dentro de las células. Se preparan secciones ultrafinas del material por analizar debido a que el haz de electrones penetra solamente a distancias cortas, después se incluye el material en un medio adecuado de montaje o de congelación y se corta el espécimen con un cuchillo de diamante, de esta manera los microorganismos o cualquier otro tipo de células es cortada en cientos de secciones.

En seguida se colocan las piezas en una rejilla metálica y se tiñen con metales pesados como oro o paladio para hacer densas ciertas partes. A continuación se insertan las secciones en una cámara de vacío y se enfoca un haz de electrones de 10,000 volts. Con las lentes magnéticas, se forma una imagen fotográfica que puede agrandarse con resolución suficiente para adquirir un aumento de 10,000x a 100,000x, de estructuras tan pequeñas como de 0.2 nm.

Microscopio electrónico de barrido

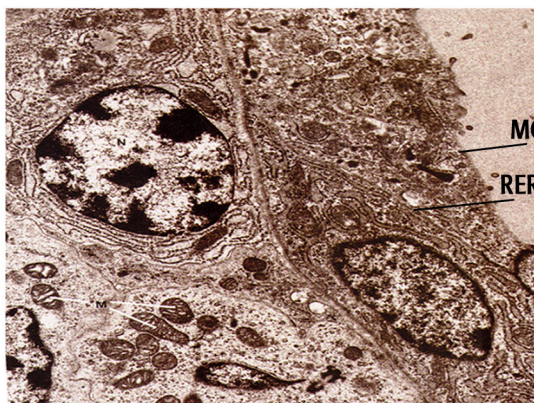
El microscopio electrónico de barrido permite observar la superficie de las células en su estado natural, sin seccionarlos. Los especímenes se cubren también con oro para incrementar la conductividad eléctrica. El haz de electrones alcanza el objeto y una lluvia de ellos es capturada por un detector, formando la imagen línea por línea como en un receptor de televisión, produciendo un contraste más oscuro y da una imagen en tercera dimensión. Los aumentos obtenidos con este tipo de microscopio son limitados de 1,000 a 10,000 veces. Este instrumento es relativamente fácil de operar y ofrece una imagen vívida y sin distorsión de la superficie de un organismo. En la figura 7 se muestra la trayectoria de los electrones en cada uno de los microscopios así como la imagen que proporcionan del espécimen observado.

Figura 7. Trayectoria de los electrones en el microscopio electrónico.

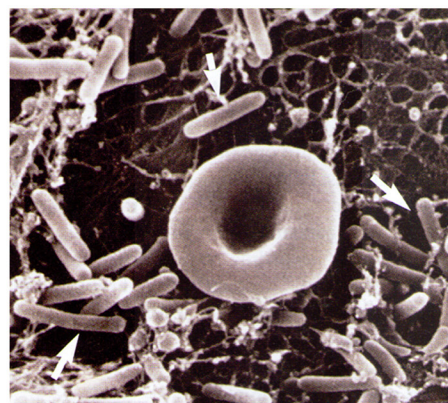


a) De transmisión

b) De barrido



Micrografía electrónica de la transmisión de una célula animal típica. N, núcleo; M, mitocondria; MC, membrana celular; RER, retículo endoplásmico rugoso.







Fotografía al microscopio electrónico de barrido de bacterias rodeando a un eritrocito.

Cuestionario

1. Explique los pasos a seguir para la iluminación de Koehler.
2. Explique los cuidados que se deben tener con el microscopio, su uso, transporte y limpieza.
3. Mencione dos enfermedades infecciosas que son diagnosticadas por microscopía de fluorescencia.

Bibliografía

-  Murphy, D. B. Fundamentals of light microscopy and electronic imaging. Wiley-Liss, Hoboken. 2001.
-  Ogunseitán, O. Microbial diversity. Form and function in prokaryotes. Blackwell Science Ltd. Victoria. 2005.
-  Pommerville, J. C. Alcamo's fundamentals of microbiology. Jones and Bartlett Publishers. Sudbury. 2007.
-  Slonczewski, J. L., Foster, J. W. Microbiology. An evolving science. W.W. Norton. New York. 2009.

Apéndice B

Métodos de tinción

Tinción de gram

1. Se coloca una gota de solución salina fisiológica en un portaobjetos rotulado, en la cual se disuelve una pequeña parte de la colonia seleccionada y se extiende circularmente. Dejar secar al aire.
2. Se fija el frote por calor al pasar el portaobjetos sobre la flama del mechero repetidas veces.
3. Se cubre con solución de cristal violeta durante un minuto, posteriormente se escurre el colorante y se lava la laminilla con agua corriente.
4. Se aplica lugol durante un minuto, se escurre y lava con agua.
5. Se decolora con la mezcla alcohol-acetona (5 a 15 segundos), hasta que ya no escurra líquido azul. Se escurre y lava con agua corriente.
6. Se cubre con solución de safranina durante un minuto, se escurre y se lava con agua corriente.
7. Se deja secar al aire y se observa al microscopio con objetivo de inmersión.

Tinción de cápsula (Método de Rojo Congo)

1. Se coloca una gota de solución de rojo congo en el centro de un portaobjetos.
2. Se toma una asada del cultivo, se suspende y dispersa en la gota de colorante para hacer un frote. Dejar secar al aire.
3. Se cubre el frote con unas gotas del mordente de cápsula y se deja actuar durante un minuto, se escurre y se lava con agua destilada. Dejar secar al aire.
4. Se observa la preparación al microscopio con objetivo de inmersión. La cápsula se observará como una zona luminosa de color rojo alrededor de la bacteria en un campo azul oscuro.

Tinción de Shaeffer-Fulton para esporas

1. Se prepara un frote y se cubre con solución de verde de malaquita. Se deja actuar durante un minuto.
2. Se calienta la preparación a emisión de vapores durante 5 minutos, (el colorante no debe hervir, ni secarse), se escurre la laminilla y se lava con agua corriente.
3. Se cubre la preparación con solución de safranina y se deja actuar durante un minuto, se escurre y se lava con agua corriente.
4. Se deja secar al aire y se observa al microscopio. Las esporas se ven de color verde y las bacterias de color rojo.

Nota: La formulación de los reactivos necesarios para las tinciones se encuentra en el apéndice E.

Apéndice C

Preparación de medios de cultivo

Agar bacteriológico

El Agar Bacteriológico no es un medio de cultivo, es un agente gelificante que se usa especialmente en la preparación de medios de cultivo sólidos y semisólidos. Normalmente se emplean de 13 a 15 gramos (g) por litro de medio de cultivo para formar un gel resistente.

Agar Citrato de Simmons

Recomendado para la diferenciación de coliformes aislados del agua. Puede utilizarse especialmente en la diferenciación de bacilos entéricos.

FÓRMULA:	g/L
Fosfato dihidrogenado de amonio	1.0
Fosfato dipotásico	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Citrato de sodio	2.0
Sulfato de magnesio	0.2
Agar	15.0
Azul de bromotimol	0.8

pH final 6.9 ± 0.2

Agar Dextrosa Sabouraud

Se recomienda para el cultivo y conservación de hongos y para propósitos generales en trabajos de micología. Puede emplearse para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. Cuando los materiales en estudio están altamente contaminados, el aislamiento de hongos mejora si se añaden al medio de cultivo antibióticos.

FÓRMULA:	g/L
Mezcla de peptonas	10
Dextrosa (glucosa)	40
Agar	15

pH final 5.6 ± 0.2

NOTA: Con la misma formulación, pero sin agar, se prepara el Caldo Dextrosa Sabouraud.

Agar de Eosina y Azul de Metileno (EMB)

Se utiliza para aislar y diferenciar a los microorganismos coliformes de enterobacterias de interés médico y sanitario. Por su contenido en lactosa y sacarosa es posible diferenciar en el primocultivo: *Salmonella* y *Shigella* lactosa y sacarosa negativas de otras enterobacterias lactosa negativas pero sacarosa positivas, como *Proteus vulgaris*, *Citrobacter* y *Aeromonas*. La microflora acompañante, que entorpece el aislamiento de los gérmenes de interés médico, es ampliamente inhibida por los colorantes de la fórmula, sobre todo la flora Gram positiva.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	10.0
Lactosa	5.0
Sacarosa	5.0
Fosfato dipotásico	2.0
Eosina Y	0.4
Azul de metileno	0.065
Agar	13.5

pH final 7.2 ± 0.2

Agar Levine con Eosina y Azul de Metileno

Medio selectivo para la investigación y diferenciación de bacilos entéricos y microorganismos coliformes. También es usado para aislar e identificar *Candida albicans*.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	10.0
Lactosa	10.0
Fosfato dipotásico	2.0
Agar	15.0
Eosina	0.4
Azul de metileno	0.065

pH final 7.1 ± 0.2

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Medio útil para diferenciar tempranamente cepas de *Salmonella* y *Arizona* de *Citrobacter*. Se basa en la descarboxilación de la lisina, formación de sulfuros y fermentación de glucosa. También podemos detectar la desaminación de lisina.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	5.00
Extracto de levadura	3.00
Dextrosa (glucosa)	1.00
L-Lisina	10.00
Citrato de amonio férrico	0.50
Tiosulfato de sodio	0.04
Púrpura de bromocresol	0.02
Agar	13.50

pH final 6.7 ± 0.2

Agar de Hierro Triple Azúcar (TSI)

Medio diferencial muy usado en la identificación de enterobacterias patógenas y saprófitas en los análisis bacteriológicos rutinarios, principalmente de heces.

FÓRMULA:	g/L
Mezcla de peptonas	20.0
Cloruro de sodio	5.0
Lactosa	10.0
Sacarosa	10.0
Dextrosa (glucosa)	1.0
Sulfato de amonio férrico	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Rojo de fenol	0.025
Agar	13.0

pH final 7.3 ± 0.2

Agar Infusión de Cerebro Corazón

Medio sólido, rico en nutrientes, adecuado para el cultivo de varios microorganismos exigentes entre los cuales se encuentran diversos tipos de bacterias, mohos y levaduras.

FÓRMULA:	g/L
Infusión de cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón de res	250.0
Mezcla de peptonas	10.0
Fosfato dipotásico	2.5
Cloruro de sodio	5.0
Dextrosa (glucosa)	2.0
Agar	15.0

pH final 7.3 ± 0.2

NOTA: Con la misma formulación, pero sin agar, se obtiene un caldo llamado infusión de cerebro y corazón

Agar de MacConkey

Medio ampliamente usado para aislar e identificar selectivamente enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella* y coliformes a partir de excremento, orina, aguas negras y diversos alimentos con sospecha de contaminación fecal. En este medio, los gérmenes Gram positivos son inhibidos por las sales biliares y el cristal violeta. Las enterobacterias fermentadoras de lactosa bajan el pH del medio, lo que es detectado por el indicador rojo neutro dando colonias rojas o rosadas. Las no fermentadoras de lactosa dan colonias transparentes, incoloras o amarillas.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	17.0
Mezcla de peptonas	3.0
Lactosa	10.0
Mezcla de sales biliares	1.5
Cloruro de sodio	5.0
Agar	13.5
Rojo neutro	0.030
Cristal violeta	0.001

pH final 7.1 ± 0.2

Agar de Mueller-Hinton

Es un medio rico, recomendado para el aislamiento y desarrollo de gonococos y meningococos. También se emplea, sobre todo, en la prueba de sensibilidad (antibiograma).

FÓRMULA:	g/L
Infusión de carne de res	300.0
Peptona de caseína ácida	17.5
Almidón	1.5
Agar	17.0

pH final 7.4 ± 0.2

Agar Nutritivo

Es un medio rico de uso general en el laboratorio, adecuado para el cultivo de microorganismos poco exigentes. Cuando en la formulación se omite el agar se obtiene caldo nutritivo.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	5.0
Extracto de carne de res	3.0
Agar	15.0

pH final 6.8 ± 0.2

Agar Sal y Manitol

Es un medio selectivo muy empleado para aislar estafilococos patógenos de materiales clínicos diversos, también se utiliza en la industria alimenticia para el aislamiento e identificación de estafilococos que se encuentran en la leche y productos lácteos, carnes y derivados cárnicos.

La degradación del manitol de este medio, con la producción de ácido cambia el color del medio, de rosa a amarillo. Debido a su alto contenido de cloruro de sodio, puede hacerse una siembra masiva del material en estudio, apareciendo las colonias de estafilococos no patógenas pequeñas y rodeadas de una zona roja; en cambio, las colonias de estafilococos patógenos fermentadores de manitol producen colonias más grandes y rodeadas de una zona amarilla.

FÓRMULA:	g/L
Extracto de carne	1.0
Mezcla de peptonas	10.0
Cloruro de sodio	75.0
D-Manitol	10.0
Agar	15.0
Rojo de fenol	0.025

pH final 7.4 ± 0.1

Base de Agar Sangre

Medio adecuado para aislar y cultivar diversos microorganismos de difícil crecimiento. Al medio fundido y enfriado a unos 45 °C se le añade de 5 a 10 % de sangre desfibrinada estéril, de esta forma el medio puede usarse para detectar la actividad hemolítica de bacterias y para aislar bacilos tuberculosos.

FÓRMULA:	g/L
Infusión de músculo cardíaco	375.0
Peptona de carne	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

pH final 7.3 ± 0.2

Base de Agar Urea de Christensen

Es un medio usado para diferenciar bacilos entéricos con base en su capacidad de hidrolizar la urea.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de gelatina	1.0
Dextrosa (glucosa)	1.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato monopotásico de sodio	2.0
Urea	20.0
Rojo de fenol	0.012

pH final 6.8 ± 0.2

Caldo Rojo de Fenol con Carbohidratos

Es un medio para el estudio de la fermentación. La composición y el pH son los mismos de la base caldo rojo de fenol. La adición de carbohidratos es de 0.5 % y los más empleados son: Lactosa, Maltosa, Sacarosa, Glucosa y Xilosa.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de caseína	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Carbohidratos	5.0
Rojo de fenol	0.018

pH final 7.4 ± 0.2

Caldo Urea

Se emplea para la identificación de bacterias, particularmente para diferenciar los miembros de los géneros *Proteus* y *Shigella*.

FÓRMULA:	g/L
Urea	20.0
Fosfato monopotásico	9.10
Fosfato de sodio	9.50
Extracto de levadura	0.10
Rojo de fenol	0.01

pH final 6.8 ± 0.2

Medio basal O/F (De Hugh y Leifson)

El medio de Hugh y Leifson se emplea extensamente junto con otros medios de diferenciación, para identificar al numeroso grupo de bacilos Gram negativos no fermentadores de carbohidratos, por medio de las reacciones de oxidación y/o de fermentación de los mismos.

El alto contenido de peptona (1%) en los medios utilizados en el estudio de las fermentaciones, producen suficiente cantidad de aminas alcalinas para neutralizar y enmascarar a la pequeña cantidad de ácidos formados por los microorganismos oxidativos. Bajando la concentración de peptona al 0.2% se puede determinar si el carbohidrato contenido en el medio es o no utilizado por las bacterias en estudio.

Los azúcares que más se emplean son glucosa, lactosa, sacarosa, maltosa y xilosa.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de caseína	3.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	0.3
Agar	2.5
Azul de bromotimol	0.03

pH final 7.1 ± 0.1

Medio Movilidad, Indol y Ornitina (MIO)

Este medio se utiliza para la identificación de enterobacterias sobre la base de movilidad, la producción de ornitina descarboxilasa y de indol. Los cultivos son inoculados por picadura en tubos con medio solidificado verticalmente.

FÓRMULA:	g/L
Extracto de levadura	3.0
Peptona de gelatina	10.0
Peptona de caseína	10.0
L-Ornitina	5.0
Dextrosa (glucosa)	1.0
Agar	2.0
Púrpura de bromocresol.	0.02

pH final 6.5 ± 0.2

Medio Rojo de Metilo/Voges-Proskauer (MR/VP)

Medio líquido que se emplea para efectuar las reacciones de rojo de metilo y acetilmetilcarbinol (Voges-Proskauer) del grupo *Escherichia/Enterobacter*.

FÓRMULA:	g/L
Mezcla de peptonas	7.0
Dextrosa (glucosa)	5.0
Fosfato de potasio	5.0

pH final 6.9 ± 0.1

Medio Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM)

Es un medio semisólido usado rutinariamente en la diferenciación e identificación de cultivos puros de enterobacterias, se utiliza para detectar la producción de sulfuros, indol y movilidad de las mismas.

FÓRMULA:	g/L
Peptona de caseína	20.0
Peptona de carne	6.1
Sulfato de hierro y amonio	0.2
Tiosulfato de sodio	0.2
Agar	3.5

pH final 7.3 ± 0.2

Apéndice D

Preparación e interpretación de pruebas bioquímicas

Agar de Hierro y Lisina (LIA)

Este medio está preparado en pico de flauta, lo que permite que haya dos cámaras de reacción dentro del tubo: la porción inclinada es aerobia y la porción de fondo es relativamente anaerobia. El tubo de LIA se inocula con el asa recta, de tal forma que no se alcance el fondo del tubo a fin de evitar la alteración del medio anaerobio, después se estra la porción inclinada y se incuba a 35 °C de 18 a 24 horas.

La relación de glucosa-lisina es de 1:10 con el fin de que los productos alcalinos de la descarboxilación de la lisina no sean neutralizados con los productos ácidos de la fermentación de la glucosa.

DESCARBOXILACION DE LA LISINA. Muchas especies de bacterias poseen enzimas capaces de descarboxilar aminoácidos específicos del medio, como la lisina descarboxilasa, con liberación de dióxido de carbono y aminas alcalinas. En la superficie aerobia de este medio las aminas alcalinas se ponen de manifiesto al virar el medio a color púrpura, por el indicador púrpura de bromocresol.

FERMENTACIÓN DE LA GLUCOSA. Los productos ácidos de la fermentación de la glucosa, son evidenciados por cambio de color del medio de púrpura a amarillo. La superficie del medio, puede ser amarilla cuando los productos ácidos no son neutralizados por los productos alcalinos de la descarboxilación de la lisina y en general el fondo se torna amarillo cuando hay fermentación de la glucosa. (Ver foto 1c, Apéndice G). Cuando la bacteria en estudio no fermenta ni descarboxila, el medio se mantiene sin cambio aparente.

PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO. H₂S. La capacidad de ciertas especies bacterianas para liberar azufre de aminoácidos y de otros compuestos que lo contienen, en forma de gas H₂S, constituye una característica importante para su identificación. Para la producción y detección del gas es necesario que el medio contenga:

- Fuente de azufre (tiosulfato de sodio). Por la acción de enzimas bacterianas se libera el ión Sulfuro (S²⁻), que reacciona con los protones del medio para producir H₂S.
- Un indicador de H₂S como las sales de metales pesados (sulfato ferroso, citrato férrico, hierro peptonado o acetato de plomo), con los que produce el sulfuro del metal pesado formando un precipitado negro. El ennegrecimiento del medio se observa primero donde hay la máxima producción del ácido, es decir, a lo largo de la línea de inoculación. (Ver foto 1b, Apéndice G).

Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)

En este medio, la lactosa y la sacarosa se encuentran en una concentración 10 veces mayor que la glucosa. El sulfato ferroso, como detector de H₂S, es menos sensible que otras sales férricas o ferrosas. El indicador rojo de fenol es amarillo a pH menor de 6.8 y puesto que el pH final del medio está estandarizado a 7.4, la producción de cantidades relativamente pequeñas de ácidos provoca un cambio visible a color amarillo.

El tubo con TSI se prepara e inocula de la misma manera que el tubo con medio LIA, con el fin de contar con una superficie aerobia y un fondo anaerobio.

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS. Las reacciones alcalinas o ácidas se indican mediante color rojo o amarillo del agar, respectivamente. (Ver foto 2b y 2c, Apéndice G)

- Las bacterias no fermentadoras, incapaces de producir ácido por fermentación de glucosa, lactosa o sacarosa no presentan cambio en el medio (alcalino/alcalino). (Ver foto 2b)
- En las bacterias fermentadoras de glucosa, el medio presenta acidificación inicial en el fondo y en el pico (ácido/ácido), pero el pico retorna pH alcalino al formarse aminas alcalinas por descarboxilación oxidativa de proteínas cerca de la superficie quedando alcalino/ácido.

En las bacterias fermentadoras de lactosa hay una acidificación completa y permanente del fondo y pico del medio quedando ácido/ácido. (Ver foto 2c)

PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO H_2S . El Sulfuro de hidrógeno es un gas incoloro que se forma al combinarse el ión sulfuro proveniente del tiosulfato de sodio con los protones presentes en un medio ácido. Para revelar la presencia de este gas se utiliza sulfato ferroso, citrato férrico o acetato de plomo, los cuales al reaccionar con el H_2S producen Sulfuro del metal pesado en forma de un precipitado negro. (Ver foto 2d, Apéndice G). En esta prueba, se puede detectar la formación de otros gases que se manifiestan por el desplazamiento y/o fragmentación del medio gelificado. (Ver foto 2e, Apéndice G)

Fermentación de carbohidratos

El principio de fermentación de carbohidratos indica que la acción de muchas especies de microorganismos sobre estos substratos producen la acidificación del medio con o sin formación de gas, lo cual es detectado por el rojo de fenol que vira a amarillo cuando el pH del medio cae por debajo de 6.8 y en la campana de Durham el medio es desplazado por el gas producido por la fermentación del carbohidrato ensayado. (Ver foto 3, Apéndice G)

Agar Urea de Christensen (prueba de ureasa)

Para esta prueba también se puede utilizar el caldo urea de Stuart. Se inocula el caldo o se estria la superficie inclinada del agar y se incuba a 35 °C de 18 a 24 horas.

Los microorganismos que poseen la enzima ureasa hidrolizan la urea y liberan amoníaco que reacciona en solución para formar carbonato de amonio, produciendo alcalinización y aumento del pH del medio, lo cual se manifiesta con el vire del rojo de fenol.

Se interpreta como una prueba positiva la presencia de color rosa intenso en forma parcial o total en el agar y total en el caldo. (Ver foto 4, Apéndice G)

Medio Sulfuro-Indol-Movilidad (SIM)

Es un medio semisólido, se utiliza para detectar movilidad, producción de indol y producción de H_2S . Alternativamente, se puede utilizar el medio Movilidad Indol Ornitina (MIO), en el que además de detectar movilidad y producción de indol se aprecia la descarboxilación de la ornitina. Ambos medios se preparan en tubos a una altura de 4 cm y se dejan gelificar verticalmente. La cepa en estudio se siembra por picadura, alcanzando ésta 3/4 partes de la longitud de la columna y se incuba a 35 °C de 18 a 24 horas. Es recomendable interpretar primero la movilidad para evitar enmascarar los resultados.

PRUEBA DE MOVILIDAD. La movilidad bacteriana se puede evidenciar en medios que contienen concentraciones de agar de 0.4 % o menos, esta prueba se interpreta realizando un examen macroscópico del medio para observar una zona de desarrollo difuso, que parte de la línea de inoculación. (Ver foto 5b, Apéndice G).

PRUEBA DE INDOL. El indol es uno de los productos del metabolismo del triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa son capaces de degradar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol se puede detectar por el desarrollo de un color rojo al hacerlo reaccionar con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído (principio activo de los reactivos de Kovac y Ehrlich).

TÉCNICA: Al final de la incubación, se añaden 5 gotas de reactivo de Kovac o de Ehrlich por la pared del tubo, si se emplea el reactivo de Ehrlich es necesario añadir previamente al tubo 1 ml de cloroformo con el fin de extraer el indol del medio. El desarrollo de color rojo vivo segundos después de añadir el reactivo, significa la presencia de indol. (Ver foto 5b, Apéndice G)

PRUEBA DE PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO (H_2S). Igual que el descrito para el medio LIA.

Prueba de Catalasa

El peróxido de hidrógeno, producto final del metabolismo oxidativo aeróbico de los carbohidratos, es letal para las células bacterianas. La catalasa es la enzima que lo descompone en oxígeno y agua. Con excepción de los estreptococos, la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas presentan actividad de catalasa.

TÉCNICA: Transferir células del centro de una colonia aislada a la superficie de un portaobjetos limpio y añadir 1 ó 2 gotas de peróxido de hidrógeno al 3 %. La aparición rápida y producción sostenida de burbujas de gas o efervescencia indica una reacción positiva. Dado que algunas bacterias pueden poseer enzimas distintas a la catalasa, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno, unas pocas burbujas diminutas formadas de 20 a 30 segundos, no se consideran una prueba positiva. (Ver foto 6, Apéndice G)

Nota: Se recomienda no utilizar agujas o asas que contengan hierro, ya que pueden producir resultados falsos positivos.

Prueba de Citrato de Simmons

El citrato se utiliza para determinar la capacidad de un organismo para utilizar citrato de sodio como única fuente de carbono para su metabolismo y desarrollo.

Este medio se vierte en un tubo y se gelifica como agar inclinado; se inocula la superficie por estría con un inóculo de la cepa pura.

Las bacterias que pueden utilizar citrato también pueden extraer nitrógeno del fosfato de amonio; produciendo amoniaco (NH_3), lo que alcaliniza el medio por conversión del amoniaco en hidróxido de amonio (NH_4OH). El cambio de pH provoca vire del azul de bromotimol.

Una prueba positiva se detecta por la producción de color azul en el medio a las 24 horas de incubación a 35 °C, que revela la presencia de productos alcalinos (NH_4OH). (Ver foto 7c, Apéndice G).

Prueba de O/F (De Hugh y Leifson)

Los microorganismos sacarolíticos degradan glucosa en forma fermentativa (F) u oxidativa (O). Los productos de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes, que se pueden detectar en un medio de fermentación convencional. En cambio, los ácidos formados por degradación oxidativa de la glucosa son sumamente débiles y para su detección se requiere de un medio de oxido-fermentación más sensible, como el O/F.

TÉCNICA: Para la prueba O/F, se requieren dos tubos inoculados (con el organismo desconocido) con una aguja de punción que atraviese el medio hasta llegar casi al fondo del tubo, se cubre un tubo de cada par con una capa de 1 cm de aceite mineral estéril o parafina fundida, el otro tubo se deja sin aceite. Se incuban a 35 °C durante 48 horas o más. La producción de ácido se detecta en el medio por la presencia de color amarillo. En el caso de organismos oxidativos, la producción de color se puede notar primero cerca de la superficie del medio. El cuadro 19 y foto 8 del apéndice G muestran los patrones de reacción.

Cuadro 19. Patrones de reacción en la prueba oxidación-fermentación

TUBO DESCUBIERTO	TUBO CUBIERTO	TIPO DE METABOLISMO
Ácida	Alcalina	Oxidativo
Ácida	Ácida	Fermentativo
Alcalina	Alcalina	No sacarolítico

NOTA: ácida = color amarillo
alcalina = color verde

Prueba de Oxidasa

Los citocromos actúan como el último eslabón de la cadena respiratoria aerobia, transfiriendo electrones al oxígeno con formación de agua. El sistema citocromo se encuentra en los organismos aerobios o anaerobios facultativos, de modo que la prueba de oxidasa es importante para identificar a aquellos organismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados.

Algunos reactivos como el diclorhidrato de tetrametilp-fenilendiamina se reducen al actuar como aceptores artificiales de electrones del sistema citocromo, sustituyendo al oxígeno, de tal forma que al pasar del estado oxidado a reducido se manifiesta la presencia de la enzima citocromo oxidasa.

TÉCNICA: Se añaden unas gotas de Diclorhidrato de tetrametilp-fenilendiamina al 1% a una tira de papel filtro o discos comerciales impregnados con el reactivo. En la zona del papel, donde se halla el reactivo, se extiende una asada de la colonia de prueba. Las colonias bacterianas con actividad de citocromo-oxidasa desarrollan en segundos un color azul intenso en el sitio de aplicación. (Ver foto 9, Apéndice G)

Rojo de Metilo/Voges Proskauer (MR/VP)

El caldo MR/VP se inocula con un cultivo puro del organismo en estudio, se incuba a 35 °C, a las 24 horas transferir 1 ml de caldo a un tubo de ensayo limpio para realizar la prueba de VP, el resto del cultivo se incuba 24 a 48 horas más para realizar la prueba de RM.

PRUEBA DE VOGES PROSKAUER (VP). El ácido pirúvico formado en la degradación de la glucosa, es metabolizado a través de varias vías, de acuerdo con los sistemas enzimáticos que poseen las bacterias. Una de estas vías lleva a la producción de acetoína (acetilmetilcarbinol), un subproducto de reacción neutra. En presencia de oxígeno atmosférico y de hidróxido de potasio al 40%, la acetoína se convierte en diacetilo, la adición de α -naftol como revelador desarrolla un complejo de color rojo a negro.

TÉCNICA: Al cultivo de 24 horas añadir 0.6 ml de α -naftol al 5 % y 0.2 ml de KOH al 40 % en el orden indicado. El desarrollo de color rojo en el término no mayor de 15 minutos indica la presencia de diacetilo. (Ver foto 10d, Apéndice G).

PRUEBA DE ROJO DE METILO (MR). Esta prueba es cuantitativa para la producción de ácido a partir de la glucosa por la vía de la fermentación ácida mixta. Dado que son muchas las especies de enterobacterias que pueden producir cantidades suficientes de ácidos fuertes, detectables con el indicador rojo de metilo durante las fases iniciales de la incubación, sólo se consideran rojo de metilo positivos aquellos organismos que producen ácido y mantienen el pH por debajo de 4.4 después de incubación prolongada (48 a 72 horas), mantiene un color rojo estable. (Ver fotos 10b, Apéndice G).

Apéndice E

Formulación de las soluciones

Tinción de Gram:

Colorante Cristal violeta

Solución A

Cristal violeta	2.0 g
Etanol al 95%	20.0 ml

Solución B

Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80.0 ml

Mezclar las dos soluciones.

Solución de lugol

Yodo	1.0 g
Yoduro de potasio	2.0 g
Agua destilada	300.0 ml

Solución de Alcohol-Acetona

Acetona	25.0 ml
Alcohol etílico	50.0 ml

Colorante de Safranina

Safranina	0.5 g
Agua destilada	100.0 ml

Disolver la safranina en aproximadamente 20 ml de agua destilada y aforar a 100 ml.

Colorantes para tinción de cápsula:

Solución de rojo congo al 1%

Rojo congo	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Mordente para cápsula

Solución de FeCl_3 al 6%	4.0 ml
Ácido acético glacial	4.0 ml
Fenol al 5%	30.0 ml
Fucsina básica al 5% en agua	2.0 ml

Colorantes para tinción de esporas:

Colorante verde de malaquita al 5%

Verde de malaquita	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Colorante de Safranina al 0.5%

Ver reactivos de la tinción de Gram.

Azul de algodón con lactofenol:

Solución "A" (azul de algodón)

Se prepara una solución acuosa al 0.1 %

Solución "B" (lactofenol)

Agua	100 ml
Fenol	100 g
Ácido láctico	100 ml
Glicerol	100 ml
Ácido pícrico (solución saturada)	100 ml

Disolver el fenol en agua sin calentar; adicionar en forma consecutiva el ácido láctico, glicerol y el ácido pícrico.

Para preparar el azul de algodón con lactofenol mezclar partes iguales de la solución "A" y la solución "B".

Reactivo para la prueba de catalasa:

Solución de peróxido de hidrógeno al 3 %

Peróxido de hidrógeno al 30%	1.0 ml
Agua destilada	9.0 ml

Reactivo de Ehrlich:

Paradimetilaminobenzaldehído	2.0 g
Alcohol etílico absoluto	190.0 ml
Ácido clorhídrico concentrado	40.0 ml

Reactivo de Kovac:

Paradimetilaminobenzaldehído	5.0 g
Alcohol amílico	75.0 ml
Ácido clorhídrico	25.0 ml

Reactivo para la prueba de oxidasa:

Diclorhidrato de tetrametilp-fenilendiamina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

También es posible utilizar Diclorhidrato de dimetilp-fenilendiamina

Reactivo para la prueba de rojo de metilo:

Rojo de metilo	0.1 g
Alcohol etílico al 95%	300.0 ml
Agua destilada	200.0 ml

Reactivos para la prueba de Voges-Proskauer: **α -naftol al 5% (intensificador del color)**

α -naftol	5.0 g
alcohol etílico absoluto	100.0 ml

Disolver α -naftol en menos de 100 ml de alcohol y aforar a 100 ml.

Hidróxido de potasio al 40% (agente oxidante)

Hidróxido de potasio (KOH)	40.0 g
Agua destilada	100.0 ml

Apéndice F

Uso del espectrofotómetro

En un espectrofotómetro la fuente de luz pasa a través de una suspensión bacteriana hasta incidir en una celda fotoeléctrica. Cuando el número de bacterias incrementa, la suspensión tiende a ser más turbia, causando de esta forma que la luz se esparza y que una menor cantidad de ella alcance la celda fotoeléctrica. Los cambios de luz son registrados en un instrumento como porcentaje de transmitancia (%T, la cantidad de luz que logra pasar a través de la suspensión) y absorbancia (un valor derivado del porcentaje de transmitancia). La absorbancia (A) es el valor utilizado para representar el crecimiento bacteriano en una gráfica.

Operación del Spectronic 21- Digital

- 1) Encender el aparato y esperar 15 minutos.
- 2) Seleccionar la longitud de onda para la máxima absorción de las bacterias y mínima absorción del medio de cultivo.
- 3) Seleccionar el modo de operación: A (Absorbancia) o %T (Transmitancia). Los datos de la Absorbancia son más lineales y usualmente preferibles.
- 4) Colocar el interruptor del aparato en LO.
- 5) Para calibrar el aparato, colocar la celda con medio de cultivo (control) en el contenedor de la celda y girar la perilla de control (100% T/Zero A) hasta que la pantalla registre 000 A. Si no puede ser alcanzada la escala 000 A, mover la sensibilidad a M o Hi. Una U en la esquina superior izquierda de la pantalla digital indica el rango en el que está trabajando el detector de luz, y una O indica que se está por arriba del rango. En cualquiera de los casos, use el interruptor de sensibilidad y el control de estandarización para realizar los ajustes necesarios.
- 6) Para tomar la lectura de una muestra, colocar en el contenedor la celda con medio de cultivo inoculado y registrar la Absorbancia (A) de la pantalla.



Apéndice G

Fotografías:

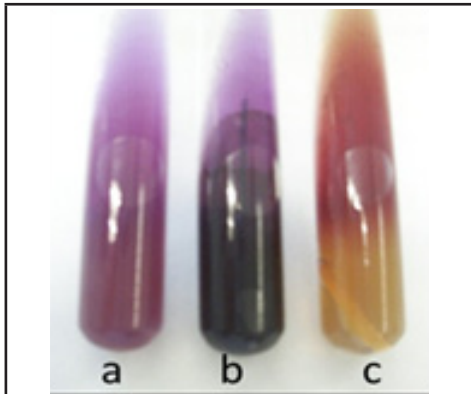


Foto 1. Agar de Hierro y Lisina. (LIA)

- a) Control.
- b) Producción de H_2S , se observa un precipitado negro.
- c) Fermentación de glucosa, se observa el fondo amarillo y descarboxilación de lisina, con alcalinización del medio (rosa).

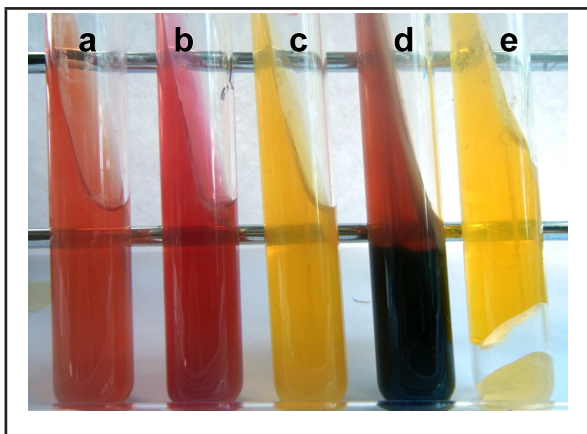


Foto 2. Agar Hierro Triple Azúcar (TSI)

- a) Control.
- b) No hay fermentación de azúcares. Se observa todo el medio alcalino.
- c) Fermentación de lactosa, se observa acidificación en todo el medio.
- d) Producción de H_2S , se observa un precipitado negro.
- e) Acidificación de todo el medio y producción de gas.

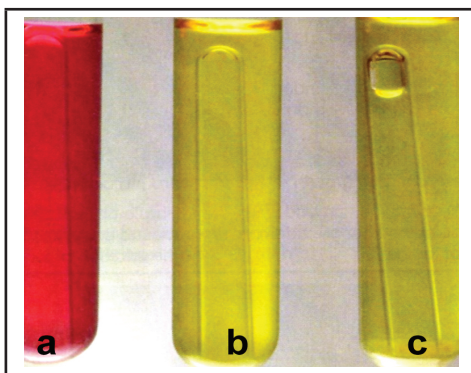


Foto 3. Caldo Rojo de Fenol con Lactosa (CRF-Lactosa)

- a) Control.
- b) Fermentación de lactosa, se observa el vire del indicador rojo de fenol de rojo a amarillo por la presencia de ácidos.
- c) Fermentación de la lactosa y producción de gas.

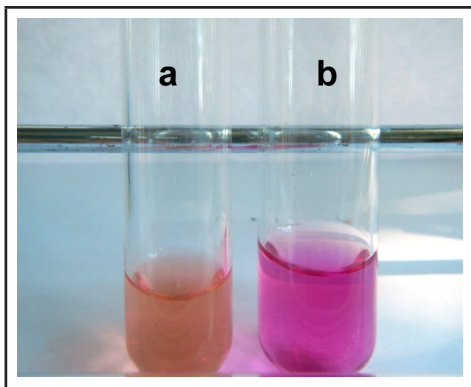


Foto 4. Caldo Urea

- a) Control.
- b) Prueba positiva. Hidrólisis de la urea, se observa alcalinización del medio y vire del indicador rojo fenol.

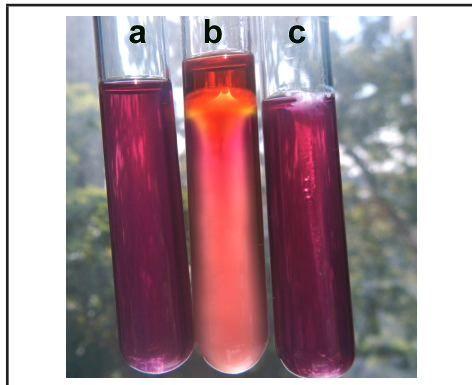


Foto 5. Medio de Movilidad-Indol-Ornitina (MIO)

- a) Control.
- b) Prueba positiva de movilidad, se observa turbio el medio. Prueba de Indol positiva, el reactivo de Kovac forma un anillo rojo.
- c) Prueba negativa de movilidad.

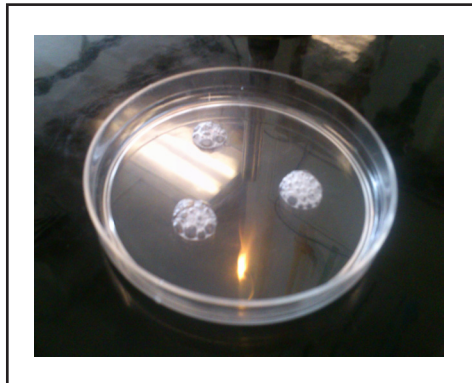


Foto 6. Prueba de Catalasa

Prueba positiva, se observa burbujeo por la degradación del peróxido de hidrógeno y producción de oxígeno gaseoso.

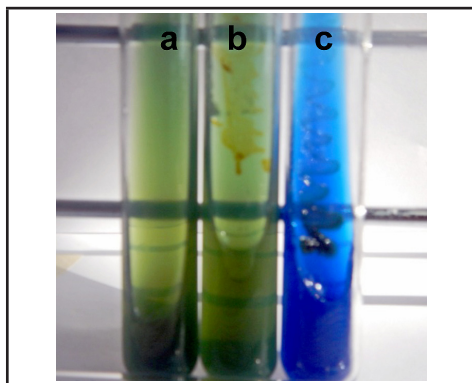


Foto 7. Citrato de Simmons

- a) Control.
- b) Prueba positiva, se observa crecimiento.
- c) Prueba positiva, alcalinización del medio con vire de verde a azul.

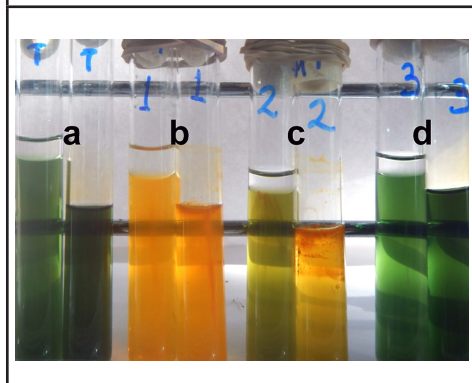


Foto 8. Oxidación-fermentación (O/F)

- a) Control.
- b) Metabolismo fermentativo.
- c) Metabolismo oxidativo.
- d) No sacarolítico.

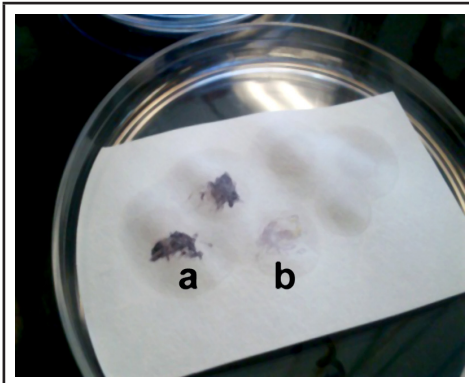


Foto 9. Prueba de Oxidasa

- a) Prueba Positiva. Se observa color negro al reducirse el reactivo de prueba por acción de la enzima citocromo-oxidasa.
- b) Prueba Negativa. No se reduce el indicador red-ox.

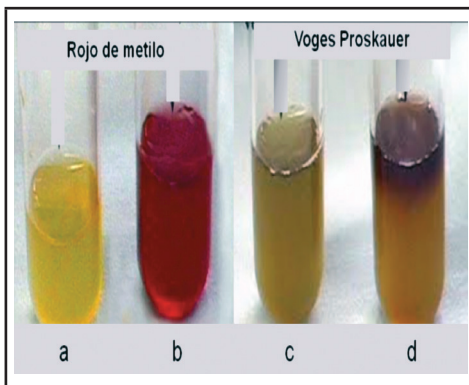


Foto 10. Prueba de Rojo de Metilo-Voges Proskauer (MR-VP)

- a) Prueba Rojo de Metilo negativa. El indicador no mantiene su coloración roja.
- b) Prueba Rojo de Metilo positiva. El indicador mantiene su coloración roja.
- c) Prueba de Voges Proskauer negativa.
- d) Prueba de Voges Proskauer positiva, el color rojo indica la producción de acetoina.

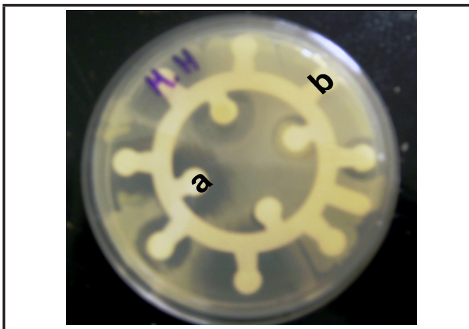


Foto 11. Antibiograma

- a) Se observan halos de inhibición de crecimiento bacteriano.
- b) No se observa inhibición.

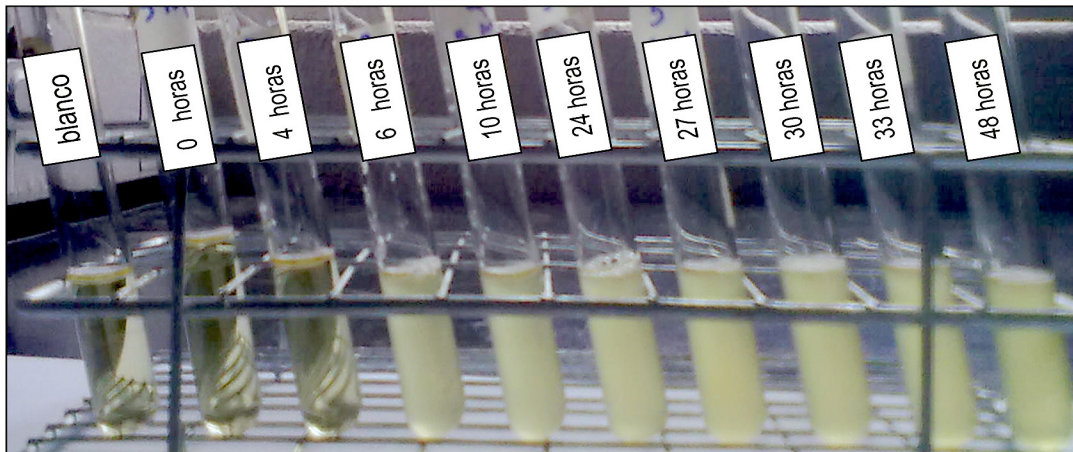


Foto 13. Curva de crecimiento

Cada tubo representa el crecimiento de la población en diferentes tiempos de 0 a 48 horas. Conforme se avanza en el tiempo de incubación, la turbidez del medio de cultivo incrementa.

Curso práctico de Microbiología

Se terminó de imprimir en diciembre de 2014,
con un tiraje de 200 ejemplares, más sobrantes para reposición.

Formado por: Mabel Karina López Sánchez



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Av. San Rafael Atlixco, No.186, Col. Vicentina,
C.P. 09340. Del. Iztapalapa, México D.F.
Tel. (01) 58044600