

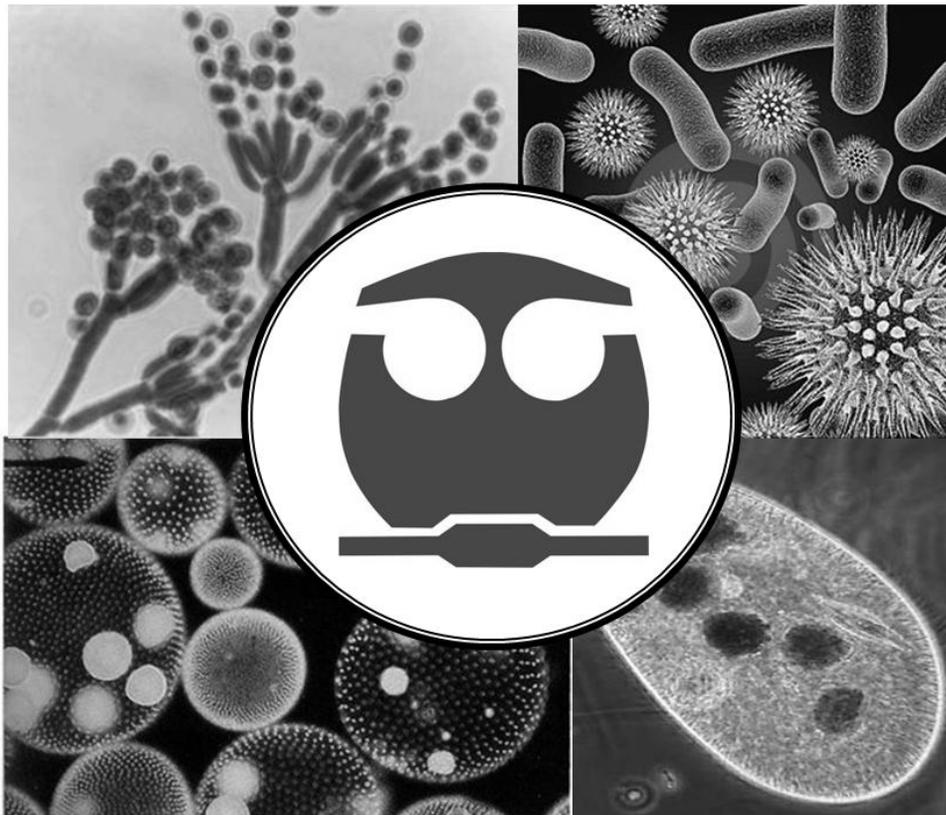
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Departamento de Biología

PROTOCOLO DE PRÁCTICAS

MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL



2012

INDICE

	Página
UNIDAD I. INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA	
PRÁCTICA 1. Bioseguridad en el laboratorio de microbiología.....	2
UNIDAD II. TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA	
PRÁCTICA 2. Uso y cuidado del microscopio de campo claro.....	6
PRÁCTICA 2.2 Preparaciones microbiológicas.....	10
PRÁCTICA 2.3 Esterilización y preparación de medios de cultivo.....	20
PRÁCTICA 2.3 Control de calidad de esterilización, zona y técnica aséptica.....	25
UNIDAD III. ESTUDIO DE CULTIVOS BACTERIANOS PUROS	
UNIDAD IV. ESTUDIO MICROSCÓPICO Y CULTIVO DE HONGOS	
PRÁCTICA 3.1, 3.4 Técnicas de siembra y de cultivo de bacterias y hongos.....	30
UNIDAD V. TÉCNICAS DE AISLAMIENTO	
PRÁCTICA 5.1 Aislamiento de microorganismos.....	43
UNIDAD VI. NUTRICIÓN MICROBIANA Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE BACTERIAS	
PRÁCTICA 6.1 Nutrición microbiana y requerimientos de oxígeno.....	56
PRÁCTICA 6.2 Uso de pruebas bioquímicas y técnicas rápidas para la caracterización fisiológica de bacterias.....	68
UNIDAD VII. TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y OTRAS MUESTRAS	
PRÁCTICA 7.1 Técnica de cuenta directa: método de Breed y método redox.....	82
PRÁCTICA 7.2 Método turbidimétrico.....	86
PRÁCTICA 7.3 Método de dilución y siembra por vertido en placa	88
PRÁCTICA 7.4 Método de filtración y siembra en placa.....	91
PRÁCTICA 7.5 Método del número más probable (NMP).....	93
UNIDAD VIII. CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL DESARROLLO, INHIBICIÓN Y DESTRUCCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS	
PRÁCTICA 8.1 Determinación del efecto de pH, temperatura y concentración de solutos.....	102
PRÁCTICA 8.2 Determinación del efecto letal y mutagénico de las radiaciones UV.....	102
PRÁCTICA 8.3 Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.....	102
UNIDAD IX. ASOCIACIONES MICROBIANAS	
PRÁCTICA 9. Mutualismo, comensalismo, antagonismo y sinergismo.....	111
UNIDAD X. ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN UN MICROAMBIENTE	
PRÁCTICA 10.1 Instalación de la columna de Winogradsky.....	120
PRÁCTICA 10.2 Observaciones microscópicas de la diversidad microbiana en la columna de Winogradsky.....	123
PRÁCTICA 10.3 Caracterización fisiológica de la diversidad microbiana en la columna de Winogradsky.....	128
Guía para la interpretación de la diversidad y sucesión microbiana en una columna de Winogradsky.....	136

UNIDAD I
INTRODUCCIÓN A LA MICROBIOLOGÍA

PRÁCTICA 1

Bioseguridad en el Laboratorio de Microbiología

Objetivos

Al finalizar la práctica el estudiante será capaz de:

- Aplicar las reglas básicas de higiene y seguridad para los laboratorios del área microbiológica.
- Analizar la importancia que tiene cada una de estas reglas, tanto en las actividades académicas de aprendizaje, como en el ejercicio profesional.

Introducción

Un punto primordial al inicio del trabajo experimental es conocer y aplicar las reglas generales de seguridad e higiene que deben cumplirse con la finalidad de salvaguardar la integridad y seguridad del personal que ahí labora. En el caso del área microbiológica el objeto de estudio son seres vivos que no podemos percibir a través de nuestros sentidos y muchos de ellos pueden ser agentes causantes de enfermedades.

Material

- Reglamento de Seguridad e Higiene para los Laboratorios de la Facultad de Química.
- Reglamento de Seguridad e Higiene de los Laboratorios del Departamento de Biología.
- Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos Biomédicos y Clínicos (material complementario).

Metodología

En grupos de trabajo, realizar la lectura y análisis del material asignado y exponerlo en un período máximo de cinco minutos, para ello:

- a. Discutir las normas generales de seguridad e higiene para cualquier laboratorio y aquellas que se aplican especialmente en el área microbiológica. Hacer especial hincapié en su importancia.
- b. Ubicar las zonas de seguridad y controles maestros de suministro de servicios.
- c. Establecer la utilidad de los desinfectantes, antisépticos y sanitizantes en el laboratorio de Microbiología.
- d. Simular los procedimientos a seguir en caso de accidentes, temblores, derrames y sobre la disposición de desechos en el laboratorio.
- e. Proponer otras guías de observación para verificar el cumplimiento de los reglamentos vigentes en los laboratorios.

Para todas las sesiones de laboratorio llenar la guía de observación (cuadro 1) u otra propuesta aprobada por los profesores.

Cuadro 1. Guía de observación para evaluar el cumplimiento de los Reglamentos de Seguridad e Higiene.

Fecha: Mesa: Nombre de quien evalúa:	NOMBRE DEL ALUMNO Y NÚMERO DE EQUIPO							
PERSONAL								
Bata limpia								
Uso de cofia								
Uso de cubrebocas								
Uso de lentes de seguridad								
Calzado cerrado								
Cabello recogido								
Sin joyería								
Uñas cortas y sin esmalte								
TRABAJO								
Limpieza del área de trabajo al iniciar sesión experimental								
Orden de las áreas de trabajo:								
a. mesa								
b. gaveta								
Depósito adecuado de los desechos								
Esterilización de material contaminado								
Entrega oportuna del material empleado en los ejercicios anteriores								
Respetar las instrucciones dadas para el ejercicio								
Limpieza del área de trabajo al finalizar sesión experimental								
Observaciones								

- Marcar cuando no se cumpla la acción
- Marcar cuando se cumpla la acción
- Marcar además con * cuando exista un comentario especial con respecto a la acción evaluada.
- Anotar el comentario en la parte de observaciones, en caso de ser insuficiente el espacio anotarlo al reverso con la fecha de la evaluación.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Por qué debemos seguir el reglamento de seguridad e higiene dentro del laboratorio de microbiología experimental?
2. ¿Crees que las medidas de seguridad e higiene que se aplican en el laboratorio de microbiología experimental son las adecuadas para el trabajo práctico?
3. ¿Cuál crees que sea la importancia a nivel personal de cumplir con las reglas de seguridad e higiene?
4. ¿Qué medidas de seguridad e higiene crees que no se cumplen en las instalaciones del laboratorio de microbiología experimental? ¿Cómo podrías mejorarlas?

Literatura de consulta

- Reglamento de Higiene y Seguridad de la Facultad de Química.2006. <http://www.fquim.unam.mx/sitio/>
- Reglamento para el Manejo, Tratamiento y Minimización de Residuos Generados en la Facultad de Química de la UNAM. 2007. Anexo de la Gaceta de la Facultad de Química. <http://www.quimica.unam.mx>
- NOM-026 STPS-1998. Colores y señales de seguridad e higiene, e identificación de riesgos por fluidos conducidos en tuberías.
- NOM-003 SEGOB-2002. Señales y avisos para protección civil. Colores, formas y símbolos a utilizar.
- NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos.
- NOM-087-ECOL-SSA1- 2002. Protección ambiental- Salud ambiental- Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos- Clasificación y especificaciones de manejo.
- INS. 2005. MAN-INS-001 Manual de Bioseguridad en Laboratorios de Ensayos Biomédicos y Clínicos. http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/normatividad/norref/MAN-INS-001%20Ed03%20BIOSEGURIDAD_%20IJL%2016_08_05.pdf
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Gavilán Irma, Vélez Guadalupe y Santos Elvira. Manual de hojas de seguridad de agentes infecciosos. FQ, UNAM, 2003.

UNIDAD II.
TÉCNICAS BÁSICAS DE MICROBIOLOGÍA

PRÁCTICA 2.1

Uso y cuidado del microscopio de campo claro

Objetivos

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

- Describir los cuidados básicos de un microscopio óptico de campo claro.
- Identificar cada una de las partes del microscopio y describir su funcionamiento.
- Enfocar adecuadamente el microscopio con todos sus aumentos.

Introducción

El microscopio es una de las herramientas más útiles en Microbiología. Su utilización permite la observación de los microorganismos y con ella la obtención de datos esenciales para su identificación, así como la descripción de características morfológicas, tintoriales, tamaño y agrupación; por ello es muy importante saber utilizar éste instrumento y desde luego cuidarlo adecuadamente.

Materiales

Muestras:

Agua de charco

Pulque

Alimento en estado de descomposición

Preparaciones de microorganismos

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Pipetas Pasteur con bulbo

Preparaciones fijas

Pincel de cerdas suaves

Material que deben tener los alumnos:

Asas bacteriológicas

Portaobjetos excavados

Portaobjetos

Cubreobjetos

Paño limpio de algodón

Papel seda

Letras (**a, b, f, g, r, t**) muy pequeñas recortadas de periódico o revistas

Palillos

Metodología

2.1.1 Cuidado del microscopio e identificación de sus componentes.

1. Recibir el microscopio sujetándolo firmemente con ambas manos y depositarlo sobre la mesa con suavidad.
2. Limpiar las partes mecánicas del microscopio con un paño (que no deje pelusa) limpio y seco.
3. Limpiar las lentes con un pincel libre de grasa.
4. Exhalar sobre la superficie de cada uno de las lentes oculares y limpiar con una hoja de papel seda; exhalar sobre el papel seda antes de limpiar las lentes objetivos.
5. Identificar cada uno de los componentes del microscopio.
6. Siga las instrucciones del profesor para manipular correctamente
 - El cable de conexión
 - La lámpara
 - El cabezal
 - Pinzas de sujeción
 - Tornillos de la platina y
 - Tornillos macrométrico y micrométrico
 - Revólver
 - Control de intensidad de la luz
 - Condensador
 - Diafragma
 - Lentes oculares
 - Lentes de los objetivos
7. Observar los datos del microscopio e identificar:
 - En el ocular, el coeficiente de aumento
 - En el objetivo:
 - a) El coeficiente de aumento
 - b) la apertura numérica
 - c) la longitud mecánica del tubo
 - d) el espesor del portaobjeto a emplear
8. Calcular el total de amplificación que se puede obtener con los diferentes objetivos.
9. Calcular el aumento útil de los diferentes objetivos.

2.1.2 Enfoque de la preparación

1. Alinear el objetivo de menor aumento con el tubo del microscopio.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con el dispositivo móvil.
3. Observando lateralmente y mediante el tornillo macrométrico llevar la platina lo más cercano posible al objetivo.
4. Observando a través de los oculares, ajustar el diafragma y el condensador para obtener la iluminación adecuada
5. Observando por los oculares y mediante el tornillo macrométrico bajar lentamente la platina hasta que aparezca la imagen del objeto.
6. Afinar el enfoque utilizando el tornillo micrométrico.

7. Para mejorar la nitidez de la imagen (dependiendo del modelo de microscopio):
 - a) Ajustar la intensidad de la luz, cerrando el diafragma de la lámpara o bajando ligeramente el voltaje de la misma.
 - b) Regular el contraste de la imagen con ayuda del diafragma de iris del condensador.
8. Mediante los tornillos de la platina, centrar perfectamente el objeto de estudio. Recordar que con mayor aumento el área de observación es menor, por lo que si el objeto de estudio no está perfectamente centrado puede quedar fuera del campo de observación.
9. Girar el revólver y alinear el objetivo de 40x con el tubo del microscopio. Recuerde que por la propiedad parafocal del microscopio, al enfocar un objetivo, los demás quedan en foco.
10. Observar por el ocular y verificar que la imagen permanece enfocada y que sólo es necesario mover el tornillo micrométrico o de precisión.
11. Girar el revólver a la posición media entre los objetivos de 40x y 100x, colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre la preparación y continuar girando hasta alinear el objetivo de 100x.
12. Observar por el ocular y verificar que la imagen permanece enfocada y sólo es necesario mover el tornillo micrométrico y en la mayoría de los casos aumentar la intensidad de la luz.
13. Al finalizar la observación de cada preparación y antes de retirarla, baje la platina, gire el revólver hacia el objetivo de menor aumento.
14. Después de retirar la preparación, limpiar el aceite que queda en el objetivo con papel seda.
15. Iluminar el microscopio varias veces y enfocar tantas preparaciones como sea posible.
16. Observar primero las letras, después colorante seco y luego las preparaciones de microorganismos proporcionadas por el profesor.
17. Al finalizar el trabajo, apague el equipo, limpie con papel seda las partes ópticas y con un paño las mecánicas.
18. Colocar el cabezal en su posición original y asegurarlo.
19. Arregle el cable.
20. Entregue el equipo transportándolo adecuadamente (ver punto 1. de 2.1.1).
21. Antes de retirarse, asegurarse que las mesas de trabajo, las tarjas y el laboratorio en general queden limpios.

Precauciones generales

- Nunca tocar las lentes con los dedos.
- No tocar la superficie del papel seda con la que se va a limpiar las lentes.
- Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- Cuando el microscopio no esté siendo utilizado debe permanecer apagado.

- El microscopio debe ser colocado en el centro de la mesa de trabajo, lejos de las orillas.
- En caso de derrames accidentales de muestras sobre el microscopio, limpiar las partes afectadas con una solución sanitizante a base de sales cuaternarias de amonio, NUNCA CON CLORO.
- El microscopio deberá ser protegido del polvo cubriéndolo con una funda o en un estuche.

Disposición de desechos

1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizar en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor
4. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Cuál es la importancia del uso del microscopio en el laboratorio de microbiología experimental?
2. ¿Por qué crees que es importante cuidar adecuadamente el microscopio en tu laboratorio de microbiología experimental?
3. ¿Qué otros cuidados crees que podamos adoptar en el laboratorio de microbiología experimental para mejorar el cuidado del microscopio?
4. ¿Cuáles crees que sean los errores más comunes que cometen, los alumnos en clase, al manipular el microscopio?

Literatura de consulta

- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis y P. R. Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

Objetivos

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

- Realizar diferentes preparaciones microbiológicas a partir de muestras naturales y cultivos puros.
- Describir las características morfológicas y de locomoción de microorganismos que se encuentran en muestras naturales.
- Realizar frotis fijos y tinciones simples.
- Identificar y describir las características morfológicas y de agrupación de bacterias y hongos levaduriformes.
- Identificar y describir las características microscópicas y tintoriales de las bacterias.
- Localizar y describir endosporas y cápsulas bacterianas.

Introducción

El tamaño de los microorganismos impide detectarlos a simple vista, por lo que es esencial el uso del microscopio. Para que un objeto pueda ser percibido a través del microscopio, este debe poseer cierto grado de contraste con el medio circundante. Para aumentar el contraste de los microorganismos y lograr una mejor observación de los mismos, se emplean diferentes técnicas de tinción, las cuales se basan en la capacidad de los microorganismos para retener (o no) ciertos colorantes lo que depende de la carga de la célula y del colorante.

La reacción a la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen se basa en la composición y estructura de la pared celular, que determina que unas bacterias retengan el primer colorante, en tanto que otras lo pierdan, lo que les permite reaccionar con el colorante de contraste. Las tinciones selectivas son aquéllas que permiten observar un organelo celular determinado. Algunas bacterias tienen la capacidad de producir endosporas y cápsulas. Los primeros son organelos de resistencia que se caracterizan por presentar una capa externa formada por un complejo de calcio, ácido dipicolínico y peptidoglicano. Debido a esta composición, es muy difícil que los colorantes penetren, por lo que al aplicar una tinción simple, estas aparecen como cuerpos incoloros (dentro o fuera de la célula). No obstante es posible teñirlas mediante la aplicación de métodos drásticos. Respecto a la cápsula, esta es una cubierta extracelular constituida por agua y polisacáridos que se acumulan alrededor de la célula. Estos componentes no se combinan con los colorantes, por lo que para la observación de la misma se emplean tinciones negativas con las que se oscurece el fondo y de esta manera se contrastan las cápsulas.

Materiales

Muestras:

Agua de charco

Pulque

Alimento en estado de descomposición

Cultivos puros de las siguientes bacterias y un hongo:

Bacillus sp.

Micrococcus luteus

Serratia marcescens

Staphylococcus sp.

Streptococcus sp.

Saccharomyces cerevisiae

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Pipetas Pasteur con bulbo

Preparaciones fijas

Frascos gotero con azul de metileno, safranina, cristal violeta

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas bacteriológicas

Portaobjetos excavados

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio

Piseta

Pinzas de madera para ropa

Paño limpio de algodón

Papel seda

Palillos

Vaselina sólida

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

Metodología

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar al aire a temperatura ambiente y flamearlos de 2 a 3 veces.

2.2.1 Preparaciones húmedas

1. Con una pipeta Pasteur colocar una gota de la muestra (agua o de pulque) en el centro del portaobjetos, cubrir la gota con un cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con los objetivos de 10x y 40x. Nunca con el objetivo de inmersión.
3. Esquematizar la morfología y movimiento de los microorganismos observados.

2.2.2 Gota pendiente

1. Con un palillo colocar un poco de vaselina alrededor de la concavidad del portaobjetos excavado.
2. Con una pipeta Pasteur tomar una gota de la muestra y colocarla en el centro del cubreobjetos.
3. Invertir el portaobjetos excavado y colocar la excavación sobre el cubreobjetos que tiene la muestra, procurando que ésta quede en el centro de la concavidad.
4. Oprimir suavemente la zona engrasada a fin de sellar y disminuir la evaporación.
5. Invertir la preparación y observar al microscopio con los objetivos de 10x y 40x.
6. Esquematizar la morfología y movimiento de los microorganismos observados.

2.2.3 Preparaciones fijas

2. Etiquetar los portaobjetos en uno de sus extremos.
3. Si la muestra del cultivo es sólida, colocar una pequeña gota de agua (con asa) en el centro del portaobjetos.
4. Esterilizar el asa de siembra y en condiciones asépticas tomar una pequeña cantidad del cultivo.
5. Mezclar suavemente el cultivo y el agua, con el asa, hasta obtener una suspensión homogénea y extenderla en el centro del portaobjetos.
6. Esterilizar el asa.
7. Si la muestra se toma de un cultivo líquido, no es necesario poner la gota de agua, solo extender directamente sobre el portaobjetos.
8. Dejar secar totalmente la preparación a temperatura ambiente.
9. Fijar el frote con calor, para ello cuando el frote está perfectamente seco pasar el portaobjetos por la flama del mechero de cuatro a cinco veces y dejar enfriar.

2.2.4 Tinción simple

1. Cubrir el frote fijo con 3 gotas del colorante básico (azul de metileno, safranina o cristal violeta) y dejar actuar durante 1 minuto.
2. Sobre una charola escurrir el colorante y lavar la preparación con el mínimo de agua, para ello inclinar el portaobjetos y en la parte superior aplicar el agua con una piseta de manera que resbale sobre el frote.
3. Colocar el portaobjetos inclinado sobre una toalla de papel absorbente y dejar secar a temperatura ambiente.
4. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
5. Esquematizar sus observaciones y describir las características de los microorganismos observados empleando los términos adecuados respecto a la morfología, agrupación y estructuras; ejemplos: a) bacilos largos con extremos redondos, b) cocos agrupados en cadenas denominadas estreptococos, c) célula móvil de forma ovoide con estructuras internas.

2.2.5 Tinciones diferenciales

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

Staphylococcus aureus ATCC 25923

Escherichia coli ATCC 25922

Cepas de prueba (X):

Bacillus sp

Klebsiella o *Serratia marcescens*

Moraxella sp

Mycobacterium sp.

Streptococcus oralis

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Frascos gotero con fucsina fenicada, azul de metileno de Loeffler, alcohol ácido

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinciones

Pinzas
Piseta
Paño limpio de algodón
Papel seda
Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

Metodología

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

Tinción de Gram

1. Etiquetar tres portaobjetos por uno de sus extremos con los nombres de: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y el tercero con la bacteria X.
2. Preparar los frotis bacterianos a partir de cultivos líquidos o sólidos.
3. Fijar con calor (mechero).
4. Agregar cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
5. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de colorante.
6. Agregar lugol en cantidad suficiente para cubrir el frote (2 a 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
7. Lavar con el mínimo de agua para eliminar el exceso de mordente.
8. Decolorar con alcohol acetona hasta que el efluente salga incoloro.
9. Lavar con agua para eliminar el exceso de disolvente.
10. Agregar safranina en cantidad suficiente hasta cubrir el frotis (2 ó 3 gotas) y dejar actuar 1 minuto.
11. Lavar con agua para eliminar el exceso del colorante de contraste.
12. Dejar secar la preparación a temperatura ambiente.
13. Observar al microscopio con los objetivos de 10x, 40x y 100x.
14. Esquematizar las observaciones realizadas con el objetivo de mayor aumento y describir las características de los microorganismos observados e indicar si son Gram positivos o Gram negativos (cuadro 2).

Tinción de Ziehl Neelsen

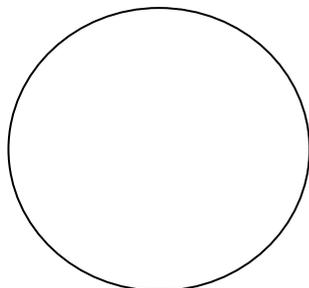
1. Etiquetar los portaobjetos por uno de sus extremos.
2. En el portaobjetos colocar 1 gota del cultivo de *Mycobacterium sp.* y 1 gota del cultivo de *Staphylococcus aureus*.
3. Con el asa mezclar las dos suspensiones.
4. Secar al aire y fijar con calor (mechero).

5. Cubrir la preparación con un papel filtro y saturarla con fucsina básica fenicada, calentar la preparación pasando la flama del mechero. Dejar actuar el colorante durante 10 minutos cuidando que no se seque la preparación.
6. Dejar enfriar la preparación.
7. Con unas pinzas largas retirar el papel filtro y colocarlo en un frasco para su posterior desecho.
8. Lavar con abundante agua (hasta que el efluente salga incoloro).
9. Decolorar con alcohol ácido el que se agrega gota a gota hasta que el efluente salga incoloro.
10. Lavar la preparación.
11. Cubrir la preparación con 2 a 3 gotas de azul de metileno de Loeffler y dejar actuar 2 minutos.
12. Lavar el exceso de colorante con el mínimo de agua.
13. Secar a temperatura ambiente.
14. Observar al microscopio con el objetivo de 100x.
15. Esquematizar sus observaciones y describir las características de los microorganismos e indicar si son Bacterias Ácido Alcohol Resistentes (BAAR) o bacterias No Ácido Alcohol Resistentes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características microscópicas de bacterias, de acuerdo a la tinción de Gram y de Ziehl-Neelsen.

Microorganismo	Forma ¹	Agrupación ²	Gram / Ácido resistencia ³	Esquema ⁴

¹Forma: bacilo, coco, cocobacilo, espirilo, otro; ²Agrupación: pares, cadena, racimo, ninguno, otro; ³Gram: positivo, negativo, no determinado. BAAR: positivo, negativo, no determinado; ⁴De acuerdo a la figura 1.



Fecha: _____
 Muestra: _____
 Tinción: _____
 Preparación: _____
 Aumento: _____
 Descripción: _____

Figura 1. Esquema de un campo microscópico para reportar observaciones microscópicas.

2.2.6 Tinción selectiva (endospora)

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

Bacillus subtilis

Bacillus megatherium

Bacillus cereus

Material por equipo

Microscopio

Aceite de inmersión

Vaso de precipitados de 250 ml

Charola de metal

Tripie o anillo

Papel filtro (cuadros 2x2cm)

Frascos goteros con verde de malaquita y safranina al 0.5% (no usar el de Gram)

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de punta roma

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

Metodología

Lavar y desengrasar los portaobjetos y cubreobjetos. Para ello emplear jabón líquido y agua; enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 a 3 veces.

1. Etiquetar los portaobjetos por uno de sus extremos.
2. Preparar 2 frotos fijos a partir de cultivos de las diferentes especies de *Bacillus*.
3. Aplicar una tinción simple a uno de los frotos de cada bacteria (ver ejercicio 2.2.1).
4. Cubrir el segundo frote de cada microorganismo con papel filtro y saturarlo con verde de malaquita.

5. Calentar la preparación sobre un vaso de precipitados con emisión de vapores de agua durante 10 minutos, cuidando que el colorante no hierva y mantener la preparación húmeda.
6. Retirar el papel filtro con unas pinzas y colocarlo en un frasco para su posterior desecho.
7. Lavar con el mínimo de agua.
8. Agregar 3 gotas de una solución de safranina al 0.5% y dejarla reaccionar durante 30 segundos.
9. Lavar, dejar secar a temperatura ambiente y observar con el objetivo de 100x.

2.2.7 Tinción negativa (cápsula)

Materiales

Muestras:

Pulque

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

Leuconostoc sp.

Azotobacter sp.

Bacillus sp.

Material por equipo

Microscopio

Aceite de inmersión

Frascos goteros con nigrosina (recién filtrada), tinta china 1:1, azul de metileno, cristal violeta y safranina de Gram.

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Portaobjetos

Cubreobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de punta roma

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Frasco con una solución de sanitizante para desechar preparaciones

Metodología

1. En el extremo del portaobjetos, colocar una gota de agua y una de tinta china y mezclar.
2. Suspender una asada del cultivo de *Leuconostoc sp*, en la mezcla anterior.
3. Colocar el borde de otro portaobjetos sobre la gota y deslizar éste sobre el porta que contiene la muestra formando una película delgada.
4. Dejar secar al aire (NO FIJAR).
5. Cubrir el frote con cristal violeta o fucsina fenicada, dejar actuar durante un minuto.
6. Lavar, dejar secar a temperatura ambiente y observar la preparación con el objetivo de inmersión.
7. Repetir el procedimiento con los cultivos de *Azotobacter sp*., *Bacillus sp* o con la muestra de pulque.

Precauciones generales

- Procura preparar un frote delgado y sin extender demasiado sobre el portaobjetos.
- Cuando se fija la preparación al mechero, cuida que el portaobjetos no se caliente demasiado.
- Respeta los tiempos designados para cada colorante.
- Busca un buen campo microscópico (células separadas, bien teñidas, que se defina bien la morfología y sin manchas de colorantes) para realizar descripciones confiables de tus microorganismos.
- Para la observación de preparaciones húmedas baja la intensidad de luz y contrasta la imagen con ayuda del diafragma iris del microscopio.
- Primero prepara todos los frotos de tus muestras, apaga el mechero y posteriormente procede a la tinción.
- No pierdas de vista el objetivo de cada tinción diferencial, cuándo se considera una bacteria Gram positiva, cuándo una Gram negativa, en comparación de una BAAR positiva y de una BAAR negativa.
- Las preparaciones hechas para observar cápsula no deben fijarse con calor.
- Procura no saturar con verde de malaquita la preparación para observar endospora.

Disposición de desechos

1. Después de efectuar las observaciones, los portaobjetos se sumergen durante 10 minutos en una solución sanitizante de hipoclorito de sodio al 10% a partir de una solución comercial, después se lavan con detergente líquido, se enjuagan y se sumergen en alcohol al 95% durante 24 horas.
2. En caso de que las preparaciones se rompan, envolverlas en papel, esterilizarlas en autoclave y desecharlas en el contenedor exclusivo para material roto de vidrio.
3. Los portaobjetos rotos o dañados que se encuentren limpios se colocan directamente en el mismo contenedor.

4. Esterilizar en autoclave los cultivos bacterianos y muestras empleadas y desecharlas.
5. Los desechos de colorantes se colocan en los contenedores dispuestos para este fin en cada laboratorio. Posteriormente se someten a adsorción con carbón activado y el agua libre de colorante es desechada.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Qué diferencias encuentras en las observaciones al microscopio al realizar preparaciones húmedas y fijas?
2. ¿Qué ventajas presenta una preparación húmeda respecto a una fija, en el estudio de microorganismos?
3. ¿Qué tipo de microorganismos te fueron fácilmente reconocibles en una preparación en fresco?
4. Comparar los resultados obtenidos de la bacteria X con las cepas control
5. Analizar las posibles causas de error en el procedimiento o los factores que contribuyeron a la correcta tinción de las bacterias en estudio.
6. ¿Puede una bacteria Gram positiva teñirse como una Gram negativa? ¿Por qué?
7. ¿Qué sugerencias le propondrías a tus compañeros, de nuevo ingreso al LME, para reconocer la morfología y agrupación de las bacterias en una tinción simple?
8. Distingue en tus preparaciones las endosporas de las esporas libres.
9. Distingue la diferencia de las endosporas de cada una de las especies del género *Bacillus* que trabajaste en clase.
10. ¿Fue fácil reconocer las cápsulas bacterianas? ¿Por qué?
11. ¿Qué estrategia sugieres para reconocer y localizar más eficazmente las cápsulas bacterianas?
12. Discute sobre la información que te proporciona cada una de las tinciones realizadas en sesiones anteriores.

Literatura de consulta

- Balows, A. 2005. Manual of Clinical Microbiology. 5ª edición. A. Society for Microbiology, Washington, USA.
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Díaz, R., G. Gamazo e I. López Goñi. 1995. Manual Práctico de Microbiología. 1ª edición. MASSON, S. A. España
- Leboffe, M. J., y B. E. Pierce. 2006. Microbiology Laboratory and application. 2a edición. Morton Publishing Co., USA.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Muggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

PRÁCTICA 2.3

Esterilización y Preparación de Medios de Cultivo

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Explicar el concepto de esterilización y su utilidad en microbiología.
- Preparar correctamente el material que se someterá a esterilización.
- Aplicar algunas metodologías para esterilizar material y medios de cultivo.
- Comprobar la efectividad del proceso de esterilización.
- Explicar el concepto de medio de cultivo en microbiología.
- Eliminar adecuadamente los desechos biológicos.

Introducción

Para el estudio de los microorganismos es indispensable contar entre otras cosas con material y medios de cultivo estériles. En microbiología la esterilización se define como “el proceso mediante el cual se eliminan todos los microorganismos (incluyendo formas de resistencia) de un objeto, medio o superficie” y su aplicación garantiza la ausencia de microorganismos en el material y medios de cultivo a ser empleados. Existen diversos métodos de esterilización, entre ellos: calor (seco o húmedo), filtración (para sustancias termolábiles y aire), radiaciones y aplicación de gas de oxido de etileno (para jeringas y cajas de plástico).

Un medio de cultivo está constituido por una mezcla de agua y sustancias orgánicas e inorgánicas, los que en conjunto proporcionan los requerimientos nutricionales para el desarrollo de los microorganismos. La composición de los medios de cultivo varía en función de: a) grupo microbiano que se pretende estudiar, b) complejidad química, c) estado físico, y d) aplicación.

Materiales

Material por grupo:

Balanzas granatarias

Potenciómetro

Espátulas

Tiras de papel kraft de 2.5 cm de ancho (para envolver pipetas)

Tiras de papel kraft de 20 cm de ancho (para envolver cajas)

Indicador biológico de esterilización (ampolletas o tiras de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophilus*)

Agua destilada

Caldo nutritivo o caldo tripticasa soya (medio de cultivo líquido deshidratado)

Gelosa nutritiva o tripticasa soya agar (medio de cultivo sólido deshidratado)

Agar-Agar
Solución de NaOH 1.0 N,
Solución de HCl al 10%

Material por equipo:

Tripie
Charola metálica para tripié
Matraz Erlenmeyer de 50 mL
Matraz Erlenmeyer de 250 o 300mL
Probeta de 100 o 250 mL
Varilla de vidrio
Gradilla
Pipeta de 10 mL
Pipetas de 1.0 mL
Pipetas Pasteur (esterilizar para la siguiente clase)
Tubos de ensayo de 16x150
Tubos de ensayo de 22x175
Hisopos (palitos de madera con algodón)

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Piseta
Papel kraft o de estraza
Maskin-tape
Clips
Plumones indelebles de punto grueso
Cestos o latas metálicas (frutas en conserva, 350 g)

Metodología

a) Preparación y esterilización de material de vidrio.

1. Lavar material con detergente líquido, enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada.
2. Secar el material de vidrio de preferencia en horno, si no es posible secar al aire.
3. En las pipetas de 1.0 mL colocar (con un clip) un filtro de algodón en la boquilla.
4. Envolver las cajas de Petri y pipetas con papel kraft de acuerdo a las indicaciones del profesor.
5. Introducir los hisopos en un tubo de 22x175 y tapar con algodón.
6. En el papel de la envoltura identificar con nombre y marcar el volumen de las pipetas.
7. Introducir el material en un horno previamente calentado a 180°C, esperar a que la temperatura se establezca nuevamente y a partir de este momento contar el tiempo de esterilización (1 hora).

b) Preparación y esterilización de medios de cultivo.

1. Leer cuidadosamente el membrete del medio de cultivo deshidratado (caldo y agar).
2. Calcular la cantidad necesaria para preparar 70 mL de caldo del medio de cultivo deshidratado (ver figura 2).
3. Pesarse la cantidad calculada del medio deshidratado. Esta operación debe ser rápida para evitar que la humedad del ambiente no afecte el resto del contenido del frasco.
4. Disolver el medio en 50 mL de agua destilada en un matraz de 250 mL, y una vez disuelto completar el volumen con 20 mL más.
5. Ajustar el pH entre 6.8 y 7.2.
6. Colocar 10 mL de caldo en 5 tubos de 16x150 c/u.
7. Colocar 20 mL del caldo en el matraz de 50 mL y calcular la cantidad necesaria de agar-agar para obtener un medio semisólido (2 g agar/ 1 L medio).
8. Tapar el matraz y calentar hasta disolver totalmente, procurando agitar repetidamente.
9. Una vez fundido el medio de cultivo semisólido colocar 10 mL en 2 tubos de 16x150 c/u.
10. Calcular la cantidad necesaria para preparar 90 mL de medio de cultivo sólido deshidratado y seguir los pasos 3 y 4.
NOTA: Un medio de cultivo sólido (agar) se puede preparar a partir del medio de cultivo líquido (caldo), agregando a éste la cantidad necesaria de agar-agar (15 a 20 g agar/ 1 L medio) para el volumen de medio deseado.
11. No medir pH. No es recomendable para medios que contienen agar-agar.
12. Tapar el matraz y calentar hasta disolución total, para ello agitar repetidamente y evitar que el medio de cultivo hierva y se derrame.
13. Distribuir el medio de cultivo en el siguiente material:
 - 20 mL en 2 tubos de 22x175
 - 10 mL en 2 tubos de 16x150
 - 7 mL en 4 tubos de 16x150
14. Tapar cada uno de los tubos con algodón, etiquetarlos y esterilizarlos en autoclave a 121°C y 15 lbs. de presión durante 20 minutos.
15. Actividad para un equipo por mesa. En uno de los tubos que contiene 10 mL de caldo, colocar una ampolla o una tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (indicador biológico de esterilidad).
16. Acomodar los tubos (incluyendo el que contiene el indicador biológico) de acuerdo a su estado físico en tres latas o cestos metálicos (líquido, semisólido y sólido) y cubrir con papel kraft o de estraza.
17. Esterilizar este material en autoclave a temperatura de 121°C, a 15 lbs. de presión durante 10 a 20 minutos (dependiendo de la cantidad de material).
18. Antes de abrir el autoclave, asegurarse que baje la temperatura y que la presión interior sea igual a la del exterior.

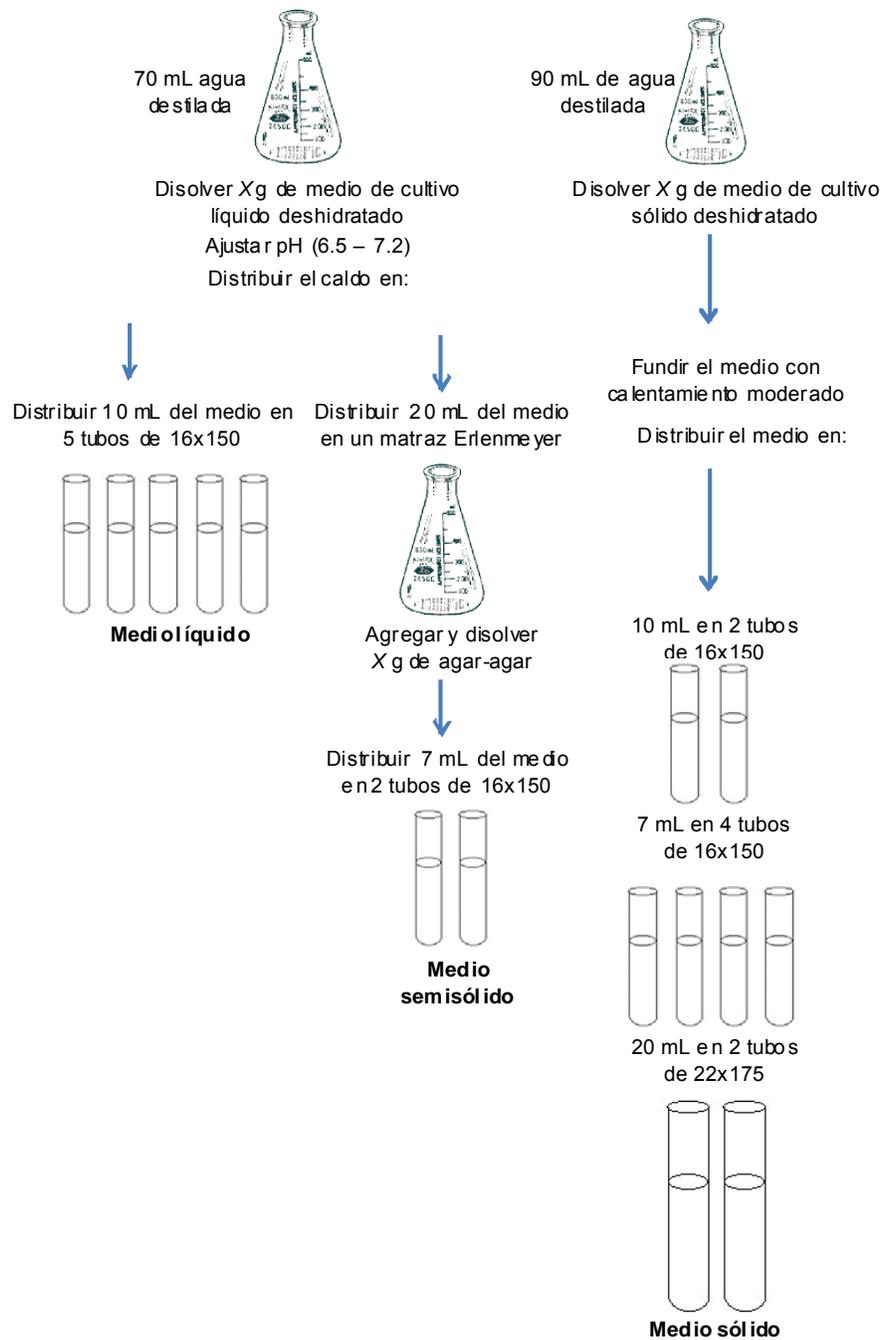


Figura 2. Preparación de medios de cultivo.

Precauciones generales

- Al calentar los medios de cultivo con agar-agar es muy importante procurar agitar repetidamente el medio para evitar que el agar-agar se pegue en el fondo del matraz y que se quemé. Asimismo evitar que hierva para evitar su derrame.
- Etiquetar debidamente tu material de vidrio (tubos de ensayo, matraces) antes de verter los medios de cultivo en ellos. Procura no utilizar masking-tape.
- Los cestos o las latas metálicas deben estar debidamente forradas con papel kraft o de estraza.
- El material donde se preparó el medio de cultivo sólido (agar-agar) debe ser lavado con agua y jabón inmediatamente después de su uso. Así evitarás que el agar-agar se pegue al vidrio.
- Antes de mandar a incubar el material con los medios de cultivo, verifica la manera cómo hay que prepararlo para que sean recibidos (Reglamento del Área de Esterilización e Incubación).

Disposición de desechos

1. Colocar el medio de cultivo sólido sobrante sobre un papel y envolverlo, colocar el paquete en una bolsa de plástico y desecharlo en el contenedor rojo.

Guía para la discusión de resultados

1. Discute acerca de la importancia de tener el material de vidrio perfectamente limpio, previo a su uso.
2. ¿Cuál es el punto crítico para preparar un medio de cultivo sólido?
3. Discute los cálculos para preparar los medios de cultivo en sus diferentes estados físicos.

Literatura de consulta

- Balows, A. 2005. Manual of Clinical Microbiology. 5ª edición. A. Society for Microbiology, Washington, USA.
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Díaz, R., G. Gamazo e I. López Gofí. 1995. Manual Práctico de Microbiología. 1ª edición. MASSON, S. A. España
- Leboffe, M. J., y B. E. Pierce. 2006. Microbiology Laboratory and application. 2a edición. Morton Publishing Co., USA.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Muggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

PRÁCTICA 2.3.2

Control de Calidad de Esterilización, Zona y Técnica Aséptica

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Verificar el proceso de esterilización de material mediante el uso de bioindicadores.
- Verificar la eficacia de la zona y la técnica aséptica.
- Manipular el material estéril en zona y con técnica aséptica.

Introducción

Una vez que el material ha sido sometido a un proceso de esterilización, es indispensable comprobar que ha quedado estéril, para ello se emplean indicadores o controles físicos, químicos y biológicos (bioindicadores) que nos informan acerca de la efectividad de dicho proceso, los cuales se adjuntan al material previo a esterilizar.

Antes de trabajar con el material estéril es importante dejarlo enfriar para evitar condensaciones, verificar que las envolturas mantienen su integridad y que sigue debidamente etiquetado. Posteriormente, el material estéril se trabaja en condiciones de asepsia, es decir, se coloca en una zona comprendida dentro de un área limpia, diseñada y construida para minimizar la contaminación por microorganismos viables y no viables manteniéndola dentro de límites preestablecidos, llamada zona aséptica; y se manipula con una técnica aséptica, la cual constituye un conjunto de procedimientos y actividades que se realizan con el fin de disminuir al mínimo las posibilidades de contaminación microbiana.

Materiales

Material por equipo:

Cajas Petri con TSA
Tripie
Charola metálica

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Asas
Gradilla
Cajas de Petri de plástico estériles desechables
Pinzas largas con punta roma

Material preparado la sesión anterior:

4 tubos de 16x150 con 7 mL del medio sólido

2 tubos de 22x175 con 20 mL de medio sólido

Por mesa 2 tubos de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo

Metodología

1. Fundir el medio sólido que se encuentra en 2 tubos de 22x175 con 20 mL y en 4 tubos de 16x150 con 7 mL (preparados en la sesión anterior).
2. Una vez fundido el medio, colocar los 4 tubos de 16x150 con 7 mL de medio en posición inclinada y dejar solidificar. Los 2 tubos de 22x175 con 20 mL de medio mantenerlos en baño María a 50°C.

a) Comprobación de esterilidad.

Actividad para 1 equipo por mesa.

1. Separar el tubo en el que colocaron la tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (indicador biológico de esterilidad) y etiquetar como “estéril”
2. Separar 1 tubo con caldo y en condiciones de asepsia colocar una tira de papel filtro impregnada con esporas de *Geobacillus stearothermophilus* (indicador biológico de esterilidad) y etiquetar como “control”.
3. Incubar los 4 tubos a 55°C durante 48 horas.

b) Comprobación de zona aséptica.

1. Lavar y desinfectar la mesa, delimitar el área de trabajo y encender el mechero para crear una zona aséptica.
2. Colocar las 3 cajas de Petri con TSA o gelosa nutritiva a 10 cm (Caja 1), 15 cm (Caja 2) y 20 cm (Caja 3) de distancia del mechero y dejarlas destapadas durante 30 minutos.
3. Incubar las cajas a 28°C durante 24 horas y registrar resultados en el cuadro 3.

c) Comprobación de técnica aséptica.

1. En condiciones de asepsia vaciar el contenido de los tubos (22x175) en dos cajas de Petri de plástico y dejar solidificar.
2. Marcar la caja por el reverso, dividiéndola en 2 secciones.
3. Esterilizar el asa al mechero, dejar enfriar y trazar una estría en el sector 1.
4. Incubar las cajas a 28°C durante 24 horas y registrar resultados en el cuadro 3.
5. Guardar los medios preparados para la próxima sesión.

Cuadro 3. Resultados de la comprobación de esterilización, zona y técnica aséptica.

Comprobación de:	Material	Desarrollo microbiano
Esterilidad	1 Bioindicador (estéril)	*
	1 Bioindicador (control)	*
	2 Tubos con caldo	*
	2 Tubos con medio semisólido	*
	4 Tubos con gelosa inclinada	*
	2 Tubos con gelosa vertical	*
Zona aséptica	Caja 1	*
	Caja 2	*
	Caja 3	*
Técnica aséptica	Sector 1	*
	Sector 2	*

*Indicar: + = presencia de desarrollo microbiano, - = ausencia de desarrollo microbiano.

Precauciones generales

- Asegurarse de que el medio de cultivo este perfectamente fundido (sin grumos y de un color claro) antes de ser vertido a las cajas Petri.
- Antes de esterilizar el material para su desecho, retirar etiquetas, maskin-tape y escritura con plumón.

Disposición de desechos.

1. Separar el material en el que se haya registrado desarrollo microbiano y proceder a prepararlo de la siguiente manera:
 - a) Cajas de Petri de plástico. Asegurarlas con maskin-tape y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1 A.
 - b) Recipientes de vidrio. Esterilizar en autoclave y posteriormente retirar el medio de cultivo sólido, envolver en papel, colocar el paquete en una bolsa de plástico y colocarla en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1 A.
2. Depositar el papel de envoltura en el bote de basura correspondiente.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Cuál es la importancia de verificar la eficacia de la esterilización de las autoclave del “Área de Esterilización e Incubación” del laboratorio de microbiología experimental.
2. Según tus resultados, ¿cuál es la calidad de tu zona y técnica aséptica?, ¿A qué lo atribuyes? ¿Cómo mejorarías esta situación?

Literatura de consulta

- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Díaz, R., G. Gamazo e I. López Goñi.1995. Manual Práctico de Microbiología. 1ª edición. MASSON, S. A. España
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Prentice Hall Iberia. España.
- Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-1993, Buenas Prácticas de fabricación para establecimientos de la industria químico farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos. 31/07/1998
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis y P. R. Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Zinsser. Microbiología. 1994. Ed. Panamericana. 1699 pp

UNIDAD III.
ESTUDIO DE CULTIVOS BACTERIANOS PUROS

UNIDAD IV.
**ESTUDIO MICROSCÓPICO Y CULTIVO DE
HONGOS**

PRÁCTICA 3.1
Técnicas de Siembra para el Cultivo de Bacterias

PRÁCTICA 4.1
Técnicas de Siembra para el Cultivo de Hongos

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Aplicar las diferentes técnicas de siembra que se emplean para el estudio y aislamiento de bacterias y hongos (levaduriformes y filamentosos).
- Relacionar la presentación del medio de cultivo con la técnica de siembra.
- Distinguir las condiciones de incubación para el cultivo de bacterias y hongos.
- Describir las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las bacterias y hongos (levaduriformes y filamentosos).
- Comprobar la pureza de los cultivos mediante tinciones simples y/o diferenciales.

Introducción

La caracterización de microorganismos se basa en la observación de las características microscópicas y de desarrollo que presentan en diferentes medios de cultivo. Para esto último se aplican técnicas de siembra específicas para cada microorganismo y de acuerdo a la presentación del medio.

La formación de colonias visibles con características particulares permite diferenciar a los microorganismos, así como detectar contaminantes en los cultivos puros. Las colonias provenientes de un mismo microorganismo deben ser iguales en forma, tamaño y color; al microscopio deben presentar las mismas características morfológicas y tintoriales.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia:

Serratia marcescens

Pseudomonas aeruginosa

Bacillus sp.

Micrococcus luteus

Proteus vulgaris

Staphylococcus aureus

Streptomyces erythraeus

Streptomyces griseus

Cultivos puros de los siguientes hongos

Saccharomyces cerevisiae

Rhodotorula sp.

Penicillium sp.

Aspergillus niger

Rhizopus sp.

Alternaria sp.

Fusarium sp.

Geotrichum sp.

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Tubos de ensayo de 16x150 con 7 mL de Solución Salina Isotónica (SSI)

Cajas de Petri con TSA

Cajas con YPDM

Cajas con Agar Sabouraud

Asa micológica

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Cestos o latas metálicas (frutas en conserva, 350 g)

Material preparado la sesión anterior (PRÁCTICA 2.3):

2 tubos de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo

2 tubos de 16x150 con 10 mL de medio semisólido

4 tubos de 16x150 con 7 mL de medio sólido inclinado

2 tubos de 16x150 con 10 mL de medio sólido (fundir)

2 tubos de 22x175 con con medio sólido (fundir)

Metodología

a) Siembra de bacterias.

1. Sembrar 2 bacterias diferentes por cada equipo.

2. A partir del cultivo puro preparar un frote, teñir con Gram y observar con objetivo 100x (ver Figura 3).
3. Registrar sus observaciones.
4. Organizar el material de modo que cada alumno cuente con lo siguiente material:
 - 3 cajas de Petri con TSA
 - *2 tubos de 16x150 con caldo nutritivo
 - *2 tubos de 16x150 con agar sólido inclinado
 - *1 tubo de 16x150 con medio semisólido
 - *1 tubo de 16x150 con medio sólido (fundir)
 - * Material preparado la sesión anterior (PRÁCTICA 2.3).
5. Identificar las cajas de Petri y tubos de ensayo con plumón indeleble con los siguientes datos:

Clave de la material y grupo: _____
 Nombre del alumno: _____
 Muestra: _____
 Fecha de siembra: _____

6. A partir del cultivo puro transferir 0.2 mL a uno de los tubos de ensayo de 16x150 con 10 mL de caldo nutritivo (Tubo 1).
NOTA: Cuando el cultivo se encuentre en estado sólido transferir 2 asadas.
7. A partir del Tubo 1 inocular el siguiente material:
 - *1 tubo de 16x150 con caldo nutritivo (2 asadas).
 - *2 tubos de 16x150 con agar sólido inclinado (uno con estría recta y otro con estría ondulada).
 - *1 tubo de 16x150 con agar semisólido mediante (picadura con asa recta o en aguja).
 - *1 tubo de 16x150 con medio sólido fundido (3 a 4 gotas con la pipeta Pasteur).
 - *2 cajas de Petri (una con estría simple y otra con cuadrante radial).
 - *1 caja de Petri (técnica de extendido o siembra masiva con hisopo).
8. Sellar las cajas con maskin-tape e invertirlas (tapa abajo, base arriba).
9. Colocar las cajas y los tubos en un recipiente (cesto o lata metálica) debidamente identificado e incubar 24 horas a 37°C en condiciones aeróbicas.

b) Siembra de actinobacterias o bacterias filamentosas.

1. Sembrar 2 bacterias diferentes por cada equipo.
2. Repetir los incisos 1 y 2.
3. Colocar con una pipeta Pasteur estéril en un extremo de la placa de YPDM dos gotas del cultivo. de *Streptomyces griseus* o *Streptomyces erythraeus*
4. Esterilizar el asa y estriar el cultivo sobre el medio con la técnica de estría radial.
5. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a temperatura ambiente durante 3 a 7 días.

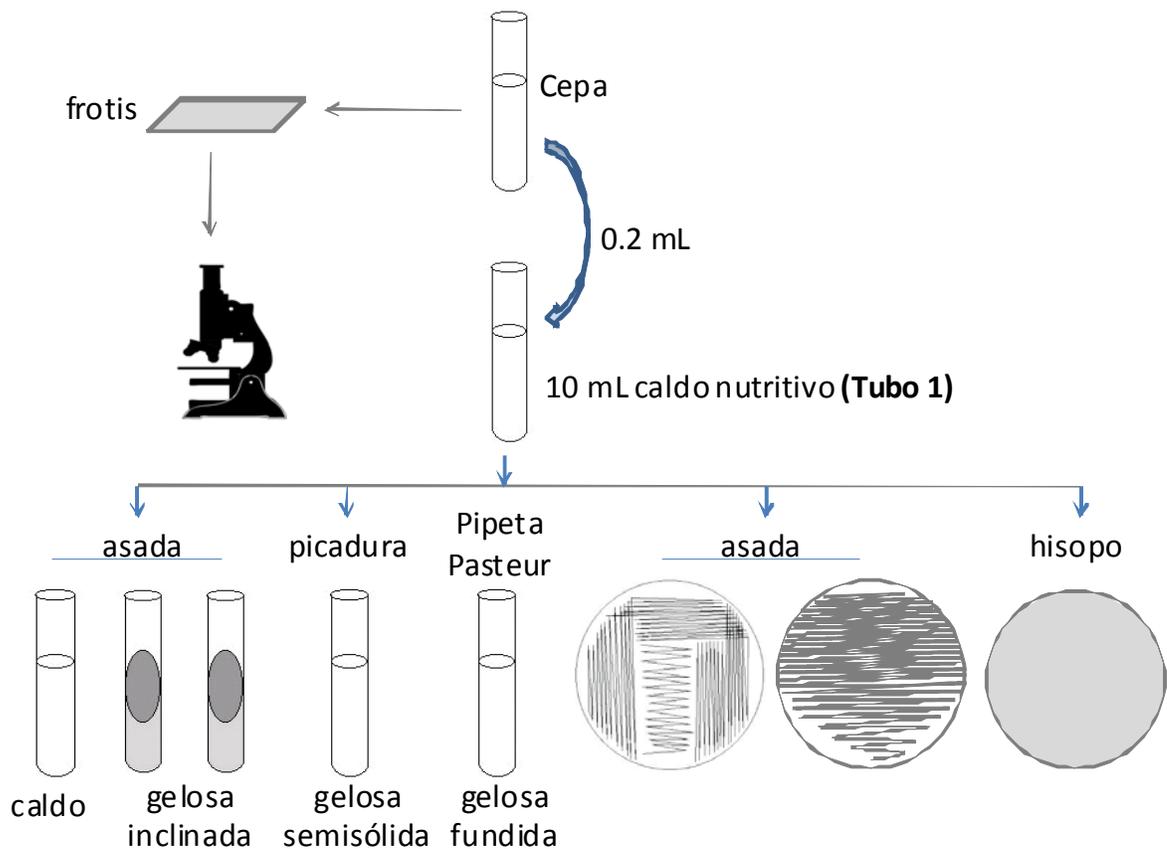


Figura 3. Técnicas de inoculación de bacterias.

b) Siembra de actinobacterias o bacterias filamentosas.

6. Sembrar 2 bacterias diferentes por cada equipo.
7. Repetir los incisos 1 y 2.
8. Colocar con una pipeta Pasteur estéril en un extremo de la placa de YPDM dos gotas del cultivo. de *Streptomyces griseus* o *Streptomyces erythraeus*
9. Esterilizar el asa y estriar el cultivo sobre el medio con la técnica de estría radial.
10. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a temperatura ambiente durante 3 a 7 días.

c) Siembra de hongos levaduriformes.

1. Sembrar 2 levaduras diferentes por cada equipo.
2. Inocular con el asa 1 placa de Agar Sabouraud con el cultivo de *Rhodotorula* sp. o *Saccharomyces* sp. mediante la técnica de estría radial.
3. Sellar las cajas, invertirlas e incubar a temperatura ambiente durante 2 a 5 días.

d) Siembra de hongos filamentosos.

1. Sembrar 2 hongos diferentes por cada equipo.
2. Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar dentro de la zona aséptica.
3. Tomar una pequeña cantidad del cultivo del hongo seleccionado y sembrar en el centro de la placa de Agar Sabouraud, para ello presionar ligeramente el asa sobre la placa.
4. Sellar las cajas e invertirlas.
5. Incubar a 28°C durante 7 días.

Precauciones generales

- Al etiquetar tu material, tener cuidado de que las anotaciones queden en la periferia de la tapa de la caja de Petri o a 2 cm de la boca del tubo de ensayo.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y conservarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
4. Los cultivos de referencia y los cultivados en clase deben ser esterilizados en autoclave antes de ser desechados.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Por qué las bacterias filamentosas se siembran de diferente forma que las bacterias no filamentosas?
2. ¿Por qué los hongos levaduriformes se siembran de igual forma que las bacterias?
3. ¿Por qué los hongos filamentosos se siembran por picadura?
4. ¿Qué pasaría si sembraras un hongo filamentoso por agotamiento por estría recta?

a) Resultados del desarrollo de bacterias

Materiales

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Metodología

1. Describir las características de desarrollo en los tubos (medio líquido, semisólido y sólido) y en las cajas de acuerdo con las guías de observación del Manual de Microbiología General.
2. A partir del cultivo líquido y de dos colonias aisladas preparar 3 frotos y teñir con Gram.
3. Registrar sus resultados en el cuadro 4.

Disposición de desechos

1. Ver incisos 1 a 4 de la 1ª Sesión (PRÁCTICA 3.1).
2. Después de observar las características de desarrollo microbiano, esterilizar los cultivos en autoclave.
3. Antes de esterilizar los tubos de ensayo retira las etiquetas (plumón, etiqueta o maskin-tape).
4. Vaciar el agar fundido en una bolsa de plástico y depositarla en el contenedor correspondiente.
5. Sujetar con maskin- tape las cajas de plástico con cultivos y depositarlas en el contenedor rojo del laboratorio 1A.
6. Las cajas de Petri de vidrio se colocan de forma no invertida (tapa arriba y base abajo) en latas metálicas para su posterior esterilización.

Cuadro 4. Características microscópicas y de crecimiento en medios líquidos, semisólidos y sólidos, inoculados mediante diferentes técnicas.

Nombre científico de la bacteria:		
Presentación del medio de cultivo y técnica de siembra	Características de desarrollo	Resultados
Caldo inoculado con asa	Superficial (pelicular o anillado)	
	Sedimento	
	Turbiedad	
Picadura en medio semisólido	Características de crecimiento	
	Movilidad (+ o -)	
Agar vertical inoculado con pipeta	Superficial	
	En todo el medio	
	En el fondo	
	Formación de burbujas	
Agar inclinado	Forma del crecimiento: (filiforme, perlado o arborescente)	
	Color	
	Textura (acuosa, butirosa, cremosa, membranosa, viscosa)	
	Consistencia (seca, húmeda)	
Placa cuadrante simple	Desarrollo a lo largo del estriado	
	Presencia de colonias aisladas	
	Características de las colonias: Forma, Color, Borde, Elevación, Textura, Consistencia	
Placa estría radial	Presencia de colonias aisladas	
	Características de las colonias: Forma, Color, Borde, Elevación, Textura, Consistencia	
Placa por extensión	Desarrollo masivo o confluyente	
	Presencia de colonias aisladas	
	Color	
Características microscópicas	Forma	
	Agrupación	
	Gram	

b, c, d) Resultados del desarrollo de bacterias filamentosas y hongos (levaduriformes y filamentosos).

Materiales

Material por equipo:

Microscopio

Aceite de inmersión

Asa micológica

Colorante para tinción de Gram

Frascos gotero con lactofenol azul de algodón, azul de metileno

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Portaobjetos

Charola para tinción

Puente de vidrio para tinción

Pinzas de madera para ropa

Piseta

Paño limpio de algodón

Papel seda

Diurex

Metodología

b) Bacterias filamentosas.

1. Revisar y registrar las características coloniales del desarrollo bacteriano en el cuadro 5.
2. Seleccionar una colonia aislada de cada una de las cepas en estudio, y a partir de ellas:
3. Realizar un frote y una tinción de Gram.
4. Comparar la morfología colonial y microscópica de las bacterias estudiadas registradas en la 1ª Sesión y en la Sesión actual.

c) Hongos levaduriformes.

1. Revisar y registrar las características coloniales del desarrollo microbiano en el cuadro 6.
2. Realizar un frote y una tinción simple de cada una de las cepas en estudio.
3. Comparar la morfología colonial y microscópica con las características de las bacterias.

La descripción de las colonias debe hacerse de acuerdo con las características indicadas en el Manual de Microbiología General (2006).

d) Hongos filamentosos.

1. Revisar y registrar las características coloniales (cuadro 7).
2. Mediante la técnica de impronta con diurex, hacer una preparación en fresco y teñir, para ello:
 - Cortar un pedazo de diurex de aproximadamente 1.5 cm.
 - Colocar una gota de lactofenol azul de algodón en un portaobjetos limpio y desengrasado.
 - Esterilizar el asa micológica y dejar enfriar.
 - Pegar el diurex en el extremo del asa y con el lado de goma hacia abajo presionar el diurex sobre el cultivo de hongo cuidando de no frotar (Figura 4).
 - Con ayuda del asa bacteriológica depositar el diurex (con la muestra hacia el colorante) en el portaobjetos (Figura 5).
 - Colocar un cubreobjetos (Figura 6) y observar al microscopio con los objetivos 10x y 40x.
3. Registrar los resultados en el cuadro 7, para ello describir las características de los hongos con ayuda de los esquemas del Manual de Microbiología General (2006).

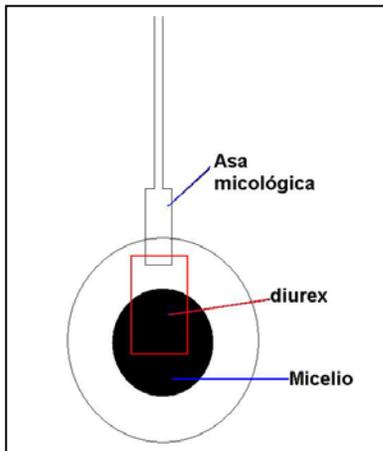


Figura 4. Toma de muestra por impronta.

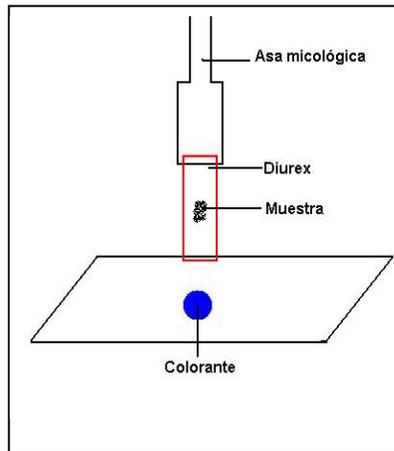


Figura 5. Colocación del diurex en el portaobjetos.

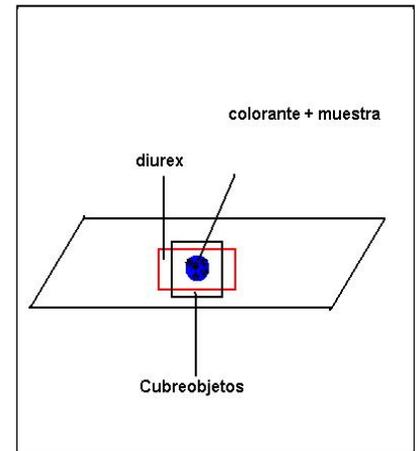


Figura 6. Muestra lista para observar al microscopio.

Precauciones generales

- Evita que el diurex tenga rayas, dobleces o huellas dactilares antes de para realizar la impronta.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
4. Los cultivos muestra deben ser esterilizados en autoclave, antes de ser desechados.
5. Después de observar las características de desarrollo, esterilizar los cultivos en autoclave.
6. Vaciar el agar en una bolsa de plástico y depositarla en el contenedor correspondiente.
7. Sujetar con masking tape las cajas de plástico con cultivos y depositarlas en el contendor rojo del laboratorio 1A.

Cuadro 5. Características coloniales y microscópicas del desarrollo de bacterias filamentosas.

Nombre científico de la bacteria:		
Características	Características de desarrollo	Resultados
Coloniales	Forma	
	Color	
	Elevación	
	Textura	
	Aspecto	
Microscópicas	Forma	
	Otras estructuras	
	Gram	

Cuadro 6. Características coloniales y microscópicas del desarrollo de un hongo levaduriforme.

Nombre científico de la levadura:		
Características	Características de desarrollo	Resultados
Coloniales	Color	
	Aspecto superficial	
	Consistencia	
Microscópicas	Forma	
	Tamaño relativo con respecto a las bacterias	
	Presencia y distribución de blastosporas	

Cuadro 7. Características coloniales y microscópicas del desarrollo de un hongo filamentososo.

Nombre científico del hongo filamentososo:		
Características	Características de desarrollo	Resultados
Coloniales	Desarrollo (escaso, medio, abundante)	
	Color	
	Aspecto del micelio superficial	
	Color del micelio profundo	
	Aspecto del micelio profundo	
	Color	
Microscópicas	Tipo de hifas	
	Tipo de cuerpo fructífero	
	De las esporas:	
	Morfología	
	Color	
	Aspecto externo	

Guía para la discusión de resultados

1. Compara las características microscópicas y macroscópicas de cada uno de los grupos microbianos.
2. ¿Encuentras alguna similitud entre ellos?
3. ¿Resulta fácil distinguir las estructuras microscópicas que conforman a un hongo filamentoso?
4. Los tiempos de incubación que requieren los diferentes cultivos microbianos son iguales? ¿Por qué?

Literatura de consulta

- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. *Microbiology an Introduction*. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. *Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada*. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

UNIDAD V.
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE
MICROORGANISMOS

PRÁCTICA 5.1

Aislamiento de Microorganismos

Objetivos

Al finalizar esta práctica el alumno será capaz de:

- Explicar el fundamento de diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación para el aislamiento de microorganismos con características específicas.
- Aplicar diferentes técnicas para el aislamiento de microorganismos.
- Comparar con cepas de referencia la eficiencia de las técnicas de siembra, medios de cultivo y condiciones de incubación empleadas para el aislamiento de microorganismos.
- Obtener y comprobar la pureza de los cultivos aislados.
- Aplicar una técnica de conservación de corto o mediano plazo a los cultivos puros obtenidos.

Introducción

En todos los ambientes naturales habitan múltiples microorganismos de diversos tipos y actividad fisiológica. Para efectuar el estudio de un organismo particular es necesario separarlo de la población mixta en la que se encuentra. Para tal fin se emplean técnicas de aislamiento que conduzcan a la obtención de un cultivo puro.

De manera general los métodos de aislamiento incluyen:

1. Separación física de los microorganismos mediante:
 - a) Diluciones seriadas y siembra por vertido en placa.
 - b) Siembra por agotamiento.
2. Utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales.
3. Aprovechamiento de características particulares de los microorganismos, tales como la formación de esporas, el metabolismo anaerobio y/ o facultativo, la capacidad para utilizar sustratos poco comunes, etc.

Para facilitar el proceso de aislamiento y obtener mejores resultados, frecuentemente se emplean combinaciones de las técnicas anteriores.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Bacillus sp.
Citrobacter freundii
Enterobacter sp.
Escherichia coli
Micrococcus luteus
Pseudomonas aeruginosa
Proteus vulgaris
Serratia marcescens

Staphylococcus epidermidis
Staphylococcus aureus
Streptococcus sp.

Muestras

Lodo o suelo o agua o verdura fresca o fibra dietética o columna de Winogradsky

Material por grupo:

Baño María a 50°C

Incubadora a 28 y 37°C

Tubo con solución de estreptomicina (3000 µg/ mL) estéril.

Material por equipo:

Balanza granataria

Espátula o cuchara de acero inoxidable

Tripie

Vaso de precipitados de 250 mL

Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 90 mL de solución salina isotónica estéril (SSI) o solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.2

Varilla de vidrio en "L"

Tubos de ensayo de 22x175 con 15 mL de los siguientes medios:

Medio general (gelosa nutritiva, TSA o BHI)

Eosina azul de metileno (EMB)

Manitol sal agar (MSA)

YPMD

Sabouraud Rosa de Bengala (SRB)

Tubos de ensayo de 16x150 con 9.0 mL de SSI estéril

Cajas de Petri con 15 mL de los siguientes medios: TSA o BHI, EMB, MSA, YPDM y TSA+MnSO₄.

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradilla

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Cajas de Petri de plástico estériles desechables

Metodología

1. Rotular todo el material indicando dilución, o técnica de siembra, medio de cultivo (Figura 7).

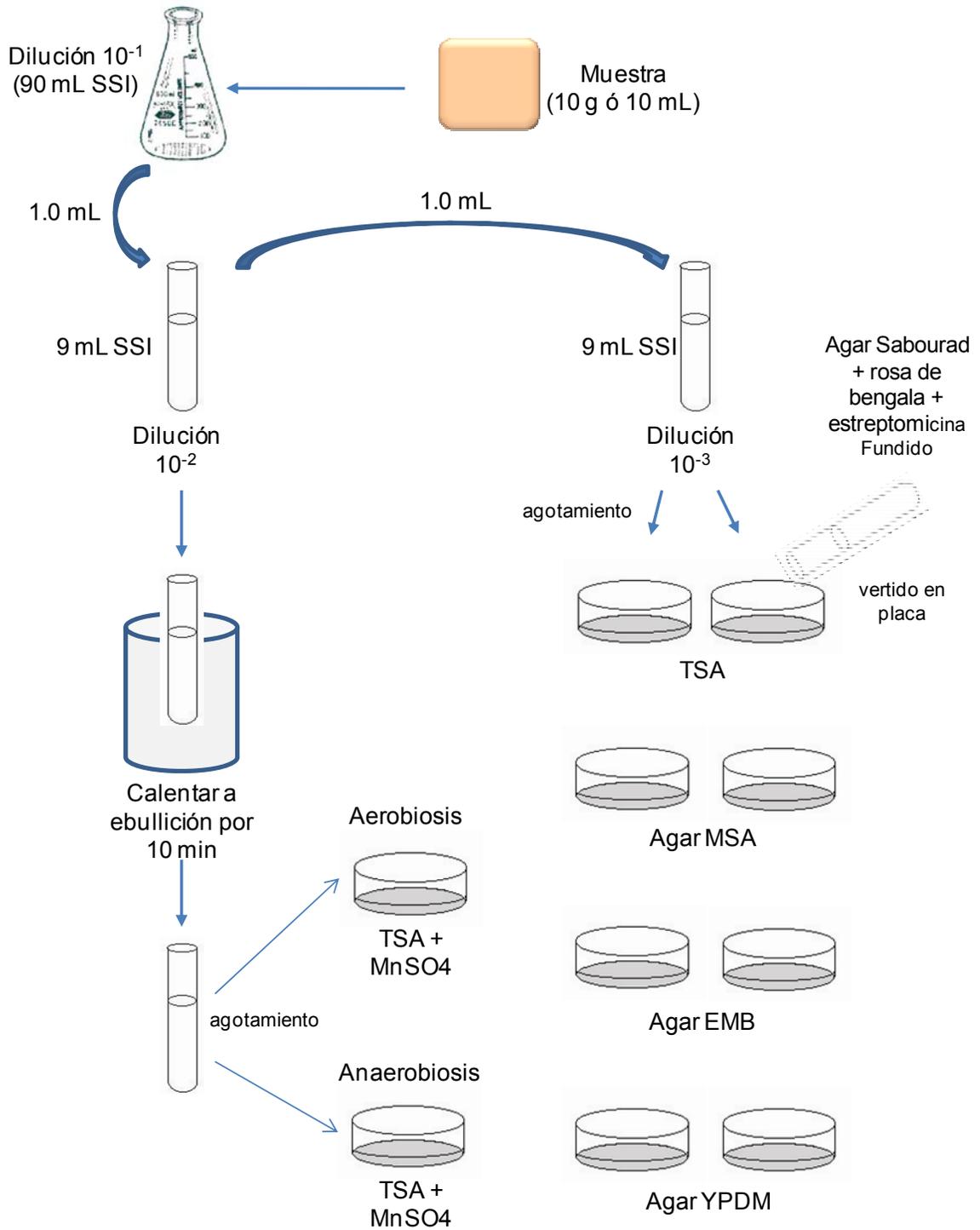


Figura 7. Técnicas de aislamiento de microorganismos.

a) Dilución de la muestra.

1. Pesar 10 g o medir 10 mL de la muestra y en condiciones asépticas vaciar en un matraz Erlenmeyer con 90 mL de SSI estéril.
2. Homogeneizar y a partir de esta suspensión preparar 2 diluciones decimales mas (10^{-2} y 10^{-3}), para ello emplear dos tubos con 9 mL de SSI estéril c/u.

b) Siembra por vertido en placa en medios selectivos y diferenciales.

1. Fundir los medios de cultivo contenidos en los tubos de ensayo de 22x175 y mantenerlos a 45°C.
2. A partir de la última dilución y con una pipeta estéril transferir 0.1 mL a 5 cajas de Petri vacías y estériles.
3. Colocar la pipeta después de su uso en un pipetero que contenga una solución sanitizante.
4. Agregar a cada caja, uno de los siguientes medios de cultivo: SRB, TSA, MSA, EMB, YPMD.

Nota: Agregar al medio fundido de SRB la estreptomycin estéril a una concentración de 3000 µg/ mL (0.15 mL/ 15 mL del medio para una concentración final 30 µg/ mL).

5. Mezclar suavemente el inóculo con el medio. Para ello colocar la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía delante y atrás y 5 en sentido horizontal.
6. Dejar solidificar.
7. Asegurar cada una de las cajas con maskin-tape.
8. Incubar de acuerdo a las indicaciones del cuadro 8.

c) Siembra por agotamiento en medios selectivos y diferenciales.

1. A partir de la última dilución y con el asa bacteriológica sembrar por la técnica de cuadrante radial cada una de las siguientes placas: TSA, MSA, EMB, YPMD.
2. Repite la siembra en los diferentes medios de cultivo utilizando cepas de referencia.
3. Asegurar cada una de las cajas con maskin-tape.
4. Incubar de acuerdo a las indicaciones del cuadro 8.

d) Aislamiento de bacilos esporulados.

1. Colocar el tubo con la segunda dilución en un baño de agua a ebullición y mantenerlo durante 10 minutos.
2. A partir del tubo anterior, con el asa bacteriológica sembrar por cuadrante radial 2 placas de TSA con sulfato de manganeso.
3. Asegurar cada una de las cajas con maskin-tape e incubar en las condiciones que se indican en el cuadro 8.

Cuadro 8. Condiciones de incubación para el desarrollo de microorganismos.

Medio de cultivo	Temperatura (° C)	Tiempo
TSA	37	24 h
MSA		
EMB		
TSA+MnSO ₄		
YPMD	28	3 a 5 días
SRB		
TSA+MnSO ₄		

Precauciones generales

- Las estrías hechas para la siembra por agotamiento deben ser cerradas y trazadas rápidamente.
- Etiqueta perfectamente tu material a sembrar.

Disposición de desechos

1. Esterilizar el matraz y tubos en los que preparó las diluciones y posteriormente lavarlos.
2. Escurrir el exceso de sanitizante de las pipetas, envolverlas, esterilizarlas y lavarlas.

a) Aislamiento de la bacteria problema

Materiales

Material por equipo:

Microscopio

Reactivos para tinción de Gram

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas bacteriológicas

Portaobjetos

Charola para tinción

Piseta

Puente de vidrio

Pinzas de madera para ropa

Material para profesores:

Placas con TSA, EMB, MSA, TSA+MnSO₄.

Metodología

a) Comparación de la diversidad de las colonias desarrolladas en los diferentes medios de cultivo y condiciones de incubación.

En las placas con TSA, EMB, MSA, SRB y TSA+MnSO₄ proceda a:

1. Comparar la abundancia, separación y diversidad de las colonias desarrolladas en las cajas sembradas por placa vertida y por agotamiento.
2. Seleccionar de cada medio de cultivo aquella placa que presente mayor número de colonias diferentes y separadas.
3. Registrar los resultados en el cuadro 9.
4. Seleccionar de cada placa 2 colonias diferentes.
5. Identificar con una clave las colonias seleccionadas y de cada una hacer una tinción de Gram (tener cuidado de no arrastrar toda la colonia) y efectúe la observación microscópica.
6. Registrar los resultados en el cuadro 9.
7. Registra, en un cuadro, las características coloniales del desarrollo de las cepas de referencia en los diferentes medios de cultivo.

Cuadro 9. Abundancia y diversidad (número y tipo) de colonias desarrolladas en placas sembradas por diferentes técnicas de aislamiento.

Medios de cultivo / Técnica de siembra	Placa vertida		Agotamiento	
	Número aproximado de colonias	Número de colonias diferentes	Presencia de colonias aisladas	Número de colonias diferentes
TSA				
EMB				
MSA				
YPDA				
SRB			ND	ND
TSA+MnSO ₄ (28° C)	ND	ND		
TSA+MnSO ₄ (37° C)	ND	ND		

ND=no determinado

b) Aislamiento primario.

1. Identifique las colonias en las que observó un solo tipo de morfología y Gram.
3. Con base en sus resultados y las instrucciones del profesor proceda a aislar:
 - Una bacteria Gram negativa o
 - un coco Gram positivo o
 - un bacilo esporulado (realizar la confirmación de esporulación después de incubar un mínimo de 5 días)
4. A partir de la colonia seleccionada inocular por agotamiento una placa que contenga el medio de procedencia (1^a resiembra).

5. Incubar 24 horas a una temperatura que debe ser acorde con la procedencia de la colonia.
6. Guardar en refrigeración las cajas a partir de las cuales realizo el aislamiento.

Precauciones generales

- Marca y rotula perfectamente las colonias seleccionadas para realizar el aislamiento primario.
- Guarda en refrigeración las placas de las cuales se seleccionó la colonia para el aislamiento primario.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
5. Sellar con maskin-tape las cajas de Petri no seleccionadas y colocarlas en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿En qué medio de cultivo se presentó el mayor número y diversidad de colonias microbianas? ¿A qué lo atribuyes?
2. ¿La metodología a seguir para el aislamiento de bacterias esporuladas es efectiva? ¿Por qué?
3. ¿Qué otra técnica conoces para aislar bacterias esporuladas?

a) Continuación del aislamiento de la bacteria problema (2ª resiembra)

b) Resultados. Crecimiento de actinobacterias y hongos.

Materiales

Material por equipo:

Microscopio

Colorantes para tinción de Gram

Asas micológicas

Tripie

Charola de metal

Vaso de precipitados de 250 mL
Frasco gotero con verde malaquita (5%), safranina (0.5%) y lactofenol azul de algodón
Placas de TSA
Incubadoras a 28 y 37°C

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Asas bacteriológicas
Portaobjetos
Cubreobjetos
Charola para tinción
Puente de vidrio para tinción
Pinzas largas de punta roma
Pinzas de madera para ropa
Piseta

Metodología

a) Continuación del aislamiento de la bacteria problema.

1. Seleccionar tres colonias que estén separadas e identificarlas con una clave en el reverso de la caja.
2. A partir de cada colonia realizar un frotis y teñir con Gram para verificar la pureza
3. En el caso de las colonias aisladas a partir de TSA+MnSO₄ hacer un frote y tinción de esporas, para ello:
 - a) Cubrir la preparación con un papel filtro y saturarlo con verde de malaquita al 5 %, calentar la preparación sobre un vaso de precipitado con emisión de vapores de agua. Dejar actuar el colorante durante 10 minutos, procurando que no se seque la preparación.
 - b) Retirar el papel filtro (con unas pinzas largas), lavar la preparación con agua abundante (hasta que el efluente no salga verde)
 - c) Teñir con el colorante de contraste (safranina 0.5%) durante 2 minutos.
 - d) Lavar abundantemente con agua.
4. Registrar en el cuadro 10 las características de las colonias desarrolladas.
5. A partir de las observaciones, seleccionar una colonia que microscópicamente muestre un solo tipo de morfología y Gram.
6. Resembrar la colonia por agotamiento en dos placas de TSA e incubar a 37°C durante 24 horas.

Cuadro 10. Características de colonias seleccionadas para el aislamiento y de las colonias obtenidas en resiembras subsecuentes.

	Medio de cultivo	Clave de la colonia	Características macroscópicas*	Características microscópicas (incluir esquema)
Características iniciales				
1ª resiembra				
2ª resiembra				
3ª resiembra				

* Describir las colonias de acuerdo con las características revisadas en la Práctica 3.1 Técnicas de Siembra.

b) Resultados del crecimiento de actinobacterias y hongos.

1. Observar y comparar las características macroscópicas de los microorganismos desarrollados en YPMD y SRB.
2. Registrar la cantidad de colonias desarrolladas en los dos medios (cuadro 9) y las características de las colonias (cuadro 11).
3. Seleccionar de cada medio 2 a 3 colonias que se encuentren separadas y sean diferentes.
4. Marcar las colonias con clave al reverso de la caja.
5. Hacer un frote y tinción de Gram a partir de las colonias seleccionadas en YPMD.
6. Observar al microscopio y registrar los resultados en el cuadro 11.
7. Hacer preparaciones húmedas con lactofenol azul de algodón a partir de las colonias seleccionadas en SRB.
8. Observar al microscopio y registrar los resultados en el cuadro 11.

Cuadro 11. Resultados del crecimiento de actinobacterias y hongos.

Medio de cultivo	Colonia	Características macroscópicas*	Características microscópicas (incluir esquema**)
YPMD	1		
	2		
	3		
SRB	1		
	2		
	3		

* Describir las colonias de acuerdo con las características revisadas en la Práctica 3.1 Técnicas de Siembra. **Dibuja el campo microscópico con las observaciones microscópicas a color.

Precauciones generales

- Algunas colonias de bacterias filamentosas son muy secas y duras, para realizar un frote de éstas frota suavemente la colonia y resuspende en una pequeña gota de agua en el portaobjetos.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En el caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.
4. Sellar con maskin tape las cajas de Petri que contengan los cultivos de actinomicetos y hongos y colocar en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A

Guía para la discusión de resultados

1. ¿La cantidad de colonias bacterianas es mayor o menor a la de colonias de hongos filamentosos? ¿A qué lo atribuyes?

2. ¿Qué criterios seguiste para seleccionar la colonia para realizar el aislamiento primario?
3. ¿Cuáles han sido las dificultades a las que te has enfrentado para purificar tu cultivo microbiano?

a) Continuación del aislamiento de la bacteria problema

Materiales

Material por equipo:

Microscopio
Colorantes para tinción de Gram
Tubos de ensayo de 13x100 con TSA inclinado
Incubadoras a 28 y 37°C

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Asas
Portaobjetos
Charola para tinción
Puente de vidrio para tinción
Pinzas de madera para ropa
Piseta

Material para profesores:

Placas con TSA

Metodología

a) Continuación del aislamiento de la bacteria problema.

1. Seleccionar tres colonias que estén separadas e identificarlas con una clave en el reverso de la caja.
2. A partir de cada colonia realice un frotis y tñia con Gram para verificar la pureza.
3. Observar las características coloniales y microscópicas y registrar en el cuadro 10.
4. En el caso de observar cultivos mixtos repetir la resiembra en 2 placas de TSA, incubar y repetir los incisos 1 a 3.

b) Conservación del cultivo puro.

1. Una vez confirmada la pureza de las colonias, proceda a resembrar en dos tubos de ensayo de 13x100 con TSA inclinado (estría ondulada), debidamente etiquetados e incubar a 35°C durante 24 horas.
2. Al término de la incubación sellar con papel Parafilm^{MR} y guardar en refrigeración.

Precauciones generales

- Para asegurar la obtención de la pureza de tu cultivo, procura en cada resiembra la obtención de colonias aisladas, realizar buenas tinciones y observaciones microscópicas, y respetar los tiempos de incubación de acuerdo al tipo de microorganismo a aislar.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Después de observar las preparaciones, sumergir los portaobjetos en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. En caso de ruptura de las preparaciones, envolver los fragmentos con papel, esterilizar el paquete en autoclave y después desecharlos en el contenedor de vidrio roto.

Guía para la discusión de resultados

1. Comparar la eficiencia de técnicas de separación empleadas.
2. Con base en sus observaciones microscópicas, la abundancia y la diversidad de las colonias desarrolladas, discutir si se comprobó la función de los medios selectivos y diferenciales.
3. Comparar las principales diferencias de crecimiento de bacterias no filamentosas, bacterias filamentosas (actinobacterias) y hongos, y su relación con la técnica de siembra y medio selectivo empleados para su aislamiento.
4. Analizar la diversidad microbiana en la muestra estudiada.

Literatura de consulta

- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. *Microbiology an Introduction*. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsmann, L. Alche. 2000. *Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada*. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

UNIDAD VI.
NUTRICIÓN MICROBIANA Y CARACTERIZACIÓN
FISIOLÓGICA DE BACTERIAS

PRÁCTICA 6.1

Nutrición Microbiana y Requerimientos de Oxígeno

Objetivos

- Determinar las características nutricionales en una población mixta considerando las fuentes de carbono energía y nitrógeno.
- Determinar los requerimientos de oxígeno en una población mixta mediante la comparación con cepas de referencia.

Introducción

La nutrición es el proceso por el cual los seres vivos toman del medio donde habitan, los compuestos químicos que necesitan para llevar a cabo sus procesos energéticos y biosintéticos que les permiten crecer y reproducirse. En general los requerimientos nutricionales y de oxígeno de cada grupo microbiano están íntimamente relacionados con el ambiente natural en que se desarrollan.

En primer lugar necesitan una fuente de energía, la cual pueden obtener de una fuente luminosa (fotótrofos) o mediante la oxidación de compuestos químicos (quimiótrofos); esta última categoría se divide en, quimiolitótrofos (oxidación de compuestos inorgánicos) y quimiorganótrofos (oxidación de compuestos orgánicos). Así mismo, de acuerdo a la fuente de donde obtienen el carbono se clasifican en autótrofos (utilizan CO_2 y carbonatos) y heterótrofos (utilizan compuestos orgánicos). Respecto a la fuente de nitrógeno, la obtienen a partir de aminoácidos o nitrógeno inorgánico en diferentes estados de oxidación incluyendo el nitrógeno molecular. La capacidad de reducir el dinitrógeno atmosférico es exclusiva de algunos microorganismos procariones a los que se les denomina fijadores de nitrógeno.

El grupo bacteriano es, desde el punto de vista estructural, el más simple de los microorganismos (procariones); no obstante, fisiológicamente es el más complejo y este es el único en el que se encuentran todos los tipos nutricionales descritos. Las algas se caracterizan por ser fotótrofas y autótrofas, en tanto que los hongos y protozoarios por ser quimiorganótrofos.

En lo que respecta a sus requerimientos de oxígeno, los microorganismos son muy variados en cuanto a la necesidad o tolerancia de esta molécula y se les clasifica como: aerobios estrictos (aquéllos que crecen de manera obligada en presencia de tensiones normales de oxígeno o condiciones óxicas); microaerófilos (los que crecen en tensiones de O_2 menores a las del aire o condiciones microóxicas); facultativos (los que crecen de acuerdo a las condiciones que prevalezcan en su hábitat, óxicas o anóxicas); anaerobios estrictos (aquéllos que no requieren de este elemento para su desarrollo, y la presencia de O_2 origina la inhibición o incluso su muerte) y los aerotolerantes (estos toleran el O_2 y crecen en su presencia aunque no puedan usarlo).

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia (cultivo líquido) para el medio mineral (A,B,C,D,E,F):

Alga microscópica

Bacillus sp.

Escherichia coli

Saccharomyces cerevisiae

Aspergillus niger

Cepas de referencia (cultivo líquido) para el medio de Ashbey (1,2,3,4,5,6,7):

Alga microscópica

Bacterias nitrificantes

Beijerinckia sp

Escherichia coli

Pseudomonas aeruginosa

Cepas de referencia (cultivo líquido) para medios de cultivo Requerimientos de oxígeno

Pseudomonas aeruginosa

Micrococcus luteus

Escherichia coli

Clostridium sp.

Material por grupo:

Baño María a 50°C (mantener medios fundidos)

Incubadora a 28 y 37°C

2 jarras de anaerobiosis

2 paquetes de Gas Pack

Material por equipo:

Micropipeta automática para 100 µL con puntas estériles (100 µL)

Tubos de ensaye de 16x150 con tapón de rosca con 10 mL de medio mineral:

1 sin fuente de C

1 con carbonatos

1 con glucosa.

1 con sacarosa

1 con almidón

1 con celulosa.

Tubos de ensaye de 16x150 con tapón de rosca con 10 mL de Ashbey:

1 sin manitol y con amonio

1 sin manitol y con nitrato de potasio

1 con manitol libre de nitrógeno

1 con manitol y amonio

1 con manitol y nitratos

1 con manitol y peptona

Tubos de ensaye de 15x120 con tapón de rosca con 7 mL de medio fluido de tioglicolato
Tubos de 22 x 175 con agar anaeróbico de Brewer

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Asas

Gradillas

Pipetero

2 Pipetas graduada 1 mL o pipetas Pasteur

1 tubo de 16 x150 estéril

1 tubo de 16 x 150 con 9.0 mL de solución salina isotónica (SSI)

3 tubos de 16 x 150 con 9.9 mL de solución salina isotónica estéril (SSIE)

1 tubo de 22 X 175 con 20.0 mL de SSI estéril

2 cajas de Petri estériles

Metodología

Preparación de material

1. Rotular todo el material.
2. Fundir el medio agar anaeróbico de Brewer (contenido en dos tubos) hasta su disolución total y la reducción del indicador azul de metileno, conservar en baño de agua a 50° C.
3. Someter a ebullición los dos tubos con caldo tioglicolato hasta la reducción del indicador (resazurina).
4. Colocar los tubos en una gradilla y dejar enfriar, teniendo cuidado de no agitarlos.

Inoculación para establecer requerimientos nutricionales (carbono y nitrógeno)

1. Inocular un tubo con 9.9 mL de SSI estéril con 0.1 mL de la cepa de referencia correspondiente y homogeneizar la suspensión. (Figura 8).
2. Inocular, con ayuda de la micropipeta, 100 µL de la suspensión en cada uno de los tubos con los medios indicados en la figura 8.
3. **NOTA: Utilizar una punta diferente para cada cepa, y evitar tocar los medios de cultivo con la punta de la micropipeta.**
4. Incubar de acuerdo a las indicaciones del cuadro 12.

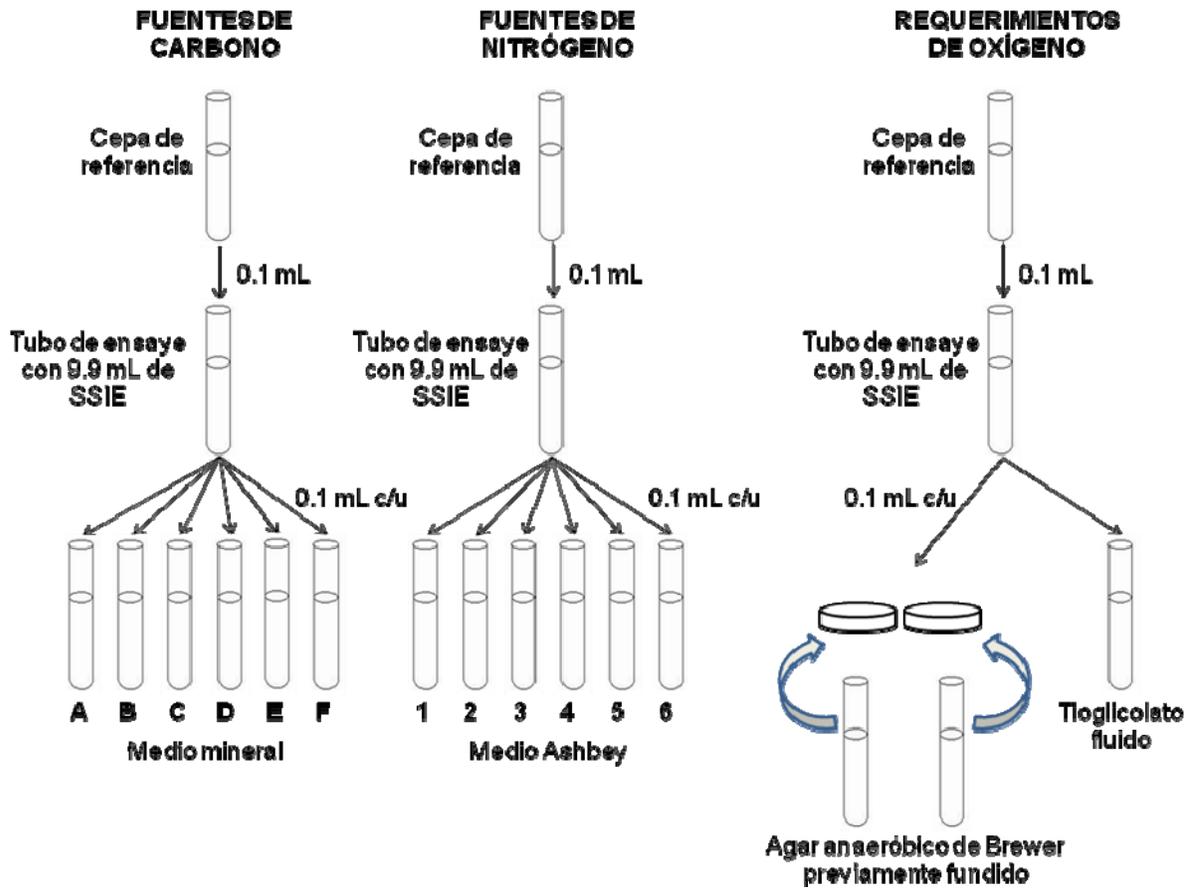


Figura 8. Inoculación para establecer los requerimientos nutricionales y de oxígeno de los microorganismos.

Cuadro 12. Medios de cultivo y condiciones de incubación para establecer los requerimientos nutricionales de los microorganismos.

Medio mineral		Medio Ashbey		Condiciones de incubación		
Clave	Fuente de carbono	Clave	Fuente de nitrógeno	Tiempo	Temperatura	Luz
A	-	1	NH ₄ Cl	3 semanas	Ambiente	Natural
B	CO ₃ ⁼	2	KNO ₃			
C	Glucosa	3	-	48 horas a 7 días	28° C -	-
D	Sacarosa	4	NH ₄ Cl			
E	Almidón	5	KNO ₃			
F	Celulosa*	6	Peptona			

Nota: Medios 1 y 2 carentes de manitol; medios 3 a 6 con manitol

*Incubar 3 semanas

Inoculación para establecer requerimientos de oxígeno

Agar anaeróbico de Brewer

1. Inocular con 0.1 mL de la cepa de referencia, un tubo con 9.9 mL de SSI estéril, y homogeneizar la suspensión.
2. Colocar por duplicado 100 µL de la suspensión en una caja de Petri vacía y estéril.
3. Verter en cada una de las cajas el medio de cultivo previamente fundido y a una temperatura de 45° C, homogeneizar y dejar solidificar.
4. Incubar una caja en condiciones aeróbicas y la otra en condiciones anaeróbicas a 28° C durante 48 horas.

Tioglicolato fluido

1. Inocular con 100 µL de la suspensión, el tubo con el medio de cultivo; para ello usar pipetas Pasteur depositando la muestra hasta el fondo del tubo.
2. **NOTA: Para inocular *Clostridium* sp. será necesario obtener la muestra del fondo del tubo, y evitar agitar el cultivo; del mismo modo depositar la muestra en el fondo del tubo a inocular. Este procedimiento deberá realizarse rápidamente.**
3. Incubar a 37° C por 48 horas.

Determinación de los requerimientos nutricionales y de oxígeno

Material por grupo

- 4 Frascos goteros con solución A (Reactivo de Griess)
- 4 Frascos goteros con solución B (reactivo de Griess)
- 4 Frascos goteros con reactivo de Nessler
- Zinc en polvo

Material por equipo

- Microscopio
- Juego de reactivos para tinción de Gram

Material que deben tener los alumnos

- Mecheros
- Asas
- Gradillas
- Pipetero
- Portaobjetos
- 7 pipetas de 1.0 mL estériles o Pasteur con bulbos de goma

Metodología

Requerimientos nutricionales

1. Observar la turbidez desarrollada en los diferentes medios de cultivo (mineral y Ashbey), de acuerdo al tiempo de incubación indicado y registrar los resultados en los cuadros 13 y 14.
2. Hacer una tinción de Gram de cada uno de los tubos con desarrollo y registrar sus resultados en el cuadro 13 y 14.
3. Incubar nuevamente los tubos en los que no haya registrado desarrollo en las mismas condiciones por 5 días más. Cuando se observe turbiedad en medio Ashbey proceder a:
4. Revelar la presencia de amonio en los tubos 1, 3, 5 y 6.
5. Revelar la presencia de nitritos en los tubos 2, 3 y 4. Para ello
6. Tomar una pequeña muestra de cada tubo con una pipeta Pasteur estéril y transferirla a dos portaobjetos
 - a) Amonio. En uno de los portaobjetos agregar una gota del reactivo de Nessler. Si se obtiene un color amarillo-naranja la prueba revelará la presencia de amonio en el medio.
 - b) Nitritos. En el segundo portaobjeto agregar una gota del reactivo A de Griess y una gota del reactivo B. La presencia de nitritos se evidencia con el desarrollo de un color rojo. En caso de no obtener color, agregar una pizca de polvo de zinc. La aparición de un color rojo demostrará la oxidación se llevó a cabo hasta nitratos. En el caso de que continúe incoloro después de la adición del zinc, la prueba se registrará como negativa.
7. Registrar los resultados en el cuadro 14.

Requerimientos de oxígeno

1. De manera grupal comparar el crecimiento de las cepas de referencia inoculadas en el medio agar anaeróbico de Brewer e incubadas en condiciones aerobias y anaerobias, y registrar los resultados en el cuadro 16.
2. Describir el desarrollo microbiano a lo largo de todo el tubo de tioglicolato fluido y registrar los resultados en el cuadro 17.
3. Realizar tinciones y esquematizar las observaciones realizadas.

a) Determinación de las necesidades de fuente de carbono y energía de los microorganismos

1. Registrar en el cuadro 13 el desarrollo observado en medio mineral con diferentes fuentes de carbono y energía, de acuerdo al tiempo de incubación indicado.
2. Esquematizar las observaciones microscópicas.

b) Determinación de las necesidades de fuentes de nitrógeno y las transformaciones llevadas a cabo por los microorganismos

1. Registrar en el cuadro 14 el desarrollo observado en medio Ashbey con diferentes fuentes de nitrógeno, de acuerdo a los tiempos de incubación.
2. Identificar las transformaciones del nitrógeno, llevadas a cabo por los microorganismos, según el ciclo del nitrógeno.
3. Indicar el grupo fisiológico al que pertenecen los microorganismos identificados en inciso 2.
4. Registra los resultados en el cuadro 15.
5. Esquematizar las observaciones que resultaron de las tinciones.

Cuadro 15. Grupos fisiológicos presentes en medio Ashbey, con base en las transformaciones de nitrógeno.

Nombre del microorganismo _____

Medio Ashbey		Presencia de:			Transformaciones	Grupo fisiológico
		NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻		
1	NO ₃ ⁻ s/m		ND	ND		
2	NH ₄ ⁺ s/m	ND				
3	Sin N c/m					
4	NH ₄ ⁺ c/m	ND				
5	NO ₃ ⁻ c/m		ND	ND		
6	Peptona c/m		ND	ND		

***Amonio + o -; Nitritos + o -

ND = No determinado

Cuadro 16. Desarrollo microbiano en agar anaeróbico de Brewer.

Cepa de referencia	Aerobiosis	Anaerobiosis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Clostridium</i> sp.		
<i>Streptococcus</i> sp.		

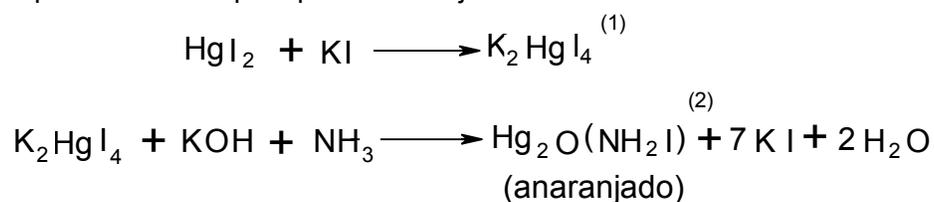
Cuadro 17. Desarrollo microbiano de las cepas de referencia inoculadas en tioglicolato fluido.

Cepa de referencia	Descripción del desarrollo a lo largo del tubo	Clasificación
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Clostridium</i> sp.		
<i>Streptococcus</i> sp.		

Fundamentos teóricos

Determinación de amonio.

El amonio reacciona en condiciones alcalinas con yoduro mercúrico dipotásico (Reactivo de Nessler para formar un precipitado naranja.



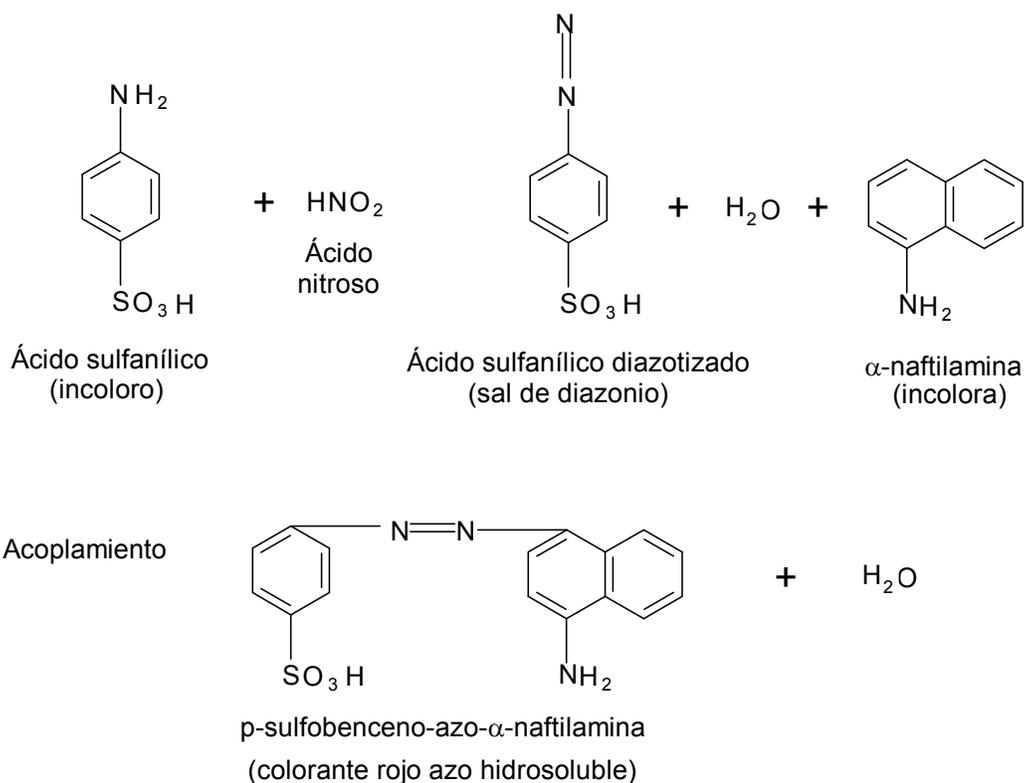
Determinación de nitritos y nitratos

a) Reducción de nitratos



El nitrito reacciona con dos reactivos: ácido sulfanílico y dimetil- α -naftilamina. La reacción de color se debe a la formación de un compuesto diazonio, p -sulfobenceno-azo- α -naftilamina

b) Determinación de nitritos



Cuando la prueba resulta negativa para nitritos se utiliza la prueba de zinc para reducir químicamente a los nitratos presentes a nitritos y formar con los reactivos de Griess el compuesto colorido.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Verter los desechos del reactivo de Nessler y Griess en los frascos dispuestos para este fin.
3. Después de usar los portaobjetos sumergirlos en una solución desinfectante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagar y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%
4. Esterilizar el material de vidrio en el que preparó sus suspensiones y realizó sus lecturas y posteriormente lavar.
5. Sellar con maskin-tape las cajas de Petri de plástico que contengan cultivos y colocarlas en el contenedor ubicado en el laboratorio 1 A.

Guía para la discusión de resultados

1. Explicar la función de los siguientes nutrientes: carbono, nitrógeno y oxígeno.
2. Con base en la fuente de carbono que tipo de microorganismos identificó en las muestras de la columna y cuál fue el medio de cultivo que le permitió identificarlos.
3. Con base en la fuente de energía que tipo de microorganismos identificó en las muestras de la columna y cuál fue el medio de cultivo que le permitió identificarlos.
4. Indicar las transformaciones (con reacciones) de nitrógeno que se llevan a cabo en los siguientes medios de cultivo:
 - a) Sin nitrógeno
 - b) Con cloruro de amonio
 - c) Con nitrato de potasio
 - d) Con proteínas
5. Indicar los grupos fisiológicos que llevan a cabo las transformaciones anteriores.
6. ¿A qué se refiere la diversidad nutricional?
7. ¿Qué es un ambiente de crecimiento rico y cómo lo explotan los microorganismos?
8. Explicar por qué el oxígeno juega un papel complejo en el metabolismo microbiano.
9. Explicar las distintas relaciones que tiene el oxígeno con los siguientes tipos de microorganismos: aerobios estrictos, microaerofílicos, facultativos, anaerobios aerotolerantes y anaerobios obligados.

Literatura de consulta

- Atlas, R.M. 1990. Microbiología. Fundamentos y Aplicaciones. CECSA, S.A. de C.V., México. 887 pp.
- Atlas, R.M. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Educación, S. A. España.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. y Clark D.P. 2009. Brock. Biología de los Microorganismos. Pearson Educación, S. A. España.

PRÁCTICA 6.2

Uso de Pruebas Bioquímicas y Técnicas Rápidas para la Caracterización Fisiológica de Bacterias

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Caracterizar mediante pruebas bioquímicas una bacteria aislada y una bacteria de referencia

Introducción

Para que una célula viva, crezca y se reproduzca, debe ser capaz de incorporar y transformar (metabolismo) los compuestos químicos que necesita para obtener energía (catabolismo), así como las moléculas que pasarán a formar parte de su material celular (anabolismo). Todas las reacciones químicas que se llevan a cabo son catalizadas por enzimas (catalizadores biológicos de naturaleza proteica y actividad específica), las cuales se clasifican, de acuerdo al lugar del ambiente celular donde actúan, en exoenzimas y endoenzimas.

Las pruebas bioquímicas se emplean para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de un grupo de enzimas, o de una vía metabólica completa en uno o más microorganismos. Una de las técnicas rápidas más usadas para la identificación de bacterias son las galerías API de bioMérieux^{MR}, las cuales permiten identificar levaduras, bacterias entéricas, no entéricas, especies de *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Campylobacter*, y otras más. En el laboratorio se emplean frecuentemente las galerías API 20E, que es un sistema estandarizado que permite la identificación de bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos, no exigentes.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Cepas de referencia para la caracterización fisiológica de bacterias (cuatro de cada una, la mitad marcadas con clave):

Citrobacter freundii

Enterobacter sp.

Escherichia coli

Proteus sp.

Shigella sp.

Serratia marcescens

Klebsiella sp.

Salmonella sp.

Material por grupo

Matraces Erlenmeyer (250 mL) con 100 mL de parafina estéril
Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 100 mL de aceite mineral estéril
Incubadora a 37°C

Material por equipo:

Galerías API 20E (bioMérieux^{MR}) para la caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.

Placas de Petri con los siguientes medios de cultivo:

- 1 con Gelosa nutritiva
- 1 con Agar sangre
- 1 con Agar almidón
- 1 con Agar DNA
- 1 con Agar leche descremada

Tubos de ensayo de 13x100 con los siguientes medios de cultivo:

- 2 con 10 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril
- 2 con 3.5 mL de Agar Citrato de Simmons inclinado
- 2 con 3 mL de Caldo nitrato con campana de Durham
- 2 con 3 mL de Caldo rojo de fenol más sacarosa con campana de Durham
- 2 con 3 mL de Caldo rojo de fenol más manitol con campana de Durham
- 2 con 2 mL de caldo urea
- 4 con Rojo de Metilo / Voges Proskawer (RM/VP)
- 2 con 3.5 mL de Agar Kligler inclinado
- 2 con 3.5 mL de Gelatina nutritiva
- 2 con 2 mL del SIM
- 2 con 2.5 mL de MIO y/o LIA
- 4 con 2 mL de Hugh & Leifson + glucosa

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Asas
Gradillas
Piseta
Pipetas de 1.0 mL estériles
Pipetas Pasteur estériles

Siembra para caracterización fisiológica de bacterias.

1. Marcar las cajas por la parte inferior dividiéndolas en dos sectores.
2. Organizar los tubos de modo que cada alumno cuente con una serie de tubos con los medios de cultivo antes indicados (ver Figura 9).

3. Etiquetar las cajas y los tubos con SSI estéril y los medios de cultivo y el nombre de la bacteria a inocular (un integrante del equipo inoculará la bacteria problema y el otro una de las cepas de referencia).
4. Con el cultivo de 24 horas de la bacteria problema (o cepa de referencia), proceder a inocular un tubo con SSI estéril hasta obtener una **Suspensión** de bacterias ligeramente turbia.
5. A partir de la **Suspensión** anterior proceder a inocular los medios de cultivo en el orden que se indica a continuación:
 - a) Por estría recta los tubos que contienen citrato de Simmons.
 - b) Mediante estría recta uno de los sectores de cada una de las 5 placas de Petri.
 - c) Mediante asada los tubos que contienen caldo nitrato, Rojo de fenol+sacarosa, Rojo de fenol+manitol, caldo urea, y los dos con RM/VP.
 - d) Por estría recta y picadura el tubo que contiene Agar Kligler.
 - e) Por picadura los tubos que contienen los medios de gelatina nutritiva, SIM, MIO y los dos con Hugh & Leifson; agregar a uno de estos últimos aceite mineral estéril.
6. Repetir el procedimiento con la segunda serie, la que se inoculará con una de las bacterias de referencia.
7. Incubar a 37°C y revisar a las 24 horas. Si hay desarrollo abundante guardar los medios de cultivo en refrigeración, y si el desarrollo es escaso incubar 24 horas más.

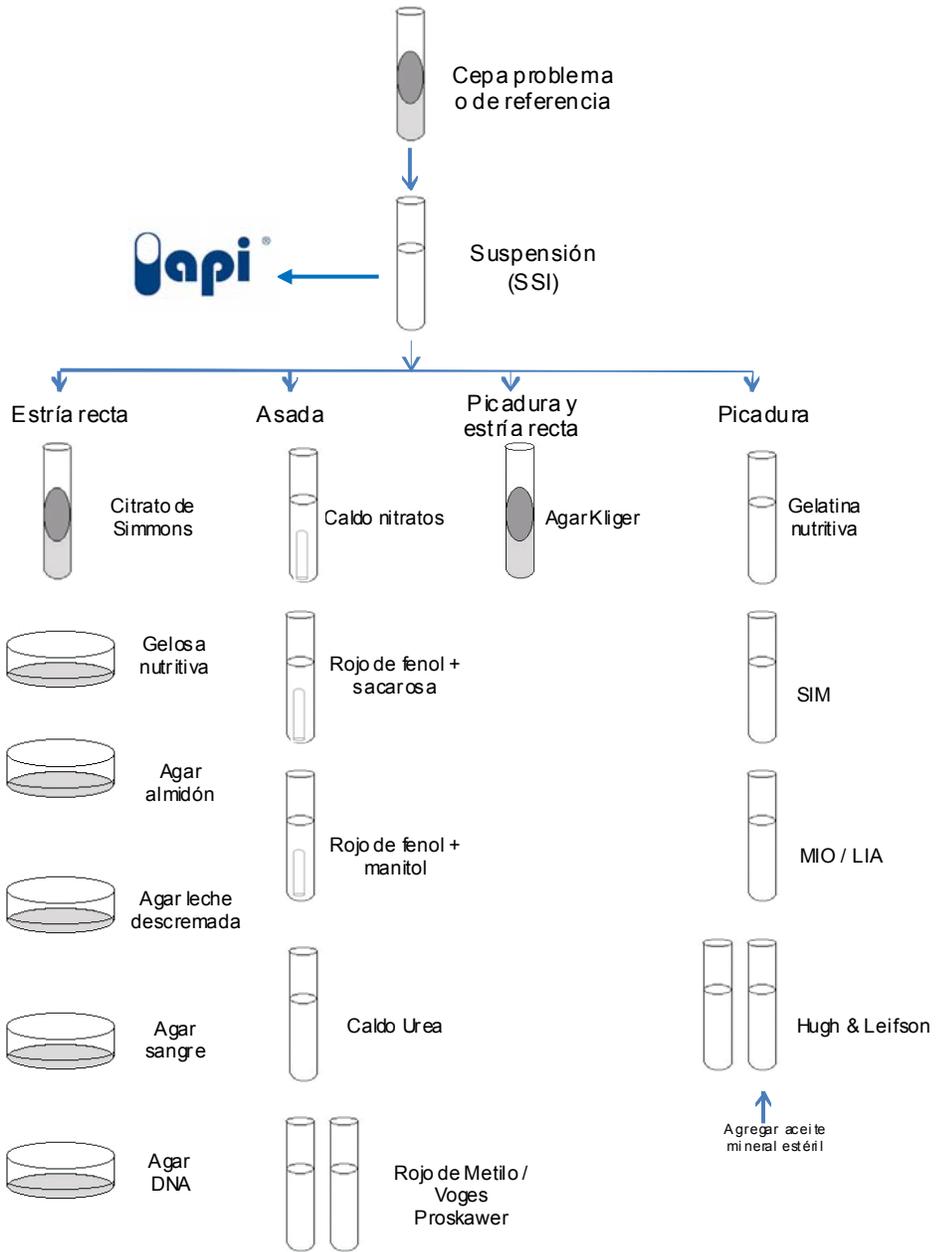


Figura 9. Pruebas bioquímicas para la caracterización fisiológica de bacterias.

Siembra de galerías API (20E) para caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.

1. Etiquetar las galerías API en la lengüeta lateral pestaña de la cámara de incubación.
2. Llenar con agua destilada o desmineralizada, los alveolos del fondo de la cámara de incubación.
3. Colocar la galería API dentro de la cámara de incubación.
4. A partir del tubo **Suspensión**, proceder a inocular las galerías de izquierda a derecha. Introducir el inóculo en los pozos de la galería con ayuda de una pipeta Pasteur estéril (para evitar la formación de burbujas en el fondo de los pozos, colocar la punta de la pipeta sobre la pared de la cúpula, inclinando ligeramente la cámara de incubación hacia delante) (ver Figura 10). Tener cuidado de no mezclar el contenido de cada pozo una vez hidratado el medio de cultivo.
5. Para las pruebas CIT, VP y GEL, llenar el pozo y la cúpula. Para las otras pruebas, llenar únicamente los pozos (no las cúpulas). Para las pruebas ADH, LDC, ODC, H₂S y URE crear una atmósfera anaerobia llenando la cúpula con aceite mineral estéril.
6. Inocular dos galerías por equipo, una con el tubo de la **Suspensión** de la bacteria problema y la otra con la cepa de referencia.
7. Cerrar la cámara de incubación e incubar a 37°C, durante 18 a 24 horas y realizar la lectura.



Figura 10. Galerías API 20E (bioMérieux^{MR}) para la caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.

Precauciones generales

- Evitar tocar los medios de cultivo con la pipeta al ser inoculados.
- Respetar los tiempos de incubación para la prueba con galerías API.

Disposición de desechos

1. Esterilizar los tubos empleados para la preparación de la suspensión bacteriana, desechar en tarja y posteriormente lavar con agua y jabón.

Caracterización fisiológica de bacterias (lectura e interpretación de resultados).

Materiales

Material por mesa:

Hielo

Frascos gotero con:

Lugol

HCl 1.0 N

Reactivo de TPD (preparar con alcohol isoamílico)

Peróxido de hidrógeno al 3%

Rojo de metilo

Hidróxido de potasio al 40%

α -Naftol

Solución A del reactivo de Griess

Solución B del reactivo de Griess

Zinc en polvo

Reactivo de Erlich

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradillas

Papel filtro (cuadros de 2x2cm)

Portaobjetos

Palillos de madera

Metodología

a) Caracterización fisiológica de bacterias.

1. *Hemólisis*. En las placas de agar sangre indique si la hemólisis fue parcial (α) o total (β).
2. *Hidrólisis del almidón*. En la placa de agar almidón agregue lugol alrededor de la estría de desarrollo; la aparición de color azul revela la presencia de almidón, en tanto que una coloración rojiza o parda indica la degradación del almidón y se considera la prueba positiva.
3. *Hidrólisis de la caseína*. En la placa de agar leche descremada observe si alrededor de las colonias hay un halo transparente. La desaparición del color blanco de la leche indica que la prueba es positiva.
4. *Licuefacción de la gelatina*. Colocar los tubos con gelatina nutritiva en hielo y observe si estos permanecen líquidos o se solidifican. El primer caso indica la hidrólisis de la gelatina y se considera la prueba positiva.

5. *DNA-asa*. En la placa de agar DNA adicione unas gotas de HCl (1.0 N) alrededor de la estría de desarrollo. Observe el contraste de color que se presenta alrededor del desarrollo con el resto de la placa. El ADN precipita con el HCl, por lo que la formación de un halo incoloro alrededor de las colonias indica que la prueba es positiva.
6. *Oxidasa*. Realice lo siguiente:
 - c) Colocar en un portaobjetos un trozo de papel filtro.
 - d) En condiciones asépticas y con un palillo de madera tomar una muestra del crecimiento obtenido en la placa de gelosa nutritiva y colocarla sobre el papel.
 - e) Colocar los palillos en un tubo vacío y taponarlo.
 - f) Agregar unas gotas del reactivo de TPD hasta impregnar totalmente el papel filtro.
 - g) La aparición de un color morado sobre la muestra durante los primeros segundos se considera como una prueba positiva.
7. *Catalasa*. Sobre el crecimiento obtenido en las placas de gelosa nutritiva o agar leche descremada agregar unas gotas de peróxido de hidrógeno (3%). La prueba positiva se manifiesta por la formación de burbujas debido a la descomposición del H_2O_2
8. *Utilización de diferentes fuentes de carbono*. En los tubos con caldo rojo de fenol más sacarosa o manitol, observe el vire del indicador de rojo a amarillo en donde además puede haber formación de gas, lo anterior indica la utilización de los compuestos empleados.
9. *Prueba de oxido/ fermentación y movilidad*. En los tubos con Hugh & Leifson más glucosa.
 - a) Las bacterias que se desarrollan y producen ácido (vire del indicador de verde a amarillo) en ambos tubos (sin y con aceite mineral) son fermentativas facultativas
 - b) Las bacterias que se desarrollan y producen ácido en el tubo sin aceite mineral son oxidativas.
 - c) Las bacterias que no utilizan el carbohidrato no producen cambio en ninguno de los dos tubos.
10. *Utilización de carbohidratos y producción de ácido sulfhídrico*. En Agar Kligler.
 - a) Pico y fondo alcalinos indican el desarrollo de bacterias incapaces de utilizar glucosa o la lactosa.
 - b) Pico y fondo ácidos a las 18 a 24 h (reacción inicial) indican la fermentación de glucosa.
 - c) Pico alcalino / fondo ácido a las 48 h (reacción tardía). El pico retorna a pH alcalino por la formación de aminos alcalinos procedentes de la descarboxilación oxidativa de proteínas cerca de la superficie. También indica fermentación de la glucosa.
 - d) Pico y fondos ácidos a la 48 h de incubación indican fermentación de la lactosa.
 - e) Desarrollo de un precipitado negro. Prueba positiva para la producción de ácido sulfhídrico (ver inciso 19).

11. *Utilización de citrato.* En agar Citrato de Simmons, la presencia de desarrollo bacteriano y el vire del indicador a un color azul intenso indica una prueba positiva.
12. *Hidrólisis de la urea.* En caldo urea, el vire del indicador a rojo o rosa intenso indica una prueba positiva.
13. *Descarboxilación de aminoácidos.* En el tubo con el medio MIO el vire del indicador a púrpura indica la descarboxilación de la ornitina. En este medio se puede observar además la movilidad de las bacterias, así como la producción de indol (ver incisos 17 y 18)
14. *Fermentación ácido mixta.* En uno de los tubos con caldo RM/VP incubados durante 72 h; agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo. La aparición de un color rojo estable en la superficie del cultivo indica una producción de ácidos suficientes para alcanzar un pH de 4.4 por lo que se considera la prueba positiva.
15. *Producción de acetoína como subproducto de una fermentación ácido mixta.* En el segundo tubo con caldo RM/VP incubado durante 24 h añadir 0.6 mL de α -Naftol y 0.2 mL de hidróxido de potasio (40%). La alteración en el orden de la adición de los reactivos puede originar resultados falsos. Agitar suavemente el tubo y dejar reposar de 10 a 15 minutos. La aparición de un color rojo indica una prueba positiva.
16. *Reducción de nitratos.* En el tubo con caldo nitrato y campana de Durham, observe si se produjo el desplazamiento del medio de cultivo en la campana lo que indica la producción de gas. Agregar 4 gotas de la solución A del reactivo de Griess y 4 gotas de la solución B del reactivo de Griess. El desarrollo de un color rojo indica la presencia de nitritos y que la bacteria produce la nitratorreductasa lo que corresponde a una prueba positiva. Dado que en esta prueba solo se detecta la presencia de nitritos, la ausencia de color indica:
 - a) Que los nitratos no fueron reducidos (prueba negativa) o
 - b) Que los nitratos fueron reducidos a productos diferentes a los nitritos, tales como amoníaco (reducción asimilatoria), óxido nítrico, óxido nitroso o nitrógeno molecular (desnitrificación o reducción desasimilatoria).

Para establecer a cual de las opciones anteriores corresponde el resultado, añadir una pequeña cantidad de zinc para reducir los nitratos presentes en el medio original a nitritos. El desarrollo de un color rojo indica la presencia de nitratos residuales, confirmándose la prueba negativa. En tanto que la ausencia de color indica una prueba positiva.

17. *Prueba Movilidad:* En los tubos con medio de SIM y MIO observe el crecimiento a lo largo de la picadura. La movilidad de los microorganismos se manifiesta por su migración desde la línea de siembra y su difusión en el medio lo que produce turbidez. Pueden mostrar estrías de crecimiento veloso (+). Cuando el crecimiento bacteriano se acentúa a lo largo de la línea de siembra y el medio que lo rodea permanece claro la prueba es negativa.
18. *Prueba del Indol.* Agregar unas gotas de Reactivo de Erlich o Kovac en la superficie de los medios SIM y MIO. La aparición de un anillo color rosa indica la formación de compuestos indólicos.
19. *Prueba del ácido sulfhídrico.* Observar la presencia de un precipitado negro en los tubos de los medios SIM y Kliger que indica la formación del ácido sulfhídrico.

Compare los resultados obtenidos con la cepa problema y los obtenidos por el grupo con las diferentes cepas de referencia, con base en lo anterior, proceda a establecer similitudes e identificar a cual pertenece la cepa aislada.

20. Registrar en el cuadro 18 las características metabólicas reportadas para la bacteria con la que encontró similitud.
21. Investigar las características metabólicas de la cepa de referencia con la que trabajo, con base en esta información proceder a comparar lo reportado en la bibliografía con los resultados obtenidos.

b) Siembra de galerías API (20E) para caracterización fisiológica rápida de enterobacterias.

1. Realizar la lectura de la galería API de acuerdo a lo indicado en la Tabla de Lectura (cuadro 19).
2. Registrar los resultados en las papeletas API correspondientes en el siguiente orden: Anotar primero todas las reacciones espontáneas y después revelar los ensayos que necesiten la adición de reactivos (TDA, reactivo TDA, tomar lectura de inmediato; IND, reactivo de Erlich, tomar lectura de inmediato; \square VP], reactivo α -Naftol + KOH 40%, tomar lectura después de 10 min). La prueba IND debe ser realizada en último lugar, pues esta reacción libera gases que pueden alterar la interpretación de las otras pruebas.

Nota: Si el número de pruebas positivas antes de añadir los reactivos (incluyendo el ensayo GLU) es inferior a 3, reincubar la galería 24 h más, sin volver a añadir los reactivos.

3. Obtener el perfil numérico de cada bacteria en la papeleta de resultados. Las pruebas están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 o 4. Como la galería se conforma de 20 ensayos, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. A la reacción de la oxidasa, con constituye la prueba n°. 21 se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva).
4. Identificar la identidad bacteriana mediante el Catálogo Analítico o con ayuda del Software.
5. Cuando el perfil de 7 cifras resulta insuficientemente discriminante, es necesario realizar los ensayos complementarios (consultar con el profesor).

Cuadro 18. Caracterización fisiológica de dos bacterias en estudio.

Prueba bioquímica	Cepa de referencia		Cepa problema	
	Nombre:	Clave:	Nombre:	Clave:
	Resultados obtenidos	Reportado en la bibliografía	Resultados obtenidos	Reportado en la bibliografía
Morfología				
Agrupación				
Gram				
Estructuras especiales				
Hemólisis				
Amilasa				
Caseinasa				
Gelatinasa				
DNA-asa				
Oxidasa				
Catalasa				
Utilización de sacarosa				
Utilización de manitol				
O/F Glucosa				
Kliger:				
a) Fermentación de Glu				
b) Fermentación de Lac				
c) Producción de H ₂ S				
Citrato				
Ureasa				
Descarboxilación				
a) Lisina				
b) ornitina				
c) arginina				
RM				
VP				
Reducción de NO ₃				
Fenilalanina-desaminasa				
SIM				
a) Producción de H ₂ S				
b) Indol				
c) Movilidad				

Cuadro 19. Tabla de Lectura para la lectura de resultados de la galería API 20E.

Prueba	Componentes activos	Reacciones/Enzimas	Resultados	
			Negativo	Positivo
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo ¹
ADH	L-arginina	Arginina dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado ²
LDC	L-lisina	Lisina decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado ²
ODC	L-ornitina	Ornitina decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado ²
CIT	citrato trisódico	Utilización del citrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul ³
H ₂ S	tiosulfato sódico	Producción de H ₂ S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
URE	Urea	Ureasa	amarillo	rojo/anaranjado ²
TDA	L-triptófano	Triptófano desaminasa	amarillo	marrón-rojizo
IND	L-triptófano	Producción de índoles	incoloro verde pálido/amarillo	rosa
VP	piruvato sódico	Producción de acetoína (Voges Proskawer)	incoloro/rosa pálido	rosa/rojo
GEL	gelatina (origen bovino)	Gelatinasa	no difusión	difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	Fermentación/Oxidación (glucosa) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	Fermentación/Oxidación (manitol) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
INO	Inositol	Fermentación/Oxidación (inositol) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
SOR	D-sorbitol	Fermentación/Oxidación (sorbitol) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
RHA	L-rhamnosa	Fermentación/Oxidación (rhamnosa) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
SAC	D-sacarosa	Fermentación/Oxidación (sacarosa) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
MEL	D-melibiosa	Fermentación/Oxidación (melibiosa) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
AMY	amigdalina	Fermentación/Oxidación (amygdalina) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
ARA	L-arabinosa	Fermentación/Oxidación (arabinosa) ⁴	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo
OX	Oxidasa	Citocromo Oxidasa	ver ficha técnica de la prueba de oxidasa	

1 Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.

2 La aparición de un color naranja tras 24-48 h de incubación corresponde a un resultado negativo.

3 Lectura en la cúpula (zona aeróbia).

4 La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.

5 Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 min, debe ser leída como negativa.

Precauciones generales

- Emplea los reactivos reveladores en orden y en buen estado, algunos de ellos necesitan prepararse en el momento.

Disposición de desechos

1. Esterilizar los tubos que contienen los palillos y posteriormente desechar los palillos en el bote de basura y lavar los tubos con agua y jabón.
2. Esterilizar el material de vidrio en los que realizó sus lecturas y posteriormente lavar.
3. Sellar con maskin-tape las cajas de Petri de plástico que contengan cultivos y colocar en el contenedor ubicado en el laboratorio 1A.
4. Las galerías API se aseguran con maskin-tape y se desechan colocándolas en el contenedor rojo del laboratorio 1A.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Qué variables pudieron causar errores al momento de revelar las pruebas bioquímicas?
2. ¿Cuáles crees que sean las variables que tú puedas controlar? ¿Por qué?
3. ¿Por qué empleaste la galería API 20E? ¿Cuál es su importancia?
4. ¿Qué ventajas y desventajas encuentras al emplear tanto las pruebas bioquímicas tradicionales como las galerías API para determinar la fisiología bacteriana?

Literatura de consulta

- Koneman, E. W., S. D. Allen, W. M. Jamda, P. C. Scneckenenherger y W. Winn. 1999. *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas color*. 5ª edición. Médica Panamericana, S. A. Argentina
- Mac Faddin J. F. 2003. *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. 3ª edición Médica Panamericana, S. A. De C. V. México
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. *Manual de Prácticas de Microbiología General*. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Prescott Lansing M., Harley Jonh P. y Klemm Donald A. 2005. *Microbiology*. 6a. ed. McGraw Hill. 992 pp
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. *Microbiology an Introduction*. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. *Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada*. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina
- www.biomerieux.es

UNIDAD VII.

**TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE
MICROORGANISMOS. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO
DEL AGUA Y OTRAS MUESTRAS**

TÉCNICAS PARA LA ENUMERACIÓN DE MICROORGANISMOS. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL AGUA Y OTRAS MUESTRAS

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

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

Introducción

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

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

PRÁCTICA 7.1

Técnica de Cuenta Directa: Método de Breed y Método Redox.

Materiales

Muestras

Leche pasteurizada
Leche no pasteurizada
Leche cruda o bronca (de establo)
Vino caducado o una muestra microbiana preparada

Material por grupo

Cajas Koplín con Xilol
Cajas Koplín con Etanol (96°)

Material por mesa

Solución de resazurina (diazoresorcínol)
Solución de tiocianato de azul de metileno (para reductasas)
Frasco gotero con azul de metileno

Material por equipo:

Microscopio
Objetivo micrométrico
Pipetas graduadas de 10 mL (esterilizar para la siguiente clase)
Pipetas graduadas de 5 mL (esterilizar para la siguiente clase)
Pipetas graduadas de 1.0 mL (esterilizar para la siguiente clase)
Tubos de ensayo de 16x150 estériles con tapón de rosca (esterilizar para la siguiente clase)

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros
Gradillas
Portaobjetos
Tubos de ensayo de 16x150 con tapón de rosca estériles
Pipetas de 10 mL estériles
Pipetas de 1.0 mL estériles
Pipetas de 0.1 mL estériles
Pipetero

Metodología

Método de Breed (cuenta directa).

Cálculo del factor microscópico (FM):

1. Medir el diámetro del campo microscópico por medio del micrómetro objetivo, en mm.
2. Determinar el área del campo: elevar el radio al cuadrado y multiplicar por 3.1416. Dividir este resultado entre 100 para obtener el área del campo en centímetros cuadrados.
3. Determinar el número de dichos campos en 1 cm², dividiendo 1 cm² entre el área del campo obtenido antes.
4. Como se coloca 0.01 mL de leche en un área de 1 cm², multiplicar el número de campos por 100 para conocer el número de campos microscópicos por mL de leche.
- 5.

Preparación de la muestra:

1. En un portaobjetos desengrasado marcar un área de 1 cm².
2. Agitar la muestra de leche de 25 a 30 veces.
3. Con una pipeta estéril tomar 0.01 mL de la leche (de preferencia utilizar leche descremada o light) y transferirlo al portaobjetos previamente marcado, extendiendo la muestra en el área marcada con el asa.
4. Dejar secar al aire.
5. Sumergir el frote en xilol durante 2 min.
6. Sacarlo del xilol y sumergirlo en etanol durante otros 2 min.
7. Sacar el frote del etanol y cubrirlo con solución de azul de metileno durante 2 min. Lavar con agua. Dejar secar al aire.
8. Observar en el microscopio con objetivo de inmersión y contar el número de microorganismos por campo, obteniendo el promedio de 5 campos.
9. Calcular el FM.
10. Calcular el número de bacterias por mL de leche.

Método Redox (reducción del azul de metileno).

Reducción del azul de metileno:

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

6. Anotar los resultados obtenidos en la práctica, de acuerdo con la clasificación indicada en el cuadro 20.

Cuadro 20. Clasificación de la calidad de leche y número de microorganismos, mediante la técnica de reducción del azul de metileno.

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

Precauciones generales

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

Disposición de desechos

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

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Cuál fue la problemática a la que te enfrentaste para llevar a cabo los métodos de Breed y Redox?
2. Discute acerca de la eficacia de los métodos empleados para conocer la calidad y cantidad de microorganismos presentes en la leche.

Literatura de consulta

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.

- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20th ed. Washington.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1^a edición. Atlante S. R. L. Argentina

Materiales

Material por equipo

Nefelómetro o espectrofotómetro

Matraz nefelométrico conteniendo un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* de 24 hrs.

Curva de McFarland recién preparada

Pipeta graduada 1.0 mL estéril

Material por equipo

Piseta con agua destilada

Papel absorbente

Celdas para nefelómetro o para espectrofotómetro

Tubos de ensaye con 9.0 mL de SSI estéril

Metodología

Cálculo del número de microorganismos presentes en la muestra problema

1. Agitar suavemente el matraz que contiene el cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*, y preparar diferentes diluciones en tubos con SSI (muestra problema). Etiquetar los tubos con la dilución correspondiente.
2. Agregar 1 gota de formaldehído a los tubos con la muestra problema.
3. Vaciar el contenido de cada una de las muestra problema en celdas espectrofotométricas y proceder a tomar la lectura de densidad óptica (D.O.) o % de transmitancia.
4. Seguir las instrucciones de uso y cuidado del espectrofotómetro.
5. Insertar la celda con la muestra problema en el espectrofotómetro y tomar la lectura del % de transmitancia.
6. Construir una gráfica (y =Número de microorganismos, x =% transmitancia) con la Curva de McFarland. Registrar los resultados en el cuadro 21.
7. Obtener la ecuación de la recta ($y=mx+b$) a partir de la curva e interpolar los datos obtenidos para cada muestra problema en la curva de McFarland.

Precauciones generales

- Procura homogenizar perfectamente tus cultivos al realizar cada dilución, y antes de leer el % transmitancia.
- Leer previamente el uso y cuidado del espectrofotómetro.

Cuadro 21. Datos para elaborar la curva de McFarland

Tubo	Número de microorganismos (X)	Densidad Óptica (Y)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		

Disposición de desechos

1. Desechar en la tarja el contenido de los tubos en los que preparó las diluciones microbianas y posteriormente lavarlos.

Literatura de consulta

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

PRÁCTICA 7.3

Método del Dilución y vertido en placa

Materiales

Muestra

Muestra sólida (materia prima, suelo, alimento)

Material por grupo

Baño de agua a 50° C

Balanza

Espátulas flameadas

Papel encerado estéril

Vortex

Material por equipo

Mechero

Gradilla

Tubos de ensaye con 9 mL de SSIE

Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 90 mL de SSI estéril

Matraz Erlenmeyer (250 mL) con 150 mL de agar triptona glucosa extracto de levadura (TGEA) estéril.

Pipetas graduadas de 1 mL estériles

Cajas Petri de plástico desechable estériles

Metodología

1. Etiquetar los tubos con las siguientes diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} . Así como las cajas Petri por duplicado (Figura 11).
2. Pesar 10 g de muestra y mezclar con la SSI del matraz (Suspensión).
3. Homogenizar vigorosamente durante 5 minutos.
4. En condiciones asépticas, realizar tres diluciones decimales a partir de la suspensión: tomar 1.0 mL e inocular el tubo 10^{-1} ; subir y bajar la suspensión con la misma pipeta para homogenizar la dilución. Repetir la operación hasta concluir con la dilución 10^{-3} .
5. A partir de la dilución 10^{-3} tomar 1.0 mL y depositar en una caja Petri vacía (por duplicado). Repetir con la dilución 10^{-2} y 10^{-1} .
6. Verter, en cada caja el medio TGEA previamente fundido (aproximadamente 20 mL) y a una temperatura de 45° C.
7. Homogeneizar cuidadosamente; para ello mezclar el inóculo con el medio, colocando la caja sobre la mesa y girar 5 veces en el sentido de las manecillas del reloj, 5 veces en sentido inverso, 5 veces hacía adelante atrás y 5 en sentido horizontal.
8. Dejar solidificar e invertir las cajas.

9. La caja Petri etiquetada como "Control" no es inoculada con la muestra.
10. Incubar a 37° C durante 24 horas.
11. Al término de la incubación, hacer el recuento de las Unidades Formadoras de Colonia (UFC)/mL. Registrar en el cuadro 22.

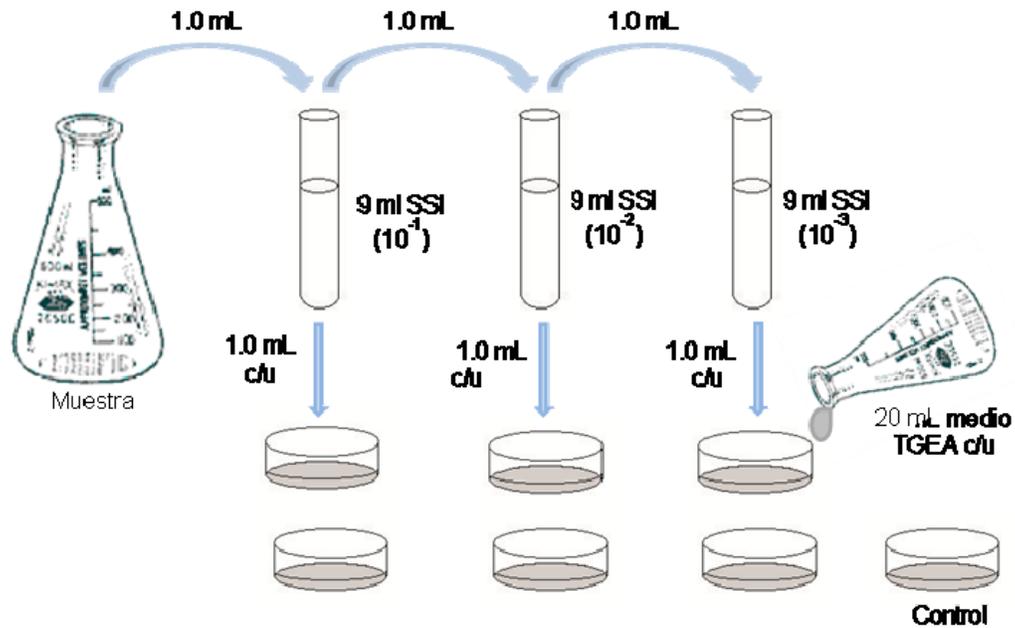


Figura 11. Método de dilución y vertido en placa.

Determinación de microorganismos mesófilos aerobios

Cuadro 22. Registro de las UFC obtenidas mediante la técnicas de dilución y vertido en placa.

Repetición de cada dilución	Dilución		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
A			
B			
X			

Precauciones generales

- Procura que el agar esté a 45° C para verterlo en las cajas de Petri con las muestras.
- Homogenizar perfectamente el medio de cultivo con la muestra.
- Procura mantener limpias la superficie de las cajas para tener una cuenta de UFC confiable.

Disposición de desechos

1. Esteriliza los tubos en los que preparó las diluciones microbianas y posteriormente desecha el contenido en la tarja y lavarlos.
2. Las placas Petri se desechan en los contenedores correspondientes para este material.

Guía para la discusión de resultados

1. En la técnica de dilución y siembra por placa vertida ¿se observa el efecto de dilución? Fundamenta tu respuesta.
2. ¿Se obtuvieron resultados similares con la técnicas turbidimétrica y la de dilución y vertido en placa? ¿Por qué?
3. ¿Cuál de las dos técnicas la consideras más confiable? ¿Por qué?
4. ¿Qué precauciones propondrías para mejorar las técnicas de dilución y siembra por placa vertida y el método turbidimétrico?

Literatura de consulta

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

Materiales

Material por equipo:

Equipo *Millipore* para filtración (matraz, soporte, embudo, pinzas) estéril

Membrana *Millipore* estériles de 5 cm de diámetro y 0.45 µm de poro

Matraz Erlenmeyer con 100 mL de SSI estéril

Placa Petri de agar bilis rojo violeta (ABRV)

Vaso de precipitado de 250 mL

Pinzas *Millipore*

Manguera para vacío

Material que deben tener los alumnos:

Muestra de agua potable (agua de filtro, sistema Biozone^{MR}, purificadora (rellenadora))

Mecheros

Gradillas

Asas

Etanol (96°) para flamear pinzas

Pinzas de punta roma

Metodología

1. En condiciones de asepsia, montar el equipo *Millipore* y conectarlo al sistema de vacío.
2. Con las pinzas *Millipore*, previamente flameadas con alcohol y enfriadas, colocar la membrana *Millipore* en el soporte, montar nuevamente el embudo y fijarlo con la pinza adaptadora.
3. Mantener el vacío cerrado.
4. Agitar suavemente el frasco que contiene la muestra de agua y verter un volumen conocido de ella en el embudo del equipo *Millipore*.
5. Abrir la llave del vacío.
6. Filtrar; cuando haya pasado toda la muestra, lavar el embudo con la solución salina estéril (100 mL).
7. Cerrar el vacío antes de retirar la membrana.
8. Retirar la membrana tomándola con las pinzas *Millipore*, previamente flameadas con alcohol y enfriadas. Depositarla asépticamente la membrana sobre la placa de ABRV, asegurando el contacto de la membrana con el medio y sin dejar burbujas de aire.
9. Incubar a 37° C durante 24-48 h.
10. Al término de la incubación: Revisar las membranas sobre las placas y ubicar la presencia de colonias de bacterias coliformes.

11. Utilizar un cuentacolonia para contar las colonias características y calcular el número de UFC /100 mL de muestra.
12. Consultar la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, que señala los límites permitidos de bacterias coliformes fecales y confirmar si el agua analizada reúne y cumple con lo establecido.

Precauciones generales

- Si la muestra de agua, que se usará para la cuantificación de bacterias coliformes mediante la técnica de filtración, está turbia (presencia de sólidos), será necesario diluirla o cambiar de muestra.

Disposición de desechos

1. Después de realizar las lecturas correspondientes, sellar las cajas de Petri de plástico con la membrana *Millipore* y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Qué ventajas y desventajas encuentras al utilizar esta técnica respecto a otras técnicas? Fundamenta tu respuesta.

Literatura de consulta

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

PRÁCTICA 7.5

Análisis microbiológico del agua por el Método del Número Más Probable (NMP)

Objetivos

- Explicar el concepto microbiológico de indicador de contaminación.
- Evaluar la calidad sanitaria de muestras de agua mediante el recuento de mesófilos aeróbios y la búsqueda de microorganismos coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli*.
- Diferenciar los organismos coliformes totales de los microorganismos coliformes fecales.

Introducción

La determinación de la calidad bacteriológica reviste gran importancia en el ámbito de la salud pública ya que permite garantizar la inocuidad del agua destinada al consumo evitando así las epidemias gastrointestinales.

El agua destinada al consumo humano puede ser contaminada por las aguas residuales o por desechos humanos y animales que pueden contener microorganismos patógenos (principalmente intestinales) como son las causantes de la tifoidea (*Salmonella typhi*), la disentería (*Shigella dysenteriae*) o el cólera (*Vibrio cholerae*) entre otros.

Sin embargo, la detección de microorganismos patógenos es poco práctica por las siguientes razones:

- a) No siempre están presentes en la fuente de contaminación (material fecal), pero pueden aparecer repentinamente.
- b) Al diluirse en el agua, pueden quedar en concentraciones no detectables por los métodos de laboratorio.
- c) Sobreviven relativamente poco tiempo en el agua, por lo que pueden desaparecer antes de detectarlos.
- d) Los resultados del análisis bacteriológico del agua se obtienen después que ésta ha sido consumida, por lo cual si hay patógenos, la población habrá estado expuesta a la infección.

Todo esto hace indispensable una medida de control más efectiva como es la detección del peligro potencial; es decir, la advertencia del riesgo de contaminación con microorganismos patógenos antes de que aparezcan. Para detectar ese peligro potencial se utilizan “indicadores de contaminación” que reúnen las siguientes características:

- a) Se encuentran como flora normal en la fuente de contaminación, es decir, en la materia fecal, independientemente de que haya o no microorganismos patógenos.
- b) Son más resistentes y sobreviven en el agua más tiempo que los patógenos.
- c) Su detección en el laboratorio es relativamente rápida, fácil y confiable.

Las bacterias coliformes reúnen las características anteriores, ya que se encuentran en grandes cantidades en el tracto intestinal del hombre de los mamíferos y por lo tanto en sus heces y es fácil diferenciar las especies coliformes de origen fecal de las que no lo son. La sobrevivencia de coliformes en el agua es mayor que la de cualquier bacteria enteropatógena y su identificación es fácil y confiable.

Por tanto, el aspecto más importante del análisis bacteriológico del agua es la determinación de coliformes que puede hacerse por el método del número más probable (NMP), la determinación de bacterias mesófilas aerobias o por el método de filtración de membrana.

MUESTREO 1. Agua almacenada

Materiales

Muestra

Agua almacenada (cisterna)

Material por grupo

Tiosulfato de sodio (10%)

Etanol

Algodón

Material por equipo

Frasco de boca ancha con tapa

Papel kraft

Pipeta 1 mL

Metodología

Preparación de frascos para la toma de muestra

1. Lavar perfectamente el frasco, eliminando todo resto de jabón o detergente.
2. Agregar al frasco tiosulfato de sodio (10%): 0.5 mL / 500 mL volumen del frasco.
3. Cubrir la tapa y el cuello del frasco con una tira de papel kraft. No cerrar herméticamente.
4. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 min.

Toma de la muestra

1. Lavarse y desinfectarse las manos.
2. A partir de grifos: desinfectar el grifo con algodón y etanol. Dejar correr el agua por 3 minutos.
3. Generar una zona aséptica cuando sea posible hacerlo.
4. Destapar el frasco, y llenar hasta $\frac{3}{4}$ partes del recipiente y tapar inmediatamente.
5. A partir de depósitos naturales y cuerpos receptores: retirar la cubierta de papel y sostener el frasco por la base e introducirlo aproximadamente 30 cm en el agua.
6. Llenar hasta $\frac{3}{4}$ partes del recipiente y tapar inmediatamente.
7. En ambos casos, etiquetar el frasco y elaborar una hoja de registro de datos.
8. Conservar la muestra en refrigeración hasta su análisis en el laboratorio.

MUESTREO 2. Hielo

Materiales

Muestra

Hielo para raspados (sin adicionar jarabe) o hielo granizado (reparten para tiendas)

Material por equipo

Bolsa de plástico con cierre (*ziploc*)

Pipeta de 1 mL

Metodología

Toma de muestra

1. Comprar con un día de anterioridad 3 vasos de hielo para raspado o del granizado y colocarlo en la bolsa plástica.
2. Cerrar inmediatamente y refrigerar (no congelar) hasta su análisis en el laboratorio.

DETERMINACIÓN DEL NMP DE COLIFORMES FECALES EN AGUA O HIELO

Materiales

Muestra

Tubos de ensaye con tapón de rosca (22x175) con 10 mL de caldo lauril sulfato de sodio (CLSS) triple concentración (3X), con campana de Durham.

Tubos de ensaye con tapón de rosca (16x150) con caldo de bilis verde brillante (2%), con campana de Durham.

Tubos de ensaye con tapón de rosca (16x150) con caldo EC, con campana de Durham.

Pipetas graduadas de 1.0 mL

Metodología

Prueba presuntiva de microorganismos coliformes totales

1. A partir de la muestra de agua inocular 20 mL en cada uno de los tubos con CLSS (3X) con campana de Durham (Figura 12).
2. Incubar los medios a 35° C durante 24 hrs.
3. Observar si hay formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham), si no se observara tal producción, incubar 24 horas más.

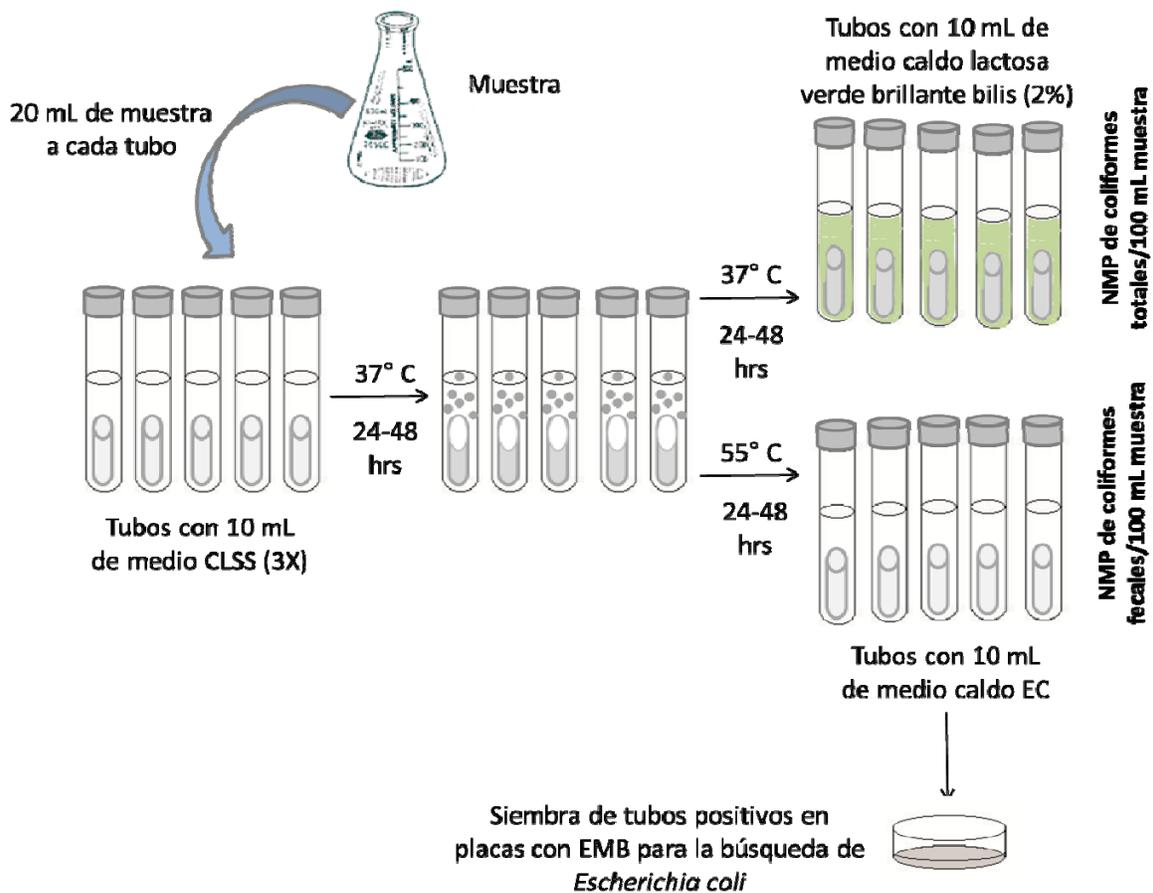


Figura 12. Determinación del Número Más Probable de microorganismos coliformes.

Prueba confirmativa de microorganismos coliformes totales

1. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos que contienen caldo de bilis verde brillante (2%) con campana de Durham.
2. Agitar suavemente los tubos con el medio para su homogeneización.
3. Incubar a 35° C durante 24 a 48 hrs.
4. Registrar como tubos positivos aquellos tubos con medio donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas, después del periodo de incubación.
5. Consultar el cuadro 23 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes totales / 100 mL.

Cuadro 23. NMP de organismos coliformes por 100 mL de muestra.

Número de tubos positivos	NMP / 100 mL
0	< 1.1
1	1.1
2	2.6
3	4.6
4	8.0
5	> 8.0

CCAYAC-M-004 (2006). Estimación de la densidad microbiana por la técnica del NMP, detección de coliformes totales y coliformes fecales y *E. coli* por NMP (COFEPRIS).

Prueba confirmativa de microorganismos coliformes fecales

1. Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo durante la prueba presuntiva a tubos con caldo EC.
2. Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
3. Incubar a 45° C durante 24 a 48 hrs.
4. Registrar como positivos todos los tubos en donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas, después del periodo de incubación.
5. Consultar el cuadro 23 de NMP para conocer el número más probable de organismos coliformes fecales / 100 mL.

Control de calidad para coliformes fecales

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

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS COLIFORMES

Materiales

Microscopio

Juego de colorantes Gram

Gradilla

Placa con agar Cuenta Estándar

Placa con agar EMB

Tubos de ensaye (13x100) con medio SIM

Tubos de ensaye (13x100) con medio RM/VP

Tubos de ensaye (13x100) con medio Citrato de Simmon's

Tubos de ensaye (16x150) con 2 mL de SSI estéril

Metodología

Prueba confirmativa para *Escherichia coli*

1. Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos en EC y sembrar por estría cruzada en agar EMB para su aislamiento.
2. Incubar las placas a 35° C durante 18 a 24 horas.
3. Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología: colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Si no hay colonias con morfología típica probar una o más colonias lo más parecida a *E. coli* de cada placa y sembrarlas en agar Cuenta Estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas.
4. Incubar las placas a 35° C durante 18 a 24 horas.
5. Hacer un frotis y teñir con Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram negativos.

Identificación bioquímica de *Escherichia coli* mediante pruebas IMViC

A partir de las placas con agar Cuenta Estándar, seleccionar una colonia, resuspenderla en 2 mL de SSI estéril para realizar las siguientes pruebas bioquímicas:

a) Producción de indol

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana e inocular un tubo con medio SIM.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. Adicionar entre 0.2 y 0.3 mL de reactivo de Ehrlich o Kovacs.
4. La presencia de un anillo rojo en la superficie del tubo se considera como prueba positiva para la presencia de indol.

b) Producción de ácidos mixtos (prueba RM)

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga caldo RM/VP.
2. Incubar a 35° C durante 48 horas.
3. Adicionar 5 gotas de solución Rojo de Metilo.
4. Se considera una prueba positiva cuando se desarrolla un color rojo en el medio. Un color amarillo es una prueba negativa.

c) Producción de metabolitos neutros (prueba VP).

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga caldo RM/VP.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. Adicionar 0.6 mL de KOH (40%), agitar y 0.2 mL de alfa-naftol. Agitar.
4. Dejar reposar el tubo destapado durante 10 minutos. Se considera una prueba positiva cuando se desarrollo un color rosa en la superficie.

d) Utilización del citrato

1. Tomar una asada de la suspensión bacteriana a inocular un tubo que contenga el medio Citrato de Simmon's.
2. Incubar a 35° C durante 24 horas.
3. El desarrollo del cultivo que se observa con la turbiedad del medio y el vire del indicador a azul, se considera como prueba positiva.

Disposición de desechos

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

Guía para la discusión de resultados

1. ¿Cuáles son los puntos críticos para realizar las técnicas del NMP?
2. ¿Cuáles fueron las dificultades a las que te enfrentaste al realizar la lectura de ésta técnica?
3. Discute sobre la información que te proporciona esta técnica.

Literatura de consulta

- CCAYAC-M-004 (2006) "Estimación de la densidad microbiana por la técnica del número más probable, detección de coliformes totales, coliformes fecales y *Escherichia coli* por el número más probable".
- Collins C.H. y Lyne Patricia M. 1989. Métodos Microbiológicos. ACRIBIA. 524 pp

- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8th ed.
- Food and Drug Administration (2003) "Bacteriological Analytical Manual" 9th ed. Arlington, VA:AOAC.
- Norma Oficial Mexicana NOM-041-SSA1-1993. Bienes y servicios. Agua purificada envasada. Especificaciones sanitarias.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10^a Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5^a edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater. 1998. American Public Health Association. 20th ed. Washington.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. *Microbiology an Introduction*. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. *Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada*. 1^a edición. Atlante S. R. L. Argentina

UNIDAD VIII.

**CONDICIONES AMBIENTALES PARA EL
DESARROLLO, INHIBICIÓN Y DESTRUCCIÓN DE
LOS MICROORGANISMOS**

PRÁCTICA 8.1
Determinación del Efecto de pH, Temperatura y Concentración de Solutos

PRÁCTICA 8.2
Determinación del Efecto Letal y Mutagénico de las Radiaciones UV

PRÁCTICA 8.3
Efecto Biocida y Biostático de Diferentes Agentes Químicos en el Desarrollo Microbiano

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Explicar el efecto de factores físicos y químicos sobre el desarrollo de los microorganismos.
- Distinguir entre el efecto mutagénico y letal ocasionado por las radiaciones UV.

Introducción

En la naturaleza, así como en condiciones de laboratorio, la actividad de los microorganismos esta regida por las variables ambientales tales como: pH, temperatura, presión osmótica, humedad, radiaciones, tipo y concentración de sustancias químicas. Por lo que el conocimiento del efecto de estas variables sobre el desarrollo de los microorganismos permite controlar el crecimiento de los mismos, ya sea para favorecer o limitar su desarrollo o bien para eliminarlos de un área o producto contaminado.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

Serratia marcescens

Micrococcus luteus

Pseudomonas aeruginosa

Bacillus sp

Material por grupo:

Campana con lámpara de luz UV

Incubadoras a diferentes temperaturas (28, 37, 42, 55°C)

Refrigerador (4°C)

Soluciones estándar de cloramfenicol de 10, 30 y 50 µg/ mL estériles

Soluciones acuosas de cristal violeta al 0.1, 0.5 y 1.0 %

Soluciones acuosas de Verde de malaquita al 0.1, 0.5 y 1.0 %

Sensidiscos para Gram + y – (o pemprocilina y cloranfenicol)

Material por equipo:

Placas de Petri con TSA o gelosa nutritiva

Tubos de ensayo de 22x175 con 20 mL de BHI o TSA

Tubos de ensayo de 16x150:

2 con 5.0 mL de SSI estéril

10 con 7 mL de caldo nutritivo

8 con 7.0 mL de caldo nutritivo con diferentes pH (4.0, 5.0, 7.0 y 9.0, 2 de c/ u)

10 con 7.0 mL de caldo nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl (1, 4, 7,

10 y 15 % (2 de c/ u)

8 con 9.0 mL de caldo para antibióticos #3.

Tripie

Lámina metálica

Termómetro

Vaso de precipitados de 250 mL

Tubos de ensayo de 16x150

Hisopos

Material que deben tener los alumnos:

Muestras de desinfectantes de uso común tales como: Benzal^{MR}, Isodine^{MR}, Merthiolate^{MR}, Solución de hipoclorito (5%), Triclosán^{MR} (enjuague bucal), solución de vinagre, solución de manzanilla (gotas oftálmicas), Maestro Limpio^{MR}, PínoI^{MR}, Jabón líquido para las manos, Jabón líquido para trastes.

Mecheros

Gradillas

Asas

Cajas de Petri de plástico desechables estériles

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Una caja de Petri de vidrio con 40 discos de papel filtro grueso de 7 mm de diámetro estériles (perforadora)

Pinzas largas de punta roma

Papel aluminio

Círculos de cartón grueso negro, dejando un cuadrante al descubierto

Vasitos desechables de 10 mL de capacidad

Metodología

Inocular un tubo de ensayo de 16x150 con 7 mL de SSI estéril con una asada del cultivo bacteriano (cepa problema o de referencia con 24 h de incubación previa), éste será nuestra suspensión bacteriana.

a) Efecto de temperatura, pH y concentración de solutos.

1. Colocar en el área de trabajo una gradilla con el siguiente material debidamente etiquetado:

5 tubos con caldo nutritivo,
 4 con caldo nutritivo a diferentes pH (2, 5, 7 y 9)
 5 con caldo nutritivo con diferentes concentraciones de NaCl (1, 4, 7, 10 y 15%)

2. A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL cada uno de los tubos de ensayo con caldo nutritivo indicados en el punto 1 (Figura 13).
3. Incubar un tubo de ensayo con caldo nutritivo, de cada cepa, a diferentes temperaturas (4, 28, 37, 42, 55°C). Los tubos de ensayo con caldo nutritivo con diferentes pH's y concentraciones de NaCl, incubarlos a 37°C de 24-48 h.
4. Registrar la turbidez provocada por el desarrollo microbiano en cada uno de los tubos.
5. Registrar los resultados en el cuadro 24.

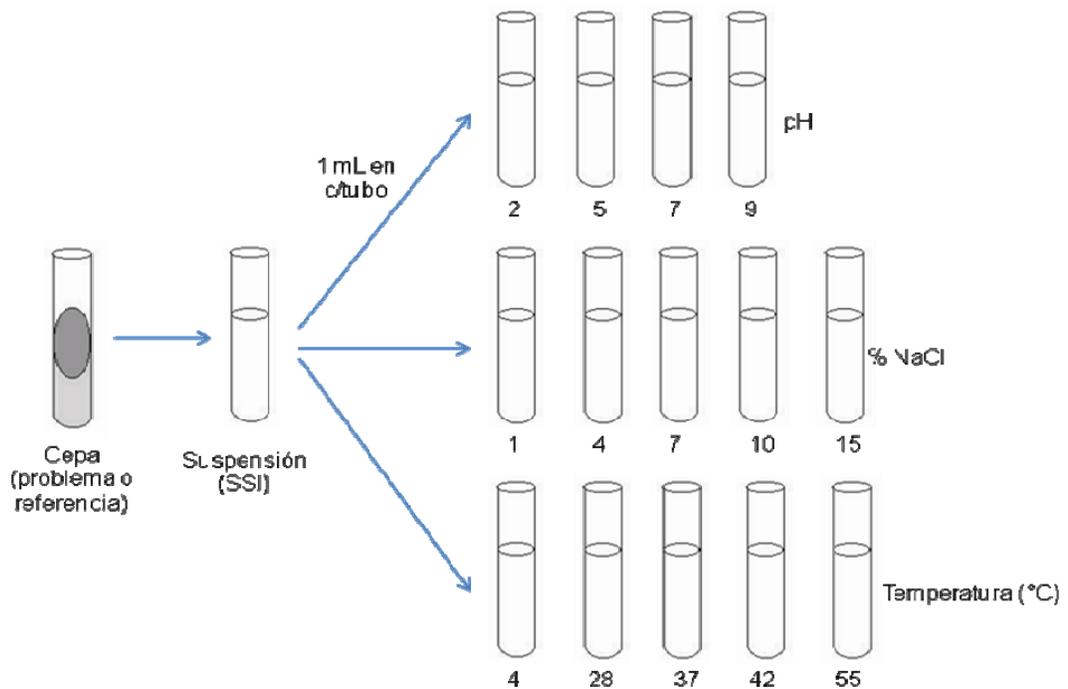


Figura 13. Efecto de los factores físicos ambientales en el desarrollo microbiano.

b) Efecto letal y mutagénico de las radiaciones UV.

1. A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL cuatro placas Petri con TSA o gelosa nutritiva. Dos placas con la cepa problema y dos con la cepa de referencia.
2. Extender el inóculo en toda la superficie de cada placa mediante un hisopo o una varilla de vidrio en L previamente esterilizada y dejar que el inóculo se absorba en el medio.

3. Rotular en cuadrantes por la parte externa, y en la base, las placas inoculadas. Marcar un cuadrante como control "C", y los demás con el tiempo de exposición que se aplicará con luz UV (30, 60 y 90 seg).
4. Colocar las placas bajo la lámpara de luz UV a una distancia aproximada de 20 cm de la fuente de luz.
5. Retirar las tapas de las placas inoculadas y sustituirlas por los círculos negros de tal manera que quede descubierto uno de los cuadrantes y radiar durante 30 segundos.
6. Apagar la lámpara y girar el círculo a modo de descubrir el 2° sector y radiar por 60 segundos.
7. Repetir el procedimiento para radiar el 3er sector durante 90 segundos. El cuadrante control no se irradia.
8. Cubrir las placas con sus tapas correspondientes.
8. Envolver una de las placas con papel aluminio, y la otra exponerla a la luz solar durante 30 minutos y envolver con papel aluminio.
9. Invertir las cajas e incubar a 28°C de 24-48 horas.
10. Registrar el desarrollo microbiano presente en cada cuadrante de cada placa, y anotar las características coloniales y compararlas en cada caso.
11. Registrar los resultados en el cuadro 25.

Cuadro 24. Efecto de los factores físicos ambientales en el desarrollo microbiano.

Factores físicos/Cepas		Desarrollo microbiano*							
		<i>Serratia marcescens</i>		<i>Bacillus sp</i>		<i>Micrococcus luteus</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
Tiempo		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
°C	4								
	28								
	37								
	42								
	55								
pH	2								
	5								
	7								
	9								
%NaCl	1								
	4								
	7								
	10								
	15								

*Indicar: +++ = desarrollo abundante, ++ = desarrollo medio, + = desarrollo escaso, - = sin desarrollo.

Cuadro 25. Efecto letal y mutagénico de las radiaciones UV en el desarrollo microbiano.

Caja	Tiempo de exposición (seg)	Nombre científico de la cepa de referencia:	
		Desarrollo*	Características coloniales
1 (con sol)	0		
	30		
	60		
	90		
2 (sinsol)	0		
	30		
	60		
	90		

*Indicar: +++ = desarrollo abundante, ++ = desarrollo medio, + = desarrollo escaso, - = sin desarrollo.

c) Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.

A partir de la suspensión bacteriana inocular con 0.1 mL ocho tubos de ensayo de 22x175 con gelosa nutritiva, previamente fundida, homogenizar y verter inmediatamente en cajas Petri de plástico desechables estériles (cuatro tubos para la cepa problema y cuatro para la cepa de referencia). Así mismo inocular seis tubos con caldo para antibióticos #3 (tres tubos para la cepa problema y tres para la cepa de referencia).

c.1) Concentración de colorantes y otros agentes químicos (limpiadores, desinfectantes, antisépticos).

1. Dividir las cajas inoculadas en cuadrantes y rotular como control "C", y con cada uno de los agentes químicos, respectivamente.
2. En 8 vasitos desechables colocar unas gotas de la muestra de los agentes químicos a probar (1 por vaso).
3. En condiciones asépticas (cerca del mechero y con la pinzas de punta roma flameadas), impregnar los discos de papel filtro en la soluciones de colorantes (cristal violeta o verde de malaquita a diferentes concentraciones) y en los diferentes agentes químicos. Procurar escurrir los discos antes de ser colocados en las placas Petri con gelosa nutritiva inoculadas.
4. Colocar en la primera placa los discos impregnados con las soluciones de colorantes y el control (no se coloca disco); en la segunda y tercera placa, los discos impregnados con los diferentes agentes químicos c/u; y en la cuarta placa los antibióticos.
5. Incubar a 37° C durante 24 hrs.
6. Registrar el diámetro de los posibles halos de inhibición formados alrededor de los discos de papel filtro sobre el desarrollo microbiano de cada placa (Cuadro 26).
7. Incubar a 37° C durante 24 horas más.

8. Registrar los cambios en el diámetro de los posibles halos de inhibición formados alrededor de los discos de papel filtro sobre el desarrollo microbiano de cada placa (Cuadro 26).
9. De las cajas en las que determinó el efecto de los agentes químicos por difusión en placa, seleccionar 4 de ellos que hayan mostrado los mayores halos de inhibición.
10. Marcar los cuadrantes de la segunda caja con los agentes químicos correspondientes.
11. Tomar una asada del halo de inhibición y sembrar por estría recta el sector correspondiente.
12. Repetir el procedimiento con los otros tres agentes.
13. Incubar a 37°C durante 24 hrs.
14. Registrar los resultados en el cuadro 26.

Cuadro 26. Efecto biocida y biostático de diferentes agentes químicos en el desarrollo microbiano.

Agentes químicos		Formación de halos de inhibición a las 24 y 48 hrs*			
Nombre del colorante	(%)	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	0.1	,	,	,	,
	0.5	,	,	,	,
	1.0	,	,	,	,
Nombre del agente químico**			,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
		,	,	,	,
Resiembr	Desinfectantes				
	1				
	2				
	3				
	4				

*Indicar el diámetro (mm) de los posibles halos de inhibición formados a los 24 y 48 horas.

**Desinfectante, antisépticos, limpiadores, etc.

c.2) Antibióticos.

1. Colocar sensibilizadores de diferentes antibióticos en cada uno de los cuadrantes de la cuarta placa de gelosa nutritiva previamente inoculada.
2. Etiquetar los 4 tubos con caldo para antibióticos # 3 (previamente inoculados) con "C", 1, 3 y 5 µg/ mL del antibiótico a evaluar.
3. Agregar 1 mL de cada solución estándar del antibiótico para tener la concentración deseada.
4. Incubar a 37°C durante 24 hrs.
5. Al término de la incubación: dividir dos cajas con TSA o BHI en cuadrantes.
6. Marcar en una de las cajas, los cuadrantes con "C", 1, 3 y 5 µg/ mL
7. A partir del tubo "C" (inoculado la clase anterior), inocular por estría recta el sector correspondiente.
8. Repetir el procedimiento con los tubos inoculados la clase anterior a los que agregó 1, 3 y 5 g/ mL del antibiótico sembrando en los cuadrantes correspondientes.
9. Incubar a 37°C durante 24 hrs.
10. Registrar los resultados en el cuadro 27.

Cuadro 27. Efecto biocida y biostático de antibióticos en el desarrollo microbiano.

Agentes químicos		Desarrollo*			
Nombre del antibiótico		<i>Serratia marcescens</i>	<i>Bacillus sp</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Cloranfenicol	µg/ mL				
Tubo	0				
	1				
	3				
	5				
Caja	0				
	1				
	3				
	5				

Precauciones generales

1. Se recomienda que las cepas de referencia a usar para evaluar el efecto de fotorreactivación (irradiaciones con luz UV) sean *Serratia marcescens* o *Micrococcus luteus*.
2. Procura que la lámpara de luz UV quede a 20 cm de las placas a irradiar.
3. Al inocular los tubos de ensayo de 16x150 con caldo nutritivo (pH, %NaCl) evitar tocar el medio de cultivo con la misma pipeta.

Disposición de desechos

1. Esterilizar los tubos en los que preparó las suspensiones bacterianas, desechar en tarja y posteriormente lavarlos con agua y jabón.
2. Después de realizar las lecturas correspondientes, esterilizar los tubos y cajas de vidrio en autoclave y lavarlos. En el caso de cajas de Petri de plástico proceder a sellarlas y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

Discusión de resultados

1. ¿Qué importancia tiene determinar qué factores físicos ambientales afectan el desarrollo de los microorganismos?
2. Dentro del espectro electromagnético que región (nm) ocupa la luz UV?
3. Compara el efecto observado con cada uno de los agentes químicos empleados y discute sobre los ingredientes activos de los mismos.
4. ¿Qué agente químico presentó un efecto biocida sobre la mayoría de los microorganismos evaluados?
5. ¿Qué otras pruebas realizarías para determinar la eficacia de los agentes químicos que evaluaste?

Literatura de consulta

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. *Brock. Biología de los microorganismos*. 10ª Ed. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis y P. R. Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., M. Wachsman, L. Alche. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. 1ª edición. Atlante S. R. L. Argentina

UNIDAD IX.
ASOCIACIONES MICROBIANAS

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el alumno será capaz de:

- Describir las relaciones que presentan los microorganismos entre si y con algunos organismos superiores.
- Distinguir las relaciones benéficas, perjudiciales e indiferentes, que establecen los microorganismos y la importancia que deriva de ellas.

Introducción

En el medio ambiente los microorganismos constituyen una población mixta representada por todos los grupos microbianos, estos se encuentran interactuando entre ellos mismos y con los organismos superiores, estableciendo relaciones con diferentes grados de complejidad y diversos efectos a las que se les conoce como interacciones, asociaciones o simbiosis, y a los organismos involucrados se les denomina simbiontes. Con relación al grado de complejidad se tiene que un microorganismo puede estar alojado en otro organismo (endoasociación); o bien estar dentro de otro organismo (ectoasociación); en ambos casos la relación es muy estrecha ya que existe contacto físico entre los organismos; en otras asociaciones, se observa que dos tipos de poblaciones microbianas se encuentran en un hábitat común y existen entre ellas interacciones constantes sin que se presente el contacto físico (paraasociación). Respecto al significado las asociaciones pueden ser benéficas, perjudiciales o indiferentes y, su efecto repercutir sobre uno o los dos tipos de organismos involucrados y en función del efecto se describen los siguientes tipos de simbiosis:

Mutualismo, asociación en donde los dos organismos involucrados son beneficiados.

Comensalismo, relación en donde un simbiote es beneficiado y el otro no resulta afectado.

Parasitismo, asociación en la que uno de los simbiontes resulta beneficiado (parásito) y el otro dañado (hospedero).

Antagonismo o amensalismo, relación de dos especies en donde una inhibe el desarrollo de la otra o bien le causa la muerte.

Sinergismo, relación en donde la actividad cooperativa de dos poblaciones es mayor a la suma de las dos actividades realizadas por separado.

Competencia, interacción de organismos en un hábitat común en donde el sustrato u otro factor son limitados, por lo que las dos poblaciones compiten por el sustrato o por el oxígeno para poder sobrevivir.

Neutralismo o indiferentismo, dos poblaciones conviven en un hábitat común sin tener efecto una sobre otra.

Depredación, interacción que involucra a un organismos (el depredador) que consume a otro (la presa) y generalmente el primero es más grande que el segundo.

En todas las asociaciones, el efecto benéfico, perjudicial o indiferente es influenciado por las condiciones ambientales y el estado fisiológico del macrosimbionte, lo que determina que una relación benéfica se transforme en dañina. Es decir un mutualismo bajo ciertas condiciones puede pasar a un comensalismo y en caso extremo a un parasitismo.

En esta práctica se desarrollarán ejercicios que permitan demostrar el efecto benéfico, perjudicial o indiferente que deriva de la interacción de una población microbiana con otros microorganismos o con organismos superiores.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias:

- Bacillus subtilis* (en agar nutritivo)
- Clostridium* sp. (en caldo tioglicolato)
- Micrococcus luteus* (en caldo)
- Escherichia coli* (en caldo)
- Staphylococcus aureus* (en caldo)
- Proteus vulgaris* (en caldo)
- Enterococcus faecalis* (en caldo)

Muestras

Plantas de trébol con raíces noduladas

Material por grupo

Baño de agua caliente
Incubadoras a 28 y 37°C

Material por mesa

Frascos goteros con azul de metileno de Loeffler y fucsina fenicada

Material por equipo:

Microscopio
Colorantes para la tinción de Gram
Bisturí
Pinzas de punta roma
Matraz Erlenmeyer (125 mL) con 50 mL de solución salina isotónica estéril
Cajas de Petri con agar extracto de levadura manitol (ELMA)
Cajas de Petri con gelosa nutritiva
Tubos de ensayo de 22x175 con 20 mL de gelosa nutritiva
Tubos de ensayo de 13x100

- 4 con caldo rojo de fenol + lactosa con campanas de Durham
- 6 con caldo rojo de fenol + sacarosa con campanas de Durham

Material que deben tener los alumnos:

Mecheros

Gradillas

Asas

Portaobjetos

Cajas de Petri de plástico desechables estériles

Pipetas graduadas de 1.0 mL estériles

Tubo de ensayo de 13x100 estéril

Agitador de vidrio estéril

Etanol (96°) y Cloralex (5%)

Plastilina

Marcador indeleble

Metodología

a) Mutualismo. Observación de formas bacteroides en nódulos de leguminosas y aislamiento.

1. Lavar las raíces con agua corriente hasta eliminar las partículas de suelo.
2. Con el bisturí separar cuidadosamente los nódulos de las raíces y colocarlos en el tubo de ensayo de 13x100.
3. Deshidratar los nódulos mediante la adición de un volumen pequeño de etanol, dejar actuar durante 5 a 10 segundos, decantar, lavar con solución salina isotónica estéril durante 10 segundos y repetir el procedimiento de lavado.
4. Desinfectar los nódulos mediante la adición de un volumen pequeño de cloralex (5%), dejar actuar de 1 a 3 minutos.
5. Eliminar el desinfectante mediante lavado con SSI estéril, repetir el lavado un mínimo de seis veces, en el último lavado dejar un volumen pequeño de SSI.
6. En condiciones asépticas y con el agitador de vidrio macerar los nódulos hasta obtener una suspensión.
7. A partir de la suspensión anterior preparar un frote, fijarlo y teñirlo con azul de metileno Loeffler o fucsina fenicada (10 a 20 segundos).
8. Observar al microscopio y localizar formas bacteroides.
9. Tomar una asada de la suspensión con bacteroides y sembrar por estría y agotamiento dos placas de Petri con ELMA e incubar a 28°C de 3 a 7 días.
10. Observar el desarrollo de las placas, seleccionar colonias aisladas rosas y mucosas.
11. A partir de una de las colonias típicas seleccionadas, preparar un frote, aplicar la tinción de Gram y observar al microscopio.
12. Comparar la morfología de las bacterias procedentes de la suspensión del macerado nodular, con la morfología de las bacterias desarrolladas en las placas, esquematizar y registrar los resultados.

b) Comensalismo.

1. Dividir las dos cajas que contienen gelosa nutritiva en dos secciones, trazando con un plumón indeleble una raya en la parte externa del fondo de las cajas.
2. Tomar una asada del cultivo de *Staphylococcus aureus* y sembrar por estría recta una sección de las dos cajas.
3. Tomar una asada del cultivo de *Clostridium* sp. y sembrar por estría recta la segunda sección de las dos cajas.
4. Invertir las cajas.
5. Sellar los bordes de una de ellas con plastilina.
6. Incubar a 37°C durante 24 horas.
7. Observar las cajas y registrar los resultados.
8. Continuar la incubación por 48 y 72 horas en las mismas condiciones y registrar los resultados.

c) Antagonismo.

1. Fundir la gelosa nutritiva y enfriar, manteniendo los tubos a temperatura de 45 a 50°C.
2. Con una pipeta estéril y en condiciones de asepsia inocular uno de los tubos con 1.0 mL del cultivo de *Micrococcus luteus*. Mezclar rápidamente, moviendo el tubo entre las palmas de las manos.
3. Verter el contenido en una de las cajas de Petri, anotar el nombre del microorganismo y dejar solidificar el medio.
4. Repetir el procedimiento, empleando el cultivo de *Escherichia coli*.
5. Tomar una asada del cultivo de *Bacillus subtilis* y sembrar tanto la caja inoculada con *Micrococcus luteus*, como con *Escherichia coli*, por medio de una estría recta.
6. Invertir las cajas e incubar a 37°C durante 48 horas.
7. Registrar el tiempo en el que apareció el desarrollo de cada uno de los microorganismos en estudio.
8. Explicar las causas que determinan que una de las bacterias no se desarrolle en una de las cajas.
9. Explicar las causas que determinan la diferencia de tiempo en que aparece el desarrollo de las bacterias probadas.
10. Comparar el desarrollo de *Bacillus subtilis* en las cajas que previamente se inocularon con *Micrococcus luteus* y *Escherichia coli*.
11. Indicar las causas que determinan la presencia de un halo de inhibición y entre que microorganismos se presentó este fenómeno.

d) Sinergismo.

1. Identificar los tubos que contienen lactosa con las claves L1, L2, L3 y L4 y los que contienen sacarosa con S1, S2, S3, S4, S5, S6.
2. Con pipetas estériles inocular los tubos adicionando los volúmenes indicados en el cuadro 28 (emplear una pipeta para cada bacteria).
3. Incubar a 36°C durante 24, 48 y 72 horas.
4. Observar y registrar los resultados a diferentes tiempos.
5. Determinar en cuáles de los tubos se presentan cambios y registrar los resultados.
6. Explicar las causas que originan el fenómeno.

Cuadro 28. Registro del sinergismo presente en bacterias.

Bacteria	Clave de los tubos									
	L1	L2	L3	L4	S1	S2	S3	S4	S5	S6
<i>Proteus vulgaris</i>	0.2	0.1		*						*
<i>Staphylococcus aureus</i>		0.1	0.2		0.2	01.				
<i>Escherichia coli</i>						0.1	0.2	0.1		
<i>Enterococcus faecalis</i>								0.1	0.2	

* Los tubos L4 y S6 se emplean como testigos.

Precauciones generales

- Asesórate con tu profesor(a) para reconocer los nódulos.
- Asegúrate que los nódulos queden bien lavados antes de macerarlos.
- Como en todas las prácticas: antes de iniciar, asegúrate de tener un diagrama de flujo correctamente escrito de acuerdo al protocolo para calcular los tiempos de ejecución; asimismo de tener todo el material debidamente etiquetado.

Disposición de desechos

1. Los residuos de suelo y plantas serán colectados en un recipiente y desechados en una jardinera.
2. Los residuos de las tinciones serán depositados en los recipientes destinados para tal fin.
3. Las pipetas se colocarán en solución desinfectante (pipetero) y posteriormente lavarlas con agua y jabón.
4. Después de realizar las lecturas correspondientes, esterilizar los tubos y cajas de vidrio en autoclave y lavarlos.
5. En el caso de cajas de Petri de plástico proceder a sellarlas y colocarlas en el contenedor rojo ubicado en el laboratorio 1A.

Guía para la discusión de resultados

1. Discute sobre las características microscópicas de las bacterias encontradas en los nódulos.
2. ¿Cómo reconociste las asociaciones microbianas que evaluaste en esta práctica?
3. ¿Qué asociación no fue posible reconocer? ¿Por qué?
4. ¿Qué metodología propondrías para poder observar competencia y depredación en el laboratorio?

Literatura de consulta

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Comité Nacional de la Fijación Biológica de Nitrógeno. 1984. Curso de Tecnología de *Rhizobium* y Producción de Inoculantes. Manual de Prácticas. Facultad de Química, UNAM., Colegio de Postgraduados, Chapingo, fertilizantes Mexicanos, S. A., Universidad Autónoma de Chapingo, CONACYT. México
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice Hall Iberia. España.
- Prescott Lansing M., Harley Jonh P. y Klemm Donald A. 2005. Microbiology. 6a. ed. McGraw Hill. 992 pp
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Müggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp

UNIDAD X.
**ESTUDIO DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA EN
UN MICROAMBIENTE**

Objetivos

Mediante el empleo de una columna de Winogradsky, el estudiante logrará:

- Aplicar e interpretar los conocimientos de las diferentes técnicas utilizadas para la caracterización de microorganismos.
- Diferenciar los grupos microbianos presentes en un microambiente.
- Comparar los microorganismos que crecen a lo largo de la columna en diferentes tiempos.
- Relacionar la diversidad microbiana presente en un microambiente con algunas de sus características fisiológicas.
- Explicar las causas que originan la sucesión de microorganismos observada.

Introducción

A diferencia de los estudios realizados por Luis Pasteur y Roberto Koch sobre cultivos puros, dos famosos microbiólogos: Sergei N. Winogradsky (1856-1953) y Martinus Willem Beijerinck (1851-1931), fueron los primeros en estudiar las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en un mismo hábitat.

El estudio de las comunidades microbianas en condiciones de laboratorio puede realizarse fácilmente en una columna de Winogradsky, la cual simula un microecosistema o microambiente que ilustra cómo los microorganismos ocupan microespacios altamente específicos de acuerdo con sus necesidades vitales, tales como: requerimientos de carbono, energía y oxígeno, así como la interdependencia, de forma tal que la actividad metabólica de un microorganismo posibilita el crecimiento de otros y viceversa. Estas columnas, que llevan el nombre del microbiólogo ruso que las utilizó por primera vez, son sistemas completamente autoreciclables.

Las columnas de Winogradsky se preparan con muestras de suelo colectadas en ambientes húmedos, las cuales son enriquecidas con compuestos orgánicos e inorgánicos y finalmente son expuestas a una fuente de luz natural. En ellas se observa que después de 3 ó 4 semanas de incubación aumenta la cantidad de los distintos tipos de microorganismos, mismos que de acuerdo con sus características fisiológicas se establecen en las diferentes zonas a lo largo de la columna, lo que se conoce como sucesión. De esta forma, el resultado es una columna estratificada (zonas de diferente color) tanto en el suelo como en el agua, donde cada estrato se relaciona con un proceso químico-biológico.

En la zona inferior de lodos se desarrollan organismos fermentadores que producen alcohol y ácidos grasos como subproductos de su metabolismo. Estos productos de "desecho" constituyen el sustrato para el desarrollo de bacterias reductoras de sulfato, las

cuales como resultado de su metabolismo liberan sulfuros que difunden a la zona superior oxigenada creando un gradiente en el que se desarrollan bacterias fotosintéticas que utilizan el azufre.

Por encima de esta zona pueden desarrollarse las bacterias púrpura que no utilizan el azufre y que obtienen su energía de reacciones luminosas, pero que emplean ácidos orgánicos como fuente de carbono para su síntesis celular.

Finalmente, en la zona aerobia crecen las Cianobacterias y algas las cuales como producto de su metabolismo liberan oxígeno. También pueden crecer bacterias que oxidan compuestos del azufre y del nitrógeno hasta sulfatos y nitratos respectivamente. Todos estos grupos sintetizan su materia orgánica a partir del CO_2 .

Actividades generales

1. Preparar una columna de Winogradsky.
2. Tomar muestras a distintos niveles de la columna para describir las variaciones en la composición microbiana a diferentes tiempos.
3. Relacionar la sucesión microbiana que se establece en la columna con los requerimientos de carbono, energía, oxígeno y metabolismo a lo largo del tiempo, durante 4 semanas.
4. Integrar los resultados obtenidos en los diferentes tiempos del muestreo.

PRÁCTICA 10.1

Instalación de la Columna de Winogradsky

Materiales

Muestras

Suelo o barro de un arroyo, lago, pantano o costa de mar o río (300 a 500 g de sedimento superficial).

Agua de estanque, río o asequía (1500 mL).

Material por grupo

4.0 g. de cada una de las siguientes sales minerales:

CaCO₃ (o cáscara pulverizada de un huevo)

CaSO₄

CaHPO₄

Material por mesa

1 balanza granataria

Material que deben tener los alumnos (por cada cuatro equipos)

300 a 500g de muestra de suelo o barro de un arroyo, lago, pantano o costa de mar o río (sedimento superficial o subsuperficial).

1 500 mL de agua de estanque, río o asequía.

1 recipiente alto de boca ancha, de paredes transparentes, rectas y sin bordes. Se sugiere que sean recipientes de plástico o de vidrio y que al menos sean tres veces más altos que ancho.

1 yema de huevo cocido

3 tornillos o clavos de hierro

Papel periódico finamente cortado

500 mL de medio mineral

3 m de cordón de nylon o hilo cáñamo

8 portaobjetos con muesca en uno de los extremos

1 varilla de vidrio de aprox. 20 cm

1 espátula

1 pliego de papel autoadherible transparente (20x20 cm)

Metodología

1. Colectar una cantidad de suelo, lodo o barro ricos en materia orgánica. Remover las piedras, ramas o partículas grandes del material en estudio.
2. Adicionar al suelo 1 g de cada una de las sales, el papel finamente cortado y el huevo desmenuzado. Mezclar hasta homogeneizar completamente.

3. Colocar la mezcla en un recipiente adecuado hasta ocupar 1/3 del volumen total. Compactar el suelo con la ayuda de una espátula a fin de eliminar las burbujas de aire (Figura 15).
4. Mezclar la muestra de agua con el medio mineral en proporción de 1:1.
5. Añadir la solución anterior a la muestra de suelo hasta llegar a una altura de aproximadamente de 3 a 5 cm abajo del borde. Tener cuidado de no resuspender la muestra compactada, para ello inclinar la botella y resbalar el agua lentamente por las paredes.
6. Agitar la solución con una varilla de vidrio para eliminar burbujas de aire.
7. Registrar el aspecto final de la columna (color del sedimento y del líquido).
8. Tomar 8 portaobjetos y hacerles unas muescas (Figura 14 2A). Sobre ellas amarrar un extremo del hilo cáñamo de tal forma que se pueda jalar el portaobjetos con el otro extremo (Figura 14 2B).
9. Colocar los 8 portaobjetos en una posición vertical a diferentes niveles, cuatro sobre el sustrato inclinados contra la pared del recipiente dejando que el extremo de hilo suelto quede suspendido fuera de la botella y cuatro en los primeros 10 cm de la superficie (Figura 14 2C).
10. Colocar dos clavos (uno galvanizado y uno no galvanizado) al fondo, sobre el sustrato amarrados de un hilo.
11. Marcar el nivel de agua y cubrir la boca de la botella con el plástico autoadherible. Hacer algunas perforaciones para reducir la evaporación. Puede ser necesario reponer agua para mantener el nivel original.
12. Incubar a temperatura ambiente (25 a 30°C) cerca de una ventana para que reciba la luz solar.

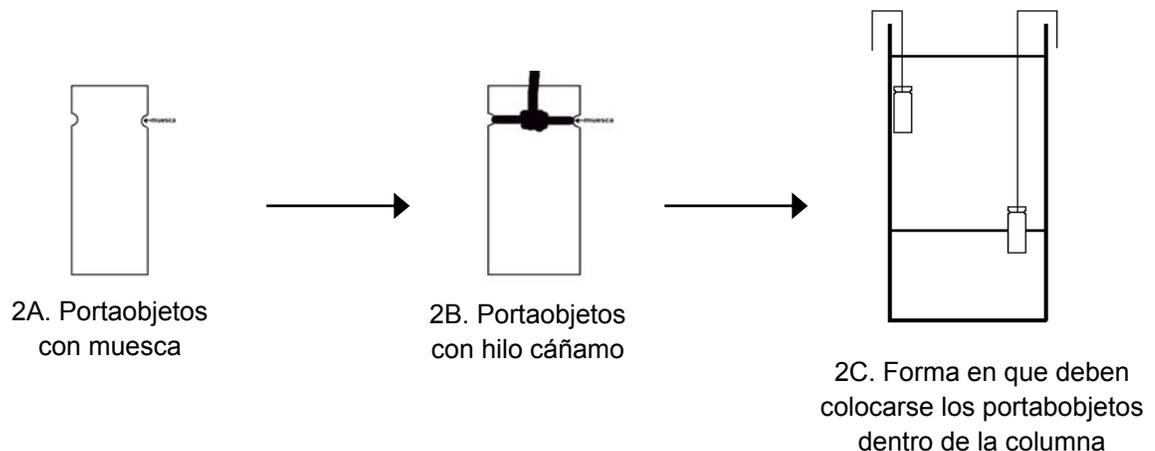


Figura 14. Secuencia de pasos para colocar los portaobjetos con muesca en la columna de Winogradsky

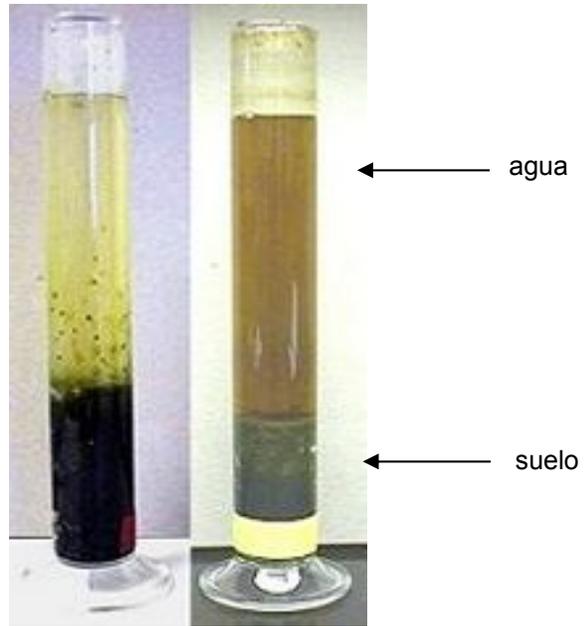


Figura 15. Columna de Winogradsky instalada.

PRÁCTICA 10.2

Observaciones Microscópicas de la Diversidad Microbiana en la Columna de Winogradsky

PRIMERA SEMANA DE INCUBACIÓN Y SUBSECUENTES

Materiales

Material por mesa

Fascos goteros con los siguientes reactivos colorantes:

Azul de metileno (1:10000)

Verde de Janus (1:3000)

Verde de metilo (1:10000)

Rojo neutro (1:10000).

Solución de Ringers y de Noland's

Alcohol-ácido acético (8:2)

Material por equipo

Pipetas graduadas de 5 ó 10 mL.

Pinzas largas de punta roma.

Microscopio.

Aceite de inmersión.

Colorantes para tinción de Gram.

Material para los alumnos por mesa

Mecheros

Portaobjetos con y sin muesca

Cubreobjetos

Asas

Propipetas

Piseta

Marcador indeleble

1 tubo de ensayo de 16x150 con 9 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril

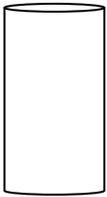
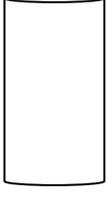
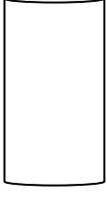
Metodología

1. Observar la columna y registrar, en el cuadro 29, los cambios físicos producidos con respecto al aspecto inicial.
2. Remover dos portaobjetos (uno de la superficie y otro del fondo). Dado que los microorganismos pueden colonizar ambos lados de los portaobjetos, es necesario limpiar una de sus caras; observar los microorganismos sin teñir con los objetivos de 10x y 40x. Posteriormente fijar con alcohol-ácido acético (8:2) durante 5 minutos a temperatura ambiente y teñir con azul de metileno o safranina. Observar

con el objetivo de inmersión, esquematizar o fotografiar los microorganismos observados y registrar en el cuadro 30. Puede ser necesario modificar las técnicas de fijación y coloración dependiendo del tiempo transcurrido. Recordar que las bacterias son los primeros organismos en colonizar los portaobjetos, seguidos por las algas, los protozoarios y algunos invertebrados.

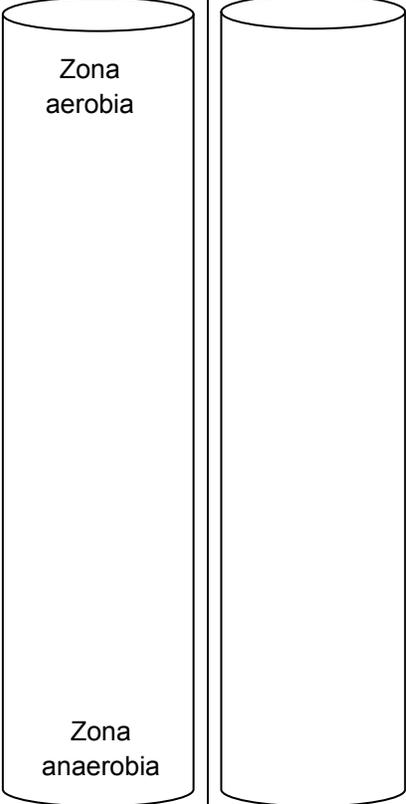
3. Reemplazar los portaobjetos muestreados por unos nuevos.
4. Tomar muestras de los diferentes niveles de la columna, con una pipeta de vidrio, iniciando en la superficie y terminando en la zona más profunda. Limpiar la superficie de la pipeta con un algodón impregnado con una solución desinfectante y colocar la muestra en un tubo de ensaye no estéril.
5. Hacer al menos 2 preparaciones de cada una de las muestras. Tener cuidado de enjuagar la pipeta con agua corriente entre las distintas tomas de muestra. Al finalizar depositarla en el pipetero.
6. Realizar de cada muestra una preparación húmeda y una fija y teñida.
 - a) Preparaciones húmedas: Colocar una gota de muestra en un portaobjetos y colocar un cubreobjetos. Observar el tipo y la abundancia de los diferentes microorganismos, así como su movilidad. Se recomienda este tipo de preparación sin teñir cuando las muestras proceden de la zona aeróbica o superior, donde se encuentran con mayor probabilidad algas, protozoarios y cianobacterias. En la segunda preparación colocar la muestra, agregar una gota de algún colorante vital y colocar el cubreobjetos.
 - b) Preparaciones fijas y teñidas: Tomar una gota de muestra y realizar un frotis, teñir con Gram o con tinción simple. Observar al microscopio.
7. Registrar y esquematizar en el cuadro 31 los distintos tipos de microorganismos observados.
8. A partir de la tercera sesión y subsiguientes, repetir el procedimiento indicado en los incisos 1 a 3.
9. Registrar y esquematizar los cambios físicos de la columna, así como los distintos tipos de microorganismos (emplear copias de los cuadros 30 y 31).
10. Comparar los esquemas e identificar los cambios físicos que tienen lugar en la columna a lo largo del tiempo y describir la sucesión de los microorganismos.
11. En la cuarta semana se efectuará el estudio de nutrición y diversidad fisiológica (PRÁCTICAS 6.1 y 10.3) (Cuadro 32)

Cuadro 29. Observaciones físicas de la columna de Winogradsky durante 5 semanas de incubación.

Semana	Zona de la columna	Observaciones*
1		
2		
3		
4		
5		

* Sedimentación, color uniforme o presencia de bandas, formación de burbujas, olor característico (por ejemplo olor a huevo podrido), etc.

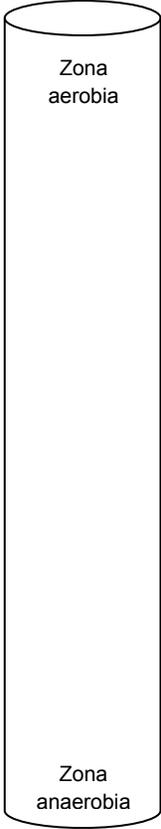
Cuadro 30. Observaciones microscópicas de las primeras tres semanas de incubación de la columna de Winogradsky.

Requerimientos de Oxígeno	Zona de la Columna	Tipo de organismos observados	Morfología	Tinción de Gram*	Esquemas**
					

*Sólo bacterias.

**Se pueden poner únicamente los números de las imágenes y por separado colocar los esquemas de los organismos observados.

Cuadro 31. Características microscópicas y fisiológicas de los microorganismos presentes en la columna de Winograsky después de la cuarta semana de incubación (Complementar con PRÁCTICAS 6.1 y 10.3).

Requerimientos de Oxígeno	Zona de la Columna	Tipos de organismo observados	Género representativo	Morfología y Tinción de Gram*	Esquemas**	Características fisiológicas***
 <p>Zona aerobia</p> <p>Zona anaerobia</p>						

*Sólo bacterias.

**Se pueden poner únicamente los números de las imágenes y por separado colocar los esquemas de los organismos observados.

***Por ejemplo presencia de organismos amilolíticos, fijadores de nitrógeno, solubilizadores o mineralizadores de fósforo, etc.

Precauciones generales

- Evitar usar el objetivo de 100x en preparaciones donde la muestra esté muy gruesa (tierra, grumos de tierra), ya que se podrían rayar las lentes.
- Las preparaciones húmedas deben ser trabajadas inmediatamente para evitar que se deshidraten, de ocurrir esto se puede humedecer con un poco más de la misma muestra de agua.
- Se recomienda que las observaciones físicas de la columna (apariencia) se realicen con luz natural, y a la misma hora del día.
- Toma fotografías de la apariencia física de tu columna semanalmente.

Caracterización Fisiológica de la Diversidad Microbiana en la Columna de Winogradsky

CUARTA SEMANA DE INCUBACIÓN

Objetivos

Al finalizar este ejercicio el estudiante será capaz de:

- Determinar las características fisiológicas de algunos microorganismos presentes en la columna de Winogradsky.
- Relacionar las características fisiológicas observadas con la zona de muestreo de la columna y su tipo de nutrición.

Introducción

Las bacterias y arqueas son microorganismos que presentan una diversidad metabólica asombrosa, la cual es mantenida por la dependencia que existe entre los microorganismos y su ambiente; es decir, las actividades de unos microorganismos favorecen el crecimiento de otros, pero también ocurre que los productos metabólicos de unos inhiben el desarrollo de otros.

En la primera situación, se encuentra el cometabolismo de los microorganismos pertenecientes a los ciclos biogeoquímicos, en los cuales la mineralización o solubilización de un elemento, así como la oxidación o reducción del mismo, dependen además de las condiciones ambientales.

La solubilización se define como la transformación de un compuesto de una forma insoluble generalmente inorgánica a otra soluble en agua y por lo tanto disponible para los organismos y la mineralización se refiere a la transformación de un compuesto en su forma orgánico a una inorgánica.

Como se mencionó anteriormente, estas transformaciones se llevan a cabo mediante reacciones de óxido reducción de elementos como el nitrógeno, azufre, etc., es por ello que algunas de ellas se realizan en condiciones aerobias o anaerobias.

Dependiendo de su maquinaria enzimática, los microorganismos pueden emplear un elemento en alguna de las formas en que se encuentran en la naturaleza. Por ejemplo, aproximadamente un 80% de las moléculas de la atmósfera de la tierra están hechas de dos átomos de nitrógeno que están unidos entre sí, (N_2), sin embargo en esta forma sólo es accesible a un conjunto muy restringido de formas de vida, como las cianobacterias y las azotobacteriáceas. Los organismos fotoautótrofos (plantas o algas) requieren por lo general nitrato (NO_3^-) como forma de ingresar su nitrógeno; los heterótrofos (p. ej. los

animales) necesitan el nitrógeno ya reducido, en forma de radicales amino, que es como principalmente se presenta en la materia viva.

En el caso del fósforo, la mayoría de este elemento se encuentra en las rocas y en el suelo. Además muchos de los fosfatos de la corteza terrestre son insolubles en el agua lo que hace que su disponibilidad no sea la más adecuada para los seres vivos. De esta forma, durante el ciclo del fósforo se produce la mineralización, la solubilización de las formas insolubles así como la asimilación de los fosfatos inorgánicos.

Las condiciones que favorecen la mineralización del fósforo son: un sustrato carbonado degradable y la presencia de nitrógeno. En lo que se refiere a la solubilización, el fósforo se encuentra en continuo movimiento desde su forma soluble a depósito de fósforo. Este proceso es realizado únicamente por bacterias autótrofas que son las mismas que intervienen en el paso de ion amonio a ácido nítrico. Finalmente, la asimilación se refiere a la transformación del fósforo inorgánico a fósforo orgánico a través de diferentes seres vivos (en el agua las algas llevan a cabo la absorción, en el suelo las bacterias se encargan de su fijación).

En lo que respecta al azufre, este elemento es abundante a lo largo de la corteza terrestre. Se encuentra disponible como sulfato soluble o en compuestos orgánicos. En la biosfera se produce la reducción del azufre a H_2S por obra de microorganismos. La reacción de oxidación de la forma reducida a sulfato es usada por bacterias anaeróbicas para el metabolismo.

El azufre forma parte de incontables compuestos orgánicos; algunos de ellos llegan a formar parte de proteínas. Las plantas y otros productores primarios lo obtienen principalmente en su forma de ion sulfato (SO_4^{-2}). Estos organismos lo incorporan a las moléculas de proteína, y de esta forma pasa a los organismos del nivel trófico superior. Al morir los organismos, el azufre derivado de sus proteínas entra en el ciclo del azufre y llega a transformarse para que las plantas puedan utilizarlos de nuevo como ion sulfato.

En el caso de los metabolitos que inhiben el crecimiento de otros, esta interacción recibe el nombre de antagonismo o antibiosis. Antibiosis se define como la producción por parte de un microorganismo de sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm.). Esta interacción ha sido ampliamente estudiada y su antecedente más importante data del descubrimiento fortuito de la penicilina. Actualmente la mayor parte de los antibióticos utilizados son producidos por bacterias u hongos del suelo.

Materiales

Cultivos puros de las siguientes bacterias

Bacillus sp.
Escherichia coli
Micrococcus luteus
Streptomyces sp.

Material por mesa (Cuadro 32)

2 tubos de ensayo de 16x150 vacíos estériles
2 pipetas de 10 mL estériles
4 pipetas Pasteur estériles

Material que deben tener los alumnos

Mecheros
Asas
Tubo de ensayo de 16x150 vacío estéril
Pipeta graduada de 10 mL estéril
Pipeta Pasteur estéril
Varilla de vidrio en "L" estéril
Marcador indeleble

Cuadro 32. Material y actividades a realizar para la caracterización fisiológica de bacterias presentes en la columna de Winogradsky.

Material por mesa	Actividad por equipo
<ul style="list-style-type: none">• 2 placas de EMB• 2 placas de Agar sal manitol• 3 tubos con BHI fundido	Microorganismos degradadores de: - lactosa - manitol Producción de sustancias antimicrobianas
<ul style="list-style-type: none">• 1 placa de Leche descremada• 1 placa de Agar-almidón• 1 placa de Ramos Callao con lecitina• 1 placa de Ramos Callao con fósforo precipitado	Presencia de microorganismos: - Proteolíticos - Amilolíticos - Mineralizadores de P - Solubilizadores de P
<ul style="list-style-type: none">• 1 placa con Agar-Lipman• 2 tubos con medio para amonificantes• 2 tubos con medio para desnitrificantes	Presencia de microorganismos: - Fijadores de N - Amonificantes - Desnitrificantes
<ul style="list-style-type: none">• 2 tubos con medio para oxidantes de S^o• 2 tubos con medio para reductores de SO₄⁼	Presencia de microorganismos: - Oxidantes de S ^o - Reductores de SO ₄ ⁼

Metodología

1. Tomar una alícuota del líquido superficial de la columna, con una pipeta estéril y transferirla a un tubo vacío estéril (Muestra 1)
2. Tomar una alícuota del sedimento de la columna, con otra pipeta estéril y transferirla al 2º tubo vacío estéril (Muestra 2).
3. Efectuar la observación de preparaciones en fresco procedentes de las muestras 1 y 2.
4. Registrar las observaciones en el cuadro 33.

a) Presencia de microorganismos degradadores de lactosa y manitol.

1. Con una pipeta Pasteur tomar una gota de la Muestra 1 y colocarla en el centro de cada una de las placas de EMB y MSA.
2. Extender con varilla de vidrio en "L" estéril.
3. Repetir el procedimiento con la Muestra 2. Flamear la varilla antes de ser usada nuevamente.
4. Dejar que se absorba el inóculo en las placas y después invertirlas.
5. Incubar a 28°C y revisar a las 24 y 48 horas.

b) Producción de sustancias antimicrobianas.

1. Colocar 0.1 mL de la Muestra 1 en una caja de Petri y 0.1 mL de la Muestra 2 en la segunda caja.
2. Verter el agar BHI fundido en cada caja y dejar solidificar.
3. Trazar 1 estría recta en la superficie del medio con cada uno de los siguientes microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* sp., *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* (Figura 16).
4. Repetir el procedimiento con la otra placa.
5. Dejar que se absorban los cultivos en las placas y después invertirlas.
6. Incubar a 28° C y revisar a las 24 y 48 horas.

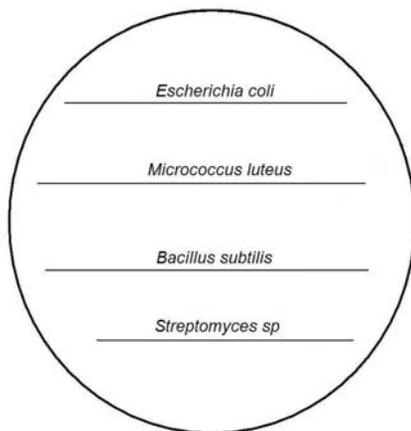


Figura 16. Producción de sustancias antimicrobianas con la distribución de las estrías de siembra.

c) Presencia de microorganismos proteolíticos, amilolíticos, mineralizadores y solubilizadores de P.

1. Tomar una gota de la Muestra 1, con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro de cada una de las placas de agar leche descremada, agar almidón, Ramos Callao con lecitina y con fósforo precipitado.
2. Extender con varilla de vidrio en "L" estéril.
3. Repetir el procedimiento con la Muestra 2. Flamear la varilla antes de ser usada nuevamente.
4. Dejar que se absorba el inóculo en las placas y después invertirlas.
5. Incubar a 28°C y revisar a las 24 y 48 horas (proteolíticos y amilolíticos) y a los 3 y 5 días (mineralizadores y solubilizadores de P).

d) Presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno, amonificantes, desnitrificantes, reductores y oxidadores del azufre.

1. Tomar una gota de la Muestra 1, con una pipeta Pasteur y colocarla en el centro de la placa de agar Lipman.
2. Extender con varilla de vidrio en "L" estéril.
3. Dejar que se absorba el inóculo y después invertirla.
4. Colocar una gota de la Muestra 1 en cada uno de los tubos que contienen el medio para amonificantes, desnitrificantes, oxidantes del azufre y reductores de sulfatos.
5. En los tubos con medio para oxidantes, agregar en condiciones asépticas 50 mg de flor de azufre.
6. En los tubos con medio para reductores, agregar asépticamente limadura de hierro.
7. Repetir el procedimiento con la Muestra 2.
8. Incubar a 28°C y revisar a los 3 y 7 días (fijadores de N y desnitrificantes) y de 3 a 4 semanas (oxidantes del azufre y reductores de sulfatos).

QUINTA SEMANA DE INCUBACIÓN

Integración de resultados de diversidad morfológica, interacciones microbianas y actividad metabólica de algunos microorganismos presentes en la columna de Winogradsky

Materiales

Material por grupo

Frasco gotero con BaCl₂ al 5.0%

Material por equipo

Microscopio

Aceite de inmersión

Colorantes para tinción de Gram.

Material que deben tener los alumnos

Mecheros
Asas
Portaobjetos
Cubreobjetos
Piseta
Marcador indeleble

Metodología

a) Degradación de lactosa y manitol.

1. Observar el desarrollo en las placas con EMB y MSA. Comparar la abundancia y diversidad de colonias.
2. Realizar una preparación fija y teñida con Gram de al menos tres tipos de colonias de cada medio.
3. Registrar los resultados en el cuadro 33.

b) Determinación de actividad proteolítica, amilolítica, mineralizadora y solubilizadora de P.

1. Observar el halo de solubilización del sustrato en las placas con agar leche descremada, Ramos Callao con fósforo precipitado y con lecitina. Comparar la abundancia y diversidad de colonias.
2. Realizar una preparación fija y teñida con Gram de al menos tres tipos de colonias de cada medio.
3. Agregar lugol a las placas con agar almidón. Observar la coloración que se presenta a lo largo de las estrías.
4. Registrar los resultados en el cuadro 33.

c) Presencia de microorganismos fijadores de nitrógeno, amonificantes, desnitrificantes, reductores y oxidadores del azufre.

1. Extraer y observar los clavos o tornillos de fierro introducidos inicialmente en la columna.
2. Observar el desarrollo microbiano en las placas de agar Lipman:
 - i. Comparar la abundancia y diversidad de colonias.
 - ii. Realizar una preparación fija y teñida con Gram de tres tipos de colonias.
3. Realizar una preparación fija y teñida con Gram de cada uno de los tubos con medio para amonificantes, desnitrificantes, oxidantes y reductores del azufre.
4. Agregar 2 gotas del reactivo de Nessler a los tubos con medio para amonificantes
5. En los tubos con el medio para desnitrificantes:
 - i. Observar si hay formación de gas en campanas de Durham.
 - ii. Agregar 2 gotas de la solución A y 2 gotas de la solución B del reactivo de Griess

- iii. Observar la presencia o ausencia de coloración rosada indicadora de la presencia de nitritos en el medio de cultivo.
6. Con un papel indicador determinar el pH en los tubos que contienen el medio para oxidantes de azufre o bien agregar unas gotas de BaCl_2 (5.0%) y observar la formación de un precipitado blanco.
7. Observar la formación de un precipitado negro en los tubos que contienen el medio para reductores de sulfatos.
8. Registrar los resultados en el cuadro 33.

d) Producción de sustancias antimicrobianas.

1. Observar la formación de halos de inhibición alrededor los microorganismos de prueba.
2. Registrar los resultados en el cuadro 34.

Disposición de desechos

1. Verter los desechos de colorantes en los contenedores dispuestos en los laboratorios.
2. Sumergir los portaobjetos usados en una solución sanitizante durante 10 minutos, lavar con detergente, enjuagarlos y colocarlos en un frasco con alcohol al 95%.
3. Esterilizar el material de vidrio (cajas y tubos) en los que realizó sus lecturas y posteriormente lavar.
4. Sellar con maskin tape las cajas de Petri de plástico que contengan cultivos y colocar en el contenedor ubicado en el laboratorio A.
5. Desechar la columna de Winogradsky. Reunir en una cubeta el lodo y agua y posteriormente colocar en una jardinera.

Cuadro 33. Diversidad metabólica observada en microorganismos presentes en la columna de Winogradsky.

Tipo de microorganismos	Zona aerobia	Zona microaerofílica	Zona anaerobia
Bacterias G+	*		
Bacterias G –			
Anaerobios			
Proteolíticos			
Amilolíticos			
Mineralizadores de P			
Solubilizadores de P			
Fijadores de N de vida libre			
Amonificantes			
Desnitrificantes			
Oxidantes del S			
Reductores de SO_4^-			

*Indicar: +++ = desarrollo abundante, ++ = desarrollo medio, + = desarrollo escaso, - = sin desarrollo.

Cuadro 34. Antagonismo observado en microorganismos presentes en la columna de Winogradsky.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Zona aerobia				
Zona microaerofílica				
Zona anaerobia				

Indicar presencia (+) o ausencia (-).

Guía para la discusión e integración de resultados

Comparar los resultados de los microorganismos observados a diferentes tiempos y niveles de la columna. Discutir con respecto a:

- ¿Se observa el mismo tipo de microorganismo? ¿En qué zonas y a qué tiempo de incubación se observa la mayor cantidad y diversidad de protozoos, algas, bacterias grampositivas y gramnegativas?
- ¿Qué tipos de nutrición se identificaron?
- ¿Qué requerimientos de oxígeno presentaron los microorganismos desarrollados?
- ¿Se observó la producción de sustancias antimicrobianas (antagonismo) entre los microorganismos de prueba y los provenientes de la columna?

- ¿Qué características fisiológicas se observaron en las diferentes zonas de la columna?

Con la información anterior, relacionar las características fisiológicas detectadas con los tipos de nutrición y los requerimientos de oxígeno determinados con la zona de la columna de la cual procede la muestra, el color desarrollado y el tiempo de incubación.

GUÍA PARA LA INTERPRETACIÓN DE LA DIVERSIDAD Y SUCESIÓN MICROBIANA EN UNA COLUMNA DE WINOGRADSKY

Después de cuatro a seis semanas de la preparación de la columna, se establecen tres tipos de ambientes: el anaerobio, el microaerofílico y el aerobio, en donde se desarrollan comunidades bacterianas específicas (Figura 17), organizadas en tres diferentes zonas a lo largo de la columna:

Zona anaeróbica

Se localiza en el fondo de la columna en donde crecen dos tipos de organismos: los que fermentan la materia orgánica y los que realizan la respiración anaerobia, ambos descomponen la materia orgánica y dan lugar a la formación de ácidos orgánicos, alcoholes y H_2 .

La fermentación es un proceso en el que los compuestos orgánicos son degradados de forma incompleta (p. ej. las levaduras fermentan los azúcares a alcohol). La respiración anaeróbica es un proceso en el que los sustratos orgánicos son completamente degradados a CO_2 , usando una sustancia distinta del oxígeno como aceptor terminal de electrones (p. ej. nitratos o iones sulfato).

El nivel más bajo de esta zona se caracteriza por formar un ambiente con alta concentración de H_2S , aparecen varios grupos diferentes de bacterias: por ejemplo, dependiendo del tipo de barro utilizado, encontramos bacterias del género *Amoebacter*, bacterias púrpura del azufre portadoras de vesículas de gas, las cuales aparecen formando una banda de color rosado.

En esta misma zona, en condiciones estrictamente anaerobias al cabo de unas semanas, y utilizando la carga de celulosa aportada por los restos de papel incorporados en el sedimento como fuente primaria para su metabolismo, aparecen las bacterias del género *Clostridium*. Todas las especies de este género son anaerobias estrictas porque, aunque sus esporas pueden sobrevivir en condiciones aerobias, las células vegetativas mueren si están expuestas al oxígeno. Por eso no empiezan a crecer hasta que éste desaparece del sedimento. Estas bacterias degradan la celulosa a glucosa y, a continuación, fermenta la glucosa para obtener la energía que necesitan, produciendo una serie de compuestos

orgánicos simples (etanol, ácido acético, ácido succínico, etc.) como productos finales de esa fermentación.

Un poco por encima, las bacterias reductoras del azufre (representadas por *Desulfovibrio*) se visualizan como una profunda capa negra. Éstas pueden utilizar los subproductos de la fermentación para su respiración anaerobia, usando sulfato, u otras formas parcialmente oxidadas de azufre como el tiosulfato, generando grandes cantidades de H₂S en el proceso. Este H₂S reaccionará con cualquier hierro presente en el sedimento, produciendo sulfuro ferroso, que da color negro. Es por esto que los sedimentos acuáticos son frecuentemente negros.

Zona microaerofílica

No todo el H₂S es utilizado, ciertas cantidades se difunden hacia arriba a lo largo de la columna de agua y son utilizados por otros organismos que crecen en las zonas superiores.

Este crecimiento se visualiza bajo la forma de dos bandas estrechas, brillantemente coloreadas, inmediatamente por encima del sedimento: en una primera franja, las bacterias verdes del azufre (como *Chlorobium*) procesan los sulfatos a azufre y aparecen en una franja verdosa. En otras zonas cercanas, bacterias como *Gallionella* procesan el hierro formando una capa negra que se forma justamente por debajo de la anterior. Un poco más arriba, algo más alejadas por tanto de las altas concentraciones de sulfhídrico se desarrolla una zona de bacterias púrpuras del azufre, como *Chromatium*, caracterizada por su color rojo-púrpura. Estas bacterias del azufre, verdes y púrpuras, obtienen energía de las reacciones luminosas y producen sus materiales celulares a partir de CO₂. En gran medida, de manera muy similar como lo hacen las plantas aunque, sin embargo, hay una diferencia esencial: no producen oxígeno durante la fotosíntesis porque no utilizan H₂O como elemento reductor sino H₂S.

Un poco por encima de esta zona nos encontramos una banda de bacterias púrpuras no del azufre, microorganismos anaerobios fotoorganótrofos que sólo pueden realizar la fotosíntesis en presencia de una fuente de carbono orgánico, por ejemplo *Rhodospirillum* y *Rhodopseudomonas*, que adquiere un color rojo-anaranjado. Su mayor o menor abundancia dependerá de la cantidad de sulfhídrico que se haya producido y de la cantidad que, no haya sido utilizada por otros organismos, difunda hacia arriba, ya que su presencia inhibe a estas bacterias.

Zona aerobia

La parte superior de la columna de agua puede contener abundantes poblaciones de bacterias de diferentes tipos. Son organismos aerobios que se encuentran generalmente en los hábitats acuáticos ricos en materia orgánica (estanques poco profundos, arroyos contaminados, etc.). Suelen ser flagelados o ciliados (protozoarios), lo que les permite

moverse y establecerse en nuevas áreas. Puede desarrollarse también microorganismos fototróficos diferentes procedentes directamente del agua o del barro utilizado originalmente en el montaje de la columna. La superficie del barro puede presentar en esta zona un ligero color castaño. Esta es la parte de la columna más rica en oxígeno y más pobre en azufre.

Sin embargo, también aquí llegarán por difusión, procedentes del barro de zonas inferiores, ciertas cantidades de H₂S que será oxidado a sulfato por bacterias que oxidan azufre (como *Beggiatoa* y *Thiobacillus*). Estas bacterias obtienen energía oxidando el H₂S a azufre elemental y sintetizan su propia materia orgánica a partir de CO₂. Por esto se les llama quimioautótrofas.

En las zonas superiores pueden crecer también cianobacterias fotosintéticas, lo que se visualizaría cómo un tapete de césped de color verde. Estas bacterias se caracterizan por ser las únicas que realizan una fotosíntesis similar a la de las plantas. De hecho, hay poderosas evidencias de que los cloroplastos de las plantas proceden de cianobacterias ancestrales que se establecieron como simbioses dentro de células de algún eucariota primitivo. De forma paralela hay también evidencias igualmente fuertes de que las mitocondrias de los eucariotas actuales se derivaron de bacterias púrpuras ancestrales por un similar sistema de endosimbiosis.

Literatura de consulta

- Atlas, R. M. Y R. Bartha. 2000. Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. 4a edición. Benjamin/Cummings Science Publishing
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker. 2003. Brock. Biología de los microorganismos. 10ª Edición en español. Prentice Hall Iberia. España.
- Ramírez-Gama, R. M., B. Luna Millán, O. Velásquez Madrazo, L. Vierna García, A. Mejía Chávez, G. Tsuzuki Reyes, L. Hernández Gómez, I. Muggenburg, A. Camacho Cruz y M del C. Urzúa Hernández. 2006. Manual de Prácticas de Microbiología General. 5ª edición. Facultad de Química, UNAM. México.
- Seeley, H. W. Jr., VanDemark, P. J., Lee, J. J. 1991. Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology. W. H. Freeman and Company New York. Fourth Edition.
- Sinauer Associates and Sumanas, Inc. 2002. The Winogradsky Column: An Animated Tutorial. <http://serc.carleton.edu/resources/2577.html>
- Stanier, R. Y., J. L. Ingraham, M. L. Wheelis y P. R. Painter, 1996. Microbiología. 2ª edición. REVERTÉ, S. A. España
- Tortora Gerard J., Fonke Beidell R. y Case Christine L. 1995. Microbiology an Introduction. 5a. ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 801 pp
- Vullo, D., Wachsman, M., Alche, L. 2000. Microbiología en Práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de Microbiología básica y aplicada. Primera edición Editorial Atlante S.R.L., Buenos Aires.

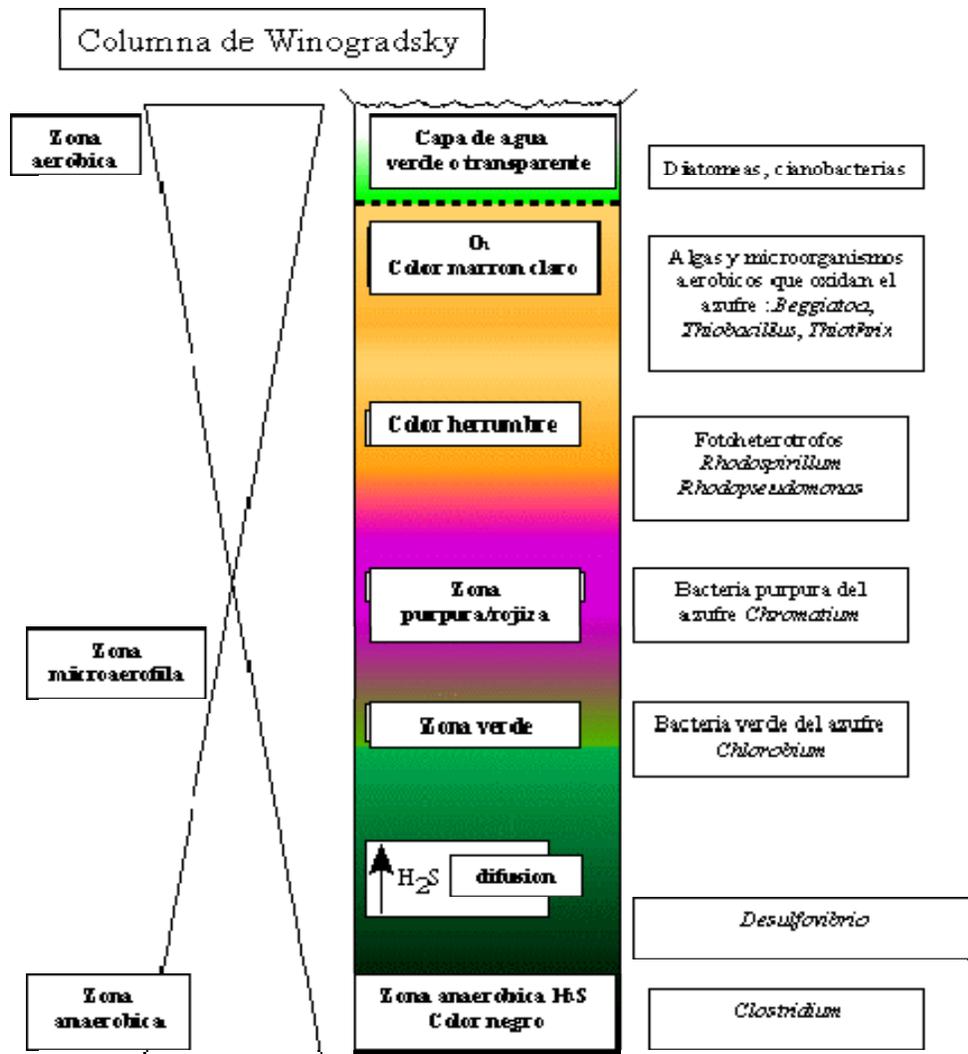


Figura 17. Guía para la observación e interpretación de la columna de Winogradsky.