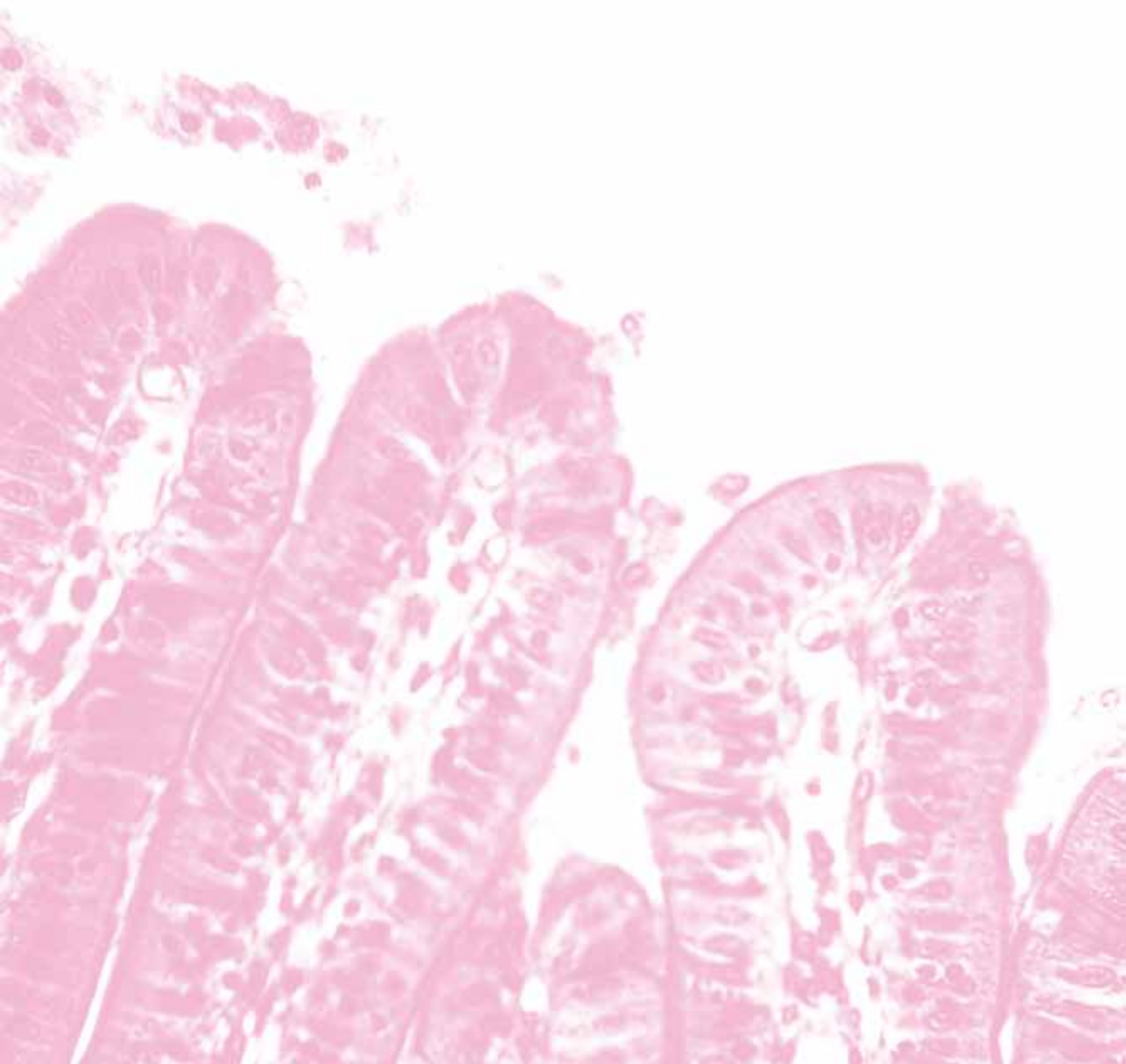


UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
SECCIONAL CALI

Manual ^{de} protocolos ^{de} microbiología general

RAÚL ALBERTO CUERVO MULET

Manual de protocolos de microbiología general





UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
SECCIONAL CALI

Manual de protocolos de microbiología general

Raúl Alberto Cuervo Mulet

2010

Universidad de San Buenaventura, seccional Cali
Editorial Bonaventuriana

Título: Manual de protocolos de microbiología general

Autor: Raúl Alberto Cuervo Mulet (racuervo@usbcali.edu.co)

ISBN: 978-958-8436-46-3

Rector
Fray Álvaro Cepeda van Houten, OFM

Secretario
Fray Hernando Arias Rodríguez, OFM

Vicerrector Académico
Juan Carlos Flórez Buriticá

Vicerrector Administrativo y Financiero
Félix Remigio Rodríguez Ballesteros

Directora Investigaciones
Angela Rocío Orozco Zárate
e-mail: arorozco@usbcali.edu.co

Director Proyección Social
Ricardo Antonio Bastidas

Coordinador Editorial Bonaventuriana
Claudio Valencia Estrada
e-mail: clave@usbcali.edu.co

Diseño y diagramación: Edward Carvajal A.

© Universidad de San Buenaventura, seccional Cali

Universidad de San Buenaventura, seccional Cali
La Umbría, carretera a Pance
A.A. 25162

PBX: (572)318 22 00 – (572)488 22 22

Fax: (572)488 22 31/92

www.usbcali.edu.co • e-mail: EditorialBonaventuriana@usbcali.edu.co
Cali - Colombia, Sur América

Este libro no puede ser reproducido total o parcialmente por ningún medio
sin autorización escrita de la Universidad de San Buenaventura, seccional Cali.

Cali, Colombia
Diciembre de 2010

Tabla de contenido

Introducción.....	7
Trabajo en el laboratorio	9
Protocolo 1	
Uso del microscopio y observación de varios tipos celulares	19
Protocolo 2	
Demostración de la presencia de microorganismos en múltiples lugares.....	23
Protocolo 3	
Preparación de extendidos y coloraciones diferenciales	25
Protocolo 4	
Preparación de medios de cultivos.....	31
Protocolo 5	
Características de los cultivos bacterianos y aislamiento de microorganismos	37
Protocolo 6	
Caracterización bioquímica de enterobacterias	41
Protocolo 7	
Análisis microbiológico de alimentos	45
Protocolo 8	
Caracterización bioquímica de <i>Bacillus cereus</i>	51

Protocolo 9

Análisis bacteriológico del agua por el método de los tubos múltiples	53
Bibliografía	57
Anexos	58

Introducción

La curiosidad es un elemento requerido para la comprensión de los procesos celulares que enmarcan la vida misma. Adicionalmente, la capacidad de obtener información precisa con el máximo de exactitud; registrar, ordenar y presentar los datos en forma comprensible a los observadores independientes que tengan acceso a ellos es una habilidad que sólo se logra a través de la práctica personal del ejercicio investigativo.

Con la pretensión de estimular el interés crítico de los conocimientos prácticos que complementen la teoría en el ámbito de la microbiología, esperamos que estudiantes y docentes, conocedores o interesados en el tema:

1. Ejerciten el manejo de técnicas generales y sencillas, aplicables a múltiples problemas particulares.
2. Desarrollen habilidades para diseñar experimentos, sistematizar el trabajo de laboratorio y manipular equipos de laboratorio.
3. Realicen mediciones u observaciones rigurosas, así como saber expresar resultados relevantes a partir de las mismas.
4. Procuren desarrollar iniciativa personal y de razonamiento lógico frente a problemas planteados, de tal modo que puedan realizar innovaciones o variaciones a los métodos de trabajo.
5. Interioricen una actitud de honestidad, confiabilidad y discreción frente a los resultados presentados.

La microbiología como rama de la biología y tomada como ciencia básica, incluye el estudio de los organismos biológicos, específicamente microorganismos, cómo reaccionan, sus interacciones con el medio y con otros organismos, y las técnicas comúnmente aplicadas para su investigación. Como ciencia aplicada incluye

la microbiología industrial, ambiental y el control biológico. De cada uno de estos aspectos se exponen protocolos de laboratorios que permitan entender de manera sencilla y ágil los fundamentos teóricos de esta ciencia.

Por ello, en este libro se pretende que estudiantes de ingeniería agroindustrial, biología y todos aquellos que de una u otra forma trabajen en el área microbiológica, puedan adquirir los conocimientos básicos en las diferentes técnicas de análisis aplicadas en campo.

Los protocolos expuestos hacen referencia de forma concisa y clara sobre metodologías utilizadas en la industria y los recintos académicos cuyo quehacer diario es la microbiología, ya sea aplicada o básica. La mayoría de estas técnicas se basan en recopilaciones de análisis reconocidos, tanto nacional como internacionalmente, además de guías de laboratorios elaboradas por algunos autores de diferentes universidades.

Raúl Alberto Cuervo Mulet
Biólogo. M.Sc.

Trabajo en el laboratorio

Cuando se ingresa a un laboratorio, lugar dedicado a la realización de pruebas y experimentos, es importante que el estudiante transforme su actitud y tenga una disposición adecuada para dicho espacio. Es ideal que traiga consigo la curiosidad y la duda, que no le falten ojos, oídos, olfato, gusto y piel, y que su mente permanezca atenta a procesar los estímulos que sus sentidos perciben. A diferencia de quienes han empleado la observación de la naturaleza para capturar leyes nuevas, los y las estudiantes estarán expuestos a la comprobación de dichas leyes a través de los experimentos realizados. Por esta razón, es necesario que conozcan a fondo los fundamentos que soportan las leyes que van a observar, que estén dispuestos o dispuestas a no “tragarse entero”, tal vez esto último redunde en posibles adecuaciones a las prácticas que se realicen, como producto de los aportes que los estudiantes hacen a las mismas.

No se puede crear algo nuevo sino se sabotea lo existente

Las pruebas y los experimentos siempre tienen un propósito u objetivo, en este caso se tratará de enseñar algún procedimiento que sirva como herramienta en el estudio y conocimiento del funcionamiento del cuerpo humano a nivel celular y molecular. Como se sabe, hay muchos niveles de estudio del ser humano, y los niveles celular y molecular apenas corresponden a algunos de ellos. Sería una pérdida de tiempo ingresar al laboratorio desconociendo los propósitos u objetivos de la práctica. Llegar al laboratorio sin saber qué se va a realizar y por qué no solo es angustiante, aburrido e inútil, sino que el estudiante se priva de la oportunidad de programar su cerebro para el reconocimiento rápido de observaciones importantes, para el análisis lógico de dichas observaciones y para la actuación coherente y eficaz con respecto a un correcto procesamiento mental de la información.

No hay vientos favorables para aquel que no sabe adónde va. Séneca

Por último, es muy recomendable ubicarse en el espacio de trabajo y el laboratorio no es la excepción. Cuando se trabaja en él existe el peligro “potencial” de un accidente, en virtud de las sustancias y los elementos empleados, y la posibilidad de cometer algún error al realizar un experimento. Así, pues, del reconocimiento oportuno de las condiciones que rodean al estudiante depende en gran medida el provecho de ellas y la disminución de los riesgos de laboratorio. A continuación se incluyen las normas a seguir para garantizar una estadía segura en el laboratorio pero se debe tener en cuenta que lo más importante es estar alerta, mantener la mente despierta y atenta...definitivamente no se debe olvidar usarlas en este espacio.

Con respecto a la forma de vestir en el laboratorio...

- Utilizar siempre bata de laboratorio, esto evitará que en un momento dado ciertas sustancias químicas entren en contacto directo con la piel y con las prendas de vestir.
- Si se tienes cabello largo es conveniente llevarlo recogido, disminuirá la superficie de contacto de tu cuerpo expuesta a sustancias o elementos peligrosos.
- El uso de guantes, tapabocas y lentes de protección es opcional en la mayoría de los casos, pero es obligación emplearlos si se va a manipular muestras biológicas potencialmente peligrosas para la salud.
- Evitar usar alhajas que interfieran con un desempeño cómodo del trabajo en el laboratorio.
- En lo posible utiliza zapatos cerrados y sin tacón, nuevamente se trata de que se trabajes con la mayor comodidad y seguridad posibles.

Con respecto al comportamiento en el laboratorio...

- Asistir puntualmente al laboratorio puesto que normalmente las instrucciones y el material que se empleará, se brindan al inicio de la práctica. Si no se conocen las instrucciones, no se podrá ingresar al sitio por seguridad.

- Para realizar una práctica se debe conocer previamente las sustancias y los elementos a manipular, los riesgos que representan y las medidas a tomar en caso de accidentes. Esto ahorrará tiempo y trabajo.
- Por razones casi obvias no se debe comer, beber, fumar o maquillarse dentro del laboratorio.
- No es necesario ingresar al laboratorio con la condición de haber realizado votos de obediencia y seriedad con anticipación, es suficiente con mantener un nivel responsable, de trato amable y respetuoso a los compañeros y profesores.
- En caso de un accidente, se debe mantener la calma y avisar inmediatamente al profesor.
- Evitar salir del laboratorio portando prendas que hayan estado en contacto con sustancias nocivas. Lo mejor es guardar las prendas antes de entrar y colocárselas sólo después de haber terminado su práctica y salido del recinto.
- No olvide ser compañero y amigo en el laboratorio, ser consciente de los riesgos y contratiempos que pueden ocasionar sus acciones para otros. Trabaje en grupo, sea activo y cultive su iniciativa, no espere a que sus compañeros hagan el trabajo por usted, ni cargue con el trabajo de ellos, cultivar en este sentido el sano hábito de la comunicación y exprese sus ideas sin imposición, escuchando al mismo tiempo las de los demás.
- Al iniciar, durante y al finalizar las prácticas se debe asear el espacio empleado. Las mesas de trabajo deben estar libres de líquidos u otras sustancias esparcidas que de alguna manera deterioren o perjudiquen la comodidad para trabajar. Los vertederos no deben usarse para arrojar papeles o sólidos que puedan llegar a obstruirlos, para ello se han adecuado sitios para desechar estas sustancias.

Con respecto al uso de elementos y sustancias dentro del laboratorio...

- Averigüe con anticipación las normas de manipulación y desecho, los riesgos que implican y las medidas a tomar en caso de accidentes con sustancias empleadas dentro del laboratorio. Para ello, use internet o libros de texto especializados en estos tópicos.

- Cuando reciba diversas sustancias asegurarse de que cada recipiente o frasco que las contiene tenga su correspondiente rótulo, no querrá mezclar sustancias equivocadas y exponerse a una situación singularmente sorpresiva.
- Nunca utilice su boca para succionar sustancias líquidas con las pipetas, para eso estará a su disposición peras de succión.
- Si se vierte sobre usted cualquier sustancia, conserve la calma, lávese con abundante agua (no si es sodio, por ejemplo) y avise a su profesor.
- Si se va a emplear material de vidrio, averigue con los profesores y/o asistentes del laboratorio si éste es o no resistente al calor. No todos los recipientes de vidrio pueden ser usados para calentar sustancias. Adicionalmente, no olvidar emplear pinzas para manipularlos o guantes resistentes al calor con la misma finalidad. El vidrio caliente no se diferencia a simple vista del vidrio frío. Para evitar quemaduras, déjalo enfriar antes de tocarlo.
- Si se tiene que calentar a la llama el contenido de un tubo de ensayo, observar cuidadosamente estas dos normas:
 - Tener mucho cuidado con que la boca del tubo de ensayo no apunte a ningún compañero o compañera. El líquido puede hervir y salir disparado, por lo que se podría ocasionar un accidente.
 - Calentar por el lateral del tubo de ensayo, nunca por el fondo; agitar suavemente.
- Al requerir el uso de elementos o instrumentos nuevos, se debe exigir de los profesores una instrucción previa del uso y riesgo que representa.
- Reconocer el lugar donde se encuentran las duchas y las salidas de emergencia del laboratorio, es información vital en caso de accidentes.

Con respecto a la obtención de información a partir de las prácticas...

- No olvidar que se están realizando protocolos que no siempre entregarán los resultados esperados, razón por la cual se debe estar alerta a cualquier cambio en la preparación de las sustancias, en los reactivos a usar, en el empleo de los materiales que puedan en cualquier momento modificar el curso del experimento y justificar las observaciones realizadas. No olvidar consignar los resultados en una libreta de apuntes o en la guía. Recordar que no se trata

de una simple repetición de recetas de cocina, por tal motivo el ejercicio se debe realizar conscientemente, con análisis y justificaciones lógicas.

- No caer en la tentación de manipular los resultados con el ánimo de presentar un informe impecable. La información verdaderamente valiosa es aquella que resulta de observaciones fidedignas, así no correspondan a las esperadas, y es eso precisamente lo que garantizará una excelente valoración. Este tema se ampliará en la siguiente sección.

¡Recuerde! la información aquí presentada más que normas impuestas en contra de su voluntad son consejos para facilitar su estadía en el laboratorio.

Preparación de experimentos y registro de resultados

El registro de los resultados de los experimentos es una parte esencial de cualquier trabajo científico. Los experimentos de laboratorio son el fundamento de nuevas hipótesis, teorías, conocimientos científicos y tecnologías, y son inútiles si no se consigna por escrito la descripción de lo que se ha hecho y observado en tal forma que permita a cualquiera, con cierto conocimiento del asunto, que repita, compruebe o corrija el trabajo realizado sin necesidad de guía especial. Las anotaciones deben ser breves y muy claras. Deben hacerse inmediatamente después de cada experimento sin confiar a la memoria un momento más de lo necesario.

Para que los experimentos de laboratorio tengan valor formativo, se aprenda a hacer observaciones exactas, se estimule la curiosidad y se desarrolle un sentido crítico, basado en los aspectos cuantitativos de la ciencia, es necesario que antes de iniciar el trabajo en el laboratorio:

- Se revise en los textos los principios fundamentales implicados.
- Se reflexione y relacione lo encontrado con otros principios o hechos previamente conocidos.
- Se estudie y se comprenda bien las instrucciones del experimento antes de realizarlo.

Es importante que la guía se conserve limpia y ordenada, para permitir la lectura fácil de las anotaciones, que deben ser una descripción completa y honesta de lo que se ha visto y hecho. Aunque los experimentos que se harán, producen resultados previsibles por las teorías conocidas, cualquier resultado imprevisto,

raro, o incluso absurdo debe anotarse y de ningún modo llenar el protocolo con lo “que debió pasar” pues sería una relación completamente inútil.

Las afirmaciones falsas o las omisiones no enseñan nada, en cambio, el análisis concienzudo de los resultados inesperados o contrarios a lo previsto, pueden ser fuente de mucha información útil para el desempeño futuro en el laboratorio donde los resultados inesperados están siempre al orden del día.

Guía para los informes escritos de las prácticas de laboratorio

Se debe trabajar en un grupo (constituido mínimo por tres personas y máximo de cuatro) y entregar un informe escrito de la práctica elaborado de acuerdo con las normas básicas para escritura de artículos científicos. Es importante tener en cuenta que la fecha de entrega de este informe no debe exceder de ninguna manera a la fecha de la próxima práctica a realizar.

Como una ayuda para este trabajo, a continuación se hace una relación breve de las partes de las cuales consta dicho informe, que pueden ser identificadas rápidamente en un artículo científico. Es de vital importancia la claridad en sus análisis en el momento de plasmar sus ideas, pues de este proceso depende que quien lea y evalúe el informe, el profesor, comprenda el contenido.

Partes de un artículo científico

- I. *Título*: El título del artículo puede ir centrado o justificado a la derecha o izquierda. Debe reflejar en forma concreta la consecución del objetivo de la práctica, es decir, debe ser coherente con lo propuesto antes y obtenido después de la práctica. Ejemplo:

Si el objetivo de la práctica es...	El título de dicha práctica puede ser:
Determinar cualitativamente carbohidratos	Determinación cualitativa de carbohidratos

- II. *Autores (estudiantes) e institución de origen*: Los integrantes o realizadores del trabajo deben escribirse en orden alfabético, en forma continua y siguiendo este patrón:

– Primer apellido: todo en mayúsculas.

- Segundo apellido: solo se escribe la inicial en mayúsculas, seguida por un punto y seguida de una coma.
- El nombre: se escribe completo con la inicial en mayúsculas y el resto en minúsculas.
- Cada integrante debe ir separado del otro por punto y coma (;).
- La institución a la que pertenecen debe escribirse justo después de citar a los integrantes y debe ser lo suficientemente específica. Dejar sangría después de la segunda línea es opcional.
- Ejemplo:

Determinación cualitativa de carbohidratos

CORTES I., Iván Dario; FERNANDEZ C., Carolina; OCAMPO L., Daniel Mauricio; PEREZ Z., Juliana. Universidad San Buenaventura–Seccional Cali. Facultad de Ingeniería Agroindustrial. Programa de Ingeniería Agroindustrial. Tercer Semestre.

Septiembre 8 de 2003

Palabras claves: prueba del Lugol, carbohidratos.

- III. *Fecha de recepción*: La fecha, en este caso corresponde a la fecha de entrega del informe. No debe estar precedida por ninguna suerte de título y se escribirá uno o dos espacios luego de haber finalizado la escritura de nombres e institución, tal como se muestra en el recuadro anterior.
- IV. *Palabras claves*: permiten la identificación rápida del contenido del trabajo en las bases de datos bibliográficos manejados a través de sistemas informáticos (internet, cd roms, etc.), no es un glosario y deben ser solo unas cuantas que resulten representativas (ver recuadro del punto II).
- V. *Resumen*: hace una brevísima descripción del contenido. Usualmente, cuando el artículo está escrito en un idioma diferente al inglés, también se adiciona un resumen en inglés, el cual se titula “Abstract”. El resumen de un trabajo dentro de un artículo o informe describe “brevemente” lo que se hizo y lo que se obtuvo, es decir, no se incluyen detalles sobre el procedimiento, simplemente se citan las técnicas empleadas. Estos detalles deberán incluirse en otros apartados del artículo (Métodos, por ejemplo). Su extensión es breve, no debe superar la página y normalmente emplea 10 líneas en promedio. El resumen debe ser redactado en forma impersonal

y en pasado (Ej.: se logró extraer, se realizó, etc.). Lo que allí se incluya no debe ser extraído de fuente alguna, debe ser escrito en forma original aunque se aceptan brevísimas intervenciones textuales necesarias para la coherencia de las ideas.

- VI. *Introducción*: En la introducción deben quedar expuestos los antecedentes históricos y teóricos del tema estudiado. Algunos llaman a esto “el estado del arte” refiriéndose con ello al hecho de que es en este apartado del trabajo donde se precisa lo que se ha hecho y lo que se está haciendo con respecto al tema trabajado en la práctica, lo cual es una manera de justificar el trabajo en sí mismo. Es importante que en la introducción queden incluidas las referencias bibliográficas de lo citado en el texto e igualmente es importante recordar que aquí es donde va descrito el objetivo principal del trabajo, el cual no estará precedido por título alguno ni viñeta alguna. La redacción en este caso es de tipo descriptivo e impersonal.
- VII. *Materiales y métodos*: describe los principales equipos, materiales y reactivos empleados en el trabajo de investigación así como las técnicas y métodos usados para la obtención de los resultados. En general, y aunque los gráficos suelen ser muy ilustrativos, no son estrictamente necesarios en esta parte a menos que las descripciones sean poco exactas y sean requeridos como apoyo. Recuerde que la metodología aquí descrita es un protocolo que otros podrían usar, así que es necesario que clarifiquen muy bien los pasos y las condiciones de realización. La metodología se debe redactar en forma impersonal y en pasado.
- VIII. *Resultados y discusión*: hace la relación de las observaciones, datos y resultados obtenidos. En esta parte se incluyen las tablas, esquemas, gráficos y fotografías tomadas en el laboratorio, (no las bajadas de internet) que permitan una clara presentación de los resultados.

En cuanto a la discusión, se debe decir que es la explicación de los resultados observados basándose en la literatura; es decir, en lo que otros ya establecieron y publicaron y que sirve de referencia para lo que encontramos en la práctica. Aquí se hace la interpretación de los resultados, se comparan éstos con otros obtenidos previamente, se discute sobre el alcance y las limitaciones de los resultados alcanzados, se formulan nuevas hipótesis, se sugiere la realización de estudios posteriores y se plantean las conclusiones. En la redacción del documento no se debe emplear la primera persona.

- IX. *Referencias citadas:* Aquí se relaciona la bibliografía citada en el texto del informe. Es importante recordar que nuestro trabajo está sustentado en la literatura, en lo establecido y publicado por otros. De esta manera un buen trabajo está respaldado por buenas fuentes bibliográficas. Así que como mínimo para este tipo de trabajos se deben incluir cinco (5) referencias como mínimo y máximo diez (10). Las fuentes deben ser variadas y corresponder a libros-texto, artículos de revistas científicas y páginas web. Al menos dos libros texto, una revista y dos páginas web. No es aconsejable tomar todo de internet puesto que existe mucha información en la red que ha sido puesta ahí sin revisión alguna y puede llevarnos a tomar información falsa o mal interpretada. Las referencias correspondientes a las páginas web deben corresponder al sitio preciso de donde se obtuvo la información y no del motor de búsqueda que nos llevó a ella.

No siempre se encuentran las secciones en el orden y los nombres indicados aquí, pero regularmente será posible reconocerlas en cualquier artículo científico.

Acompañamientos

Durante el semestre se tendrá a disposición un espacio quincenal en el cual se podrán discutir aquellos temas tratados en la asignatura y que han resultado particularmente complejos. En este espacio se trabajará en grupos más pequeños y con base en talleres. Es importante que se emplee adecuadamente, lo cual significa que no se debe llegar sin una revisión individual del tema y sin haber desarrollado el taller. Realmente este espacio no es una clase magistral en donde normalmente los profesores hablan y los estudiantes escuchan, se trata de una conversación guiada en donde se aclaran las dudas surgidas durante el estudio individual de un tema en particular. Las lecturas sugeridas serán presentadas a medida que se avance en el programa de este componente; sin embargo, la programación misma del espacio aparece más adelante en los cronogramas de actividades. Estas lecturas sugeridas, así como los resúmenes de las lecturas, los talleres, las reflexiones y aportes al trabajo presencial en el aula y demás actividades debes consignarse en una carpeta a manera de portafolio.

Protocolo 1

Uso del microscopio y observación de varios tipos celulares

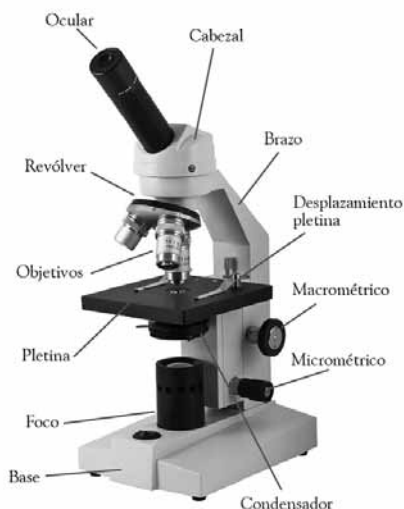
El microscopio es uno de los instrumentos más utilizados por los microbiólogos. Este permite observar, medir y cuantificar organismos muy pequeños. Existen varios tipos de microscopios entre los cuales se encuentran el microscopio óptico, el microscopio de barrido, el microscopio de contraste de fase, invertido, el microscopio electrónico, los cuales poseen diferentes poderes de aumento y resolución. Los rangos aproximados de magnificación se encuentran entre 4x y 40x, 20x – 25x, 400x-1500x, 10000x-160000x (este último del microscopio electrónico), donde X hace referencia al tamaño real del objeto a observar.

Objetivos

- Adquirir experiencia en el uso y manejo del microscopio y sus funciones.
- Observar objetos y diferenciar sus partes.

Partes del microscopio

Oculares, objetivos, revólver, porta objetos, diafragma, condensador, fuente de iluminación, base brazo, platina, carro mecánico, tornillos macro y micrométrico. Colocar el objeto de menor aumento, observe en el microscopio, mueva el micrómetro y ajuste el diafragma, iluminando en forma homogénea.



Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://ar.kalipedia>.

Preparación de materiales

El material se coloca en el portaobjeto, los porta son muy delicados así mismo debe ser su cuidado.

Observación y preparación del material vegetal

Observar células en las capas interiores de la cebolla.

- Cortar una cebolla en 4 pedazos iguales.
- Separar de un catafilo la epidermis y poner sobre el portaobjetos. Añada una gota de agua.
- Observe la preparación con el objeto de menor aumento.
- Observe un grupo de células con el lente de mayor aumento y dibuje las siguientes estructuras: Pared celular, membrana celular, núcleo, citoplasma.

Observación de células humanas

En esta práctica se observaran células epiteliales de la boca.

- Para desprender estas células se hace un raspado suave de la mucosa con un palillo estéril.

- Se coloca la muestra sobre una gota de azul de metileno.
- Observe y dibuje las estructuras celulares. Membrana celular, núcleo, citoplasma.

Observación de microorganismos (protozoarios) de aguas estancadas

Se realiza a partir de aguas estancadas, donde hay abundancia de este tipo de microorganismos unicelulares. Mediante una cuidadosa manipulación del condensador y el diafragma obtenga la mejor iluminación para ese tipo de microorganismo.

Deposite una gota de lugol en el borde de la preparación y espere a que el colorante se difunda y observe con el lente de menor aumento, posteriormente, pase a la lente de mayor aumento (tenga en cuenta agregarle aceite de inmersión a la preparación).

Realice un dibujo de los diferentes tipos de microorganismos observados. Identifique si estos son móviles o no.

Observación de células de levadura

- Disuelva algo de levadura seca en agua.
- Colocar la suspensión sobre la lámina portaobjetos.
- Observe con el lente de menor aumento y luego con el de mayor aumento.
- Haga otra preparación y agregue una gota de lugol, observe y haga esquemas.

Responda las siguientes preguntas.

- ¿Cuáles es la función del lugol en la preparación?
- ¿Puede usted considerar a las levaduras como procariotas o eucarióticas según lo observado?

Protocolo 2

Demostración de la presencia de microorganismos en múltiples lugares

De todos los organismos vivos no hay ninguno de mayor potencialidad invasora que los microorganismos. Estos se encuentran en cualquier clase de ambientes, incluso en ambientes hostiles, donde se pensaría que es imposible que exista vida tal y como la conocemos.

Esto hace de los microorganismos uno de los seres vivos más versátiles que se conocen, los cuales por ser de diminuto tamaño y no observables a simple vista pueden pasar inadvertidos.

La microbiología, luego de establecer las exigencias nutritivas de los microorganismos, ha logrado desarrollar medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos, logrando aislarlos fácilmente.

Objetivo

Comprobar la presencia de microorganismos en varios ambientes: mesa, aire, manos, boca, suelo.

Materiales

- 5 cajas de Petri.
- 5 aplicadores.
- Incubadora a 35 °C.

Método

- Rotule las cajas de Petri (fecha, tipo de muestra y nombre del grupo).
- Destape la caja rotulada dejándola abierta durante una hora.
- Pase un aplicador varias veces por la superficie de una mesa, destape la caja rotulada mesa y frote suavemente en el agar.
- Pase un aplicador varias veces por la superficie del suelo, destape la caja rotulada suelo y frote suavemente en el agar.
- Destape la caja rotulada “manos” y pase suavemente sus dedos sobre el agar.
- Destape la caja rotulada y tosa sobre ella, coloque nuevamente la tapa.
- Destape la caja rotulada boca y después de pasar el aplicador en el interior de la boca (dientes), frote el aplicador sobre el agar y cierre nuevamente la caja.
- Introducir invertidas sobre la incubadora a 37 °C y observar los resultados a las 24 horas.

Interpretación de los resultados

Observe la coloración, forma y tamaño de las colonias y cuente el número de ellas en cada caja.

Cuestionario

1. ¿Qué es una colonia bacteriana?
2. ¿Es posible observar colonias en un medio líquido? Sustente su respuesta.
3. ¿Pueden incidir los microorganismos del aire en los trabajos de laboratorios? Explique.
4. ¿Como usted evitaría que los trabajos de laboratorio se contaminen?
5. ¿Al incrementar el tiempo de incubación se presenta un aumento indefinido en el tamaño de las colonias? ¿Qué factor podría limitar este crecimiento?

Protocolo 3

Preparación de extendidos y coloraciones diferenciales

Preparación de extendidos

Para observar las características de las bacterias es necesario hacer un frotis sobre una lámina portaobjetos y lograr luego un proceso de coloración para poder ver las células al microscopio.

Algunos hongos filamentosos y levaduras son fácilmente observables al microscopio sin realizar ningún tipo de tinción; sin embargo, las bacterias por ser microorganismos mucho más pequeños generalmente requieren de coloración para su observación.

Objetivos

- Aprender la técnica del montaje de placas con bacterias y levaduras, y
- Familiarizarse con el manejo de cultivos microbianos.

Materiales

- Láminas portaobjetos.
- Láminas cubreobjetos.
- Asa de inoculación.
- Mechero.
- Goteros.

- Agua destilada.
- Cultivo de bacterias (*Escherichia coli*).
- Cultivo de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

Método

- En una lámina portaobjeto limpia coloque en el asa una gota de agua.
- Esterilice el asa poniéndola verticalmente a la llama del mechero hasta que se coloque de color rojo en toda su longitud.
- Enfríe el asa introduciéndola en el borde del medio de cultivo.
- Con el asa tome suavemente una pequeña porción de colonia bacteriana o de las colonias de levaduras.
- Coloque la muestra sobre la gota de agua presente en el portaobjeto, haga una extensión delgada (extendido) con el fin de esparcir las bacterias y/o levaduras. Si usted observa que la suspensión no se extiende en la superficie del portaobjeto, sino que se recoge en gotas, significa que éste se encuentra engrasado o está sucio. En este caso, se deberá repetir el proceso con un portaobjeto completamente limpio.
- Realice extendidos con todos los cultivos de bacterias y levaduras disponibles.
- Deje que la preparación se seque al aire.
- Fije la preparación flameándola (pasándola al menos dos veces por el mechero) de este modo los microorganismos pierden agua y quedan firmemente adheridos al portaobjeto.

Nota: Cuando se realicen extendidos a partir de cultivos en medio líquido, no es necesario colocar la gota de agua.

Coloraciones diferenciales

La morfología de las bacterias se puede confirmar de dos maneras, observándolas teñidas, donde se aprecia su movilidad u observándolas teñidas con colorantes. Los colorantes sirven para observar la estructura interna de las células, que de otra manera serían invisibles. Es importante que todos los colorantes se preparen en el laboratorio siguiendo las instrucciones específicas del fabricante. Es preciso seguir paso a paso los detalles cuando se preparan mezclas o compuestos, colorantes múltiples, el período y las condiciones de almacenamiento pueden ser factores críticos para determinar la composición y la calidad tintórea de la solución final.

Coloración de Gram

Esta coloración fue elaborada por el Danés Hans Gram en 1884, y permite distinguir entre diferentes bacterias con una morfología similar. El examen microscópico de un extendido coloreado por el método de Gram con una flora bacteriana mixta, aparecen las características diferenciales del método. Muchas bacterias conservan la coloración cristal-violeta-yodo y se teñirán de púrpura (Gram positivas), otras se colorean de rojo debido al contra-colorante el cual puede ser safranina o fucsina (Gram negativa). De esta manera, con el procedimiento no solo se hace visible la forma, el tamaño y otros detalles estructurales, sino que pueden agruparse los microorganismos presentes en tipos Gram positivos y Gram negativos, de acuerdo con sus reacciones frente a los colorantes.

La diferencia en la reacción de coloración entre las Gram positivas y las Gram negativas se atribuye a la diferencia de la composición química de las paredes celulares. Las bacterias Gram negativas poseen mayor contenido lipídico que las Gram positivas pero también poseen menor cantidad del polisacárido peptidoglucano, el cual en las Gram positivas pueden observarse varias capas. Aunque en ambos tipos bacterianos se forma un complejo cristal-violeta-yodo a partir de la coloración de Gram, el alcohol extrae más fácil el lípido de las células Gram-negativas, aumentando la permeabilidad celular, dando como resultado la pérdida del color morado (producto del cristal violeta) y coloreándose la pared celular de rojo debido al contracolorante utilizado safranina o fucsina.

En el caso de las Gram positivas el lípido presente en la pared es muy poco y el colorante cristal violeta colorea a varias capas del peptidoglucano, siendo retenido este colorante fuertemente a partir de la adición del mordiente (solución de lugol). Posteriormente, cuando se agrega el contra-colorante (safranina o fucsina) este no realiza un cambio de color visible puesto que predomina el violeta, color tomado al final de la coloración por las bacterias Gram positivas.

Materiales

- Cristal violeta.
- Lugol de Gram.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Cultivos bacterianos.

Método

Coloración de Gram

- Preparar un extendido fino de una colonia bacteriana y dejarlo secar al aire.
- Fijar el material al portaobjeto de modo que no sea arrastrado durante el proceso de tinción, pasando el portaobjeto 3 ó 4 veces sobre la llama del mechero.
- Colocar el preparado sobre un soporte de tinción y cubrir la superficie con solución cristal-violeta durante 1 minuto.
- Lavar bien con agua destilada.
- Cubrir el preparado con solución de yodo (Lugol de Gram) durante un minuto.
- Lavar nuevamente con agua destilada.
- Sostener el portaobjeto y bañar la superficie con el decolorante (alcohol cetona), hasta no arrastrar más colorante violeta (esto requiere habitualmente unos 10 segundos más o menos).
- Lavar nuevamente con agua corriente y colocar el porta objeto sobre el soporte, cubrir con safranina o el contra-colorante a utilizar durante un minuto.
- Lavar nuevamente con agua destilada.
- Examinar el preparado al microscopio, las bacterias Gram positivas se observan de color violeta y las Gram negativas de color rojo o rosadas.

Coloración de cápsulas

La cápsula de las bacterias no posee la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de las células y por eso exige el empleo de métodos de coloraciones especiales.

Algunos están destinados a colorear la célula y el fondo pero no la cápsula, de manera que la envoltura se aprecia por contraste, como el método de Anthony. Otros procedimientos producen un efecto colorante diferencial, cuando la cápsula admite un contra-colorante. Otro procedimiento utiliza el principio de la coloración negativa como el método de tinta china.

Materiales

- Cristal violeta al 1% (solución acuosa).
- Sulfato de cobre al 20% (solución acuosa).
- Cultivos bacterianos en agar leche desnatada.
- Bandeja de coloración.

Método de Anthony (coloración de cápsula)

1. Preparar un extendido fino y uniforme de un cultivo de *klebsiella pneumoniae*, efectuado en leche desnatada, extendiéndolo con un portaobjetos en ángulo recto.

Si no se trata de un cultivo en leche, se podrá mezclar una parte del material recogido con un asa bacteriológica, con una cantidad igual de leche desnatada, extendiéndola para obtener una base uniforme.

2. Secar al aire. No fijar por calor.
3. Colorear con una solución acuosa de cristal violeta al 1%, durante 2 minutos.
4. Lavar con solución de sulfato de cobre al 20%.
5. Dejar secar al aire en posición vertical y observar al microscopio.

La cápsula aparece sin colorear contra un fondo de color púrpura, las células se tiñen intensamente.

Coloración de esporas

Las esporas son relativamente resistentes a los agentes físicos y químicos y no se colorean con facilidad. En métodos de coloración de rutina como la coloración de Gram, aparecen como cuerpos retráctiles no coloreados. Por lo general, en métodos especiales de coloración se requiere el calor para permitir la penetración del colorante de esporas

Materiales

- Solución acuosa de verde de malaquita al 5%.
- Solución acuosa de safranina al 0.5%.
- Cultivo bacteriano.
- Bandeja de coloración.

Método

- Realizar un extendido de una colonia de *Bacillus cereus* del agar con el asa bacteriológica.
- Cubrir el portaobjeto con una tira de papel filtro.
- Bañar todo el portaobjeto con solución acuosa de verde de malaquita al 5%.
- Calentar al vapor durante 3 a 6 minutos sin dejar secar.
- Enjuagar con agua corriente.
- Contra colorear con solución de Safranina al 0,5% durante 30 segundos.

Al observar las esporas estas se ven en forma de esférulas verdes en los bastoncillos coloreados de rojo, o junto con desechos de color rojo.

Cuestionario

- Las esporas son más difíciles de colorear que las células vegetativas. ¿Por qué?
- En su preparación se observan esporas libres y en el interior de las células vegetativas. ¿Por qué?
- Los frotis de bacterias capsuladas no se lavan con agua ni se calientan. ¿Por qué?
- ¿Cómo puede incrementarse el contenido del material capsular?
- ¿Cómo se correlaciona la presencia de cápsula con la virulencia de una bacteria patogénica?. Describa un método por el cual se puedan obtener muestras de pared celular para analizar la composición química de estas.
- Clasifique las siguientes bacterias como Gram positivas o Gram negativas.
 - *Proteus vulgaris*.
 - *Clostridium tetani*.
 - *Staphylococcus aureus*.
 - *Salmonella* sp.
 - *Streptococcus pneumoneae*.
 - *Bacillus cereus*.
 - *Pseudomonas* sp.
 - *Bacillus subtilis*.
 - *Thiobacillus* sp.

Protocolo 4

Preparación de medios de cultivos

Las bacterias son organismos supremamente adaptables a diferentes sustratos. De acuerdo con sus requerimientos nutricionales se consideran como exigentes y no exigentes. Su estudio se ha hecho posible gracias a la implementación de los medios de cultivos que le suministran al organismo los elementos necesarios para su crecimiento. Los medios de cultivo son preparaciones utilizadas para diferentes propósitos tales como: aislamiento e identificación de microorganismos, prueba de esterilidad, análisis de agua, ambientales, alimentos y productos bacteriológicos, prueba de sensibilidad a los antibióticos.

Las bacterias autótrofas pueden utilizar el nitrógeno libre, amoníaco o nitrato, de tal manera que los medios pueden ser muy simples. Los heterótrofos con una capacidad sintética más limitada requieren compuestos más complejos debido a que las células no pueden obtener sus requerimientos de nitrógeno directamente de las proteínas, éstas deben estar hidrolizadas en compuestos nitrogenados más disponibles conocidos como peptonas, las cuales son derivados de las proteínas por medio de ácidos, álcalis o enzimas y son solubles en agua.

Composición de los medios de cultivos

Aunque los diferentes medios contienen gran cantidad de sustancias dependiendo del microorganismo a aislar, básicamente están compuestos de:

Peptonas

Varían en pureza y calidad dependiendo del tipo de hidrólisis realizada. Los álcalis tienden a destruir el contenido vitamínico de la proteína y también

hacen perder parte de los aminoácidos, la hidrólisis conserva las vitaminas y aminoácidos. La caseína pura no contiene carbohidrato, pero si contenido vitamínico y de triptófano.

Infusión y extractos

Son de carne y otros tejidos, se trata de material de origen proteico, soluble en agua, sin acción enzimática. Las proteínas mismas se coagulan por acción del calor. Afortunadamente, la acción enzimática microbiana y el tiempo de incubación aumentan la facilidad de utilización.

Agentes solidificantes: agar, gelatina, agarosa, agar noble.

Colorantes: cristal violeta o verde brillante, inhiben Gram positivos.

Otros componentes:

- Indicadores de pH.
- Indicadores de oxido-reducción: azul de metileno.

Cuidados y recomendaciones

- Los medios de cultivo pueden prepararse a partir de sus componentes o según las recomendaciones del fabricante, cuando este se consigue comercialmente hay varias reglas que se deben guardar para asegurar la buena calidad del medio preparado.
- El agua utilizada debe ser destilada o desmineralizada, proveniente de un sistema adecuado de destilación, su medida debe ser exacta y en ningún momento con aproximaciones que generalmente se traducen en una alteración de la consistencia del medio, especialmente cuando se trata de agares.
- Si los ingredientes necesarios para preparar el medio de cultivo son deshidratados estos deben permanecer en remojo durante 15 minutos, con la finalidad de permitir una hidratación total de las moléculas, lo cual evita el calentamiento excesivo que conduce generalmente a evaporación y descomposición del medio.
- Antes de someterse a la acción de la autoclave, el medio debe estar completamente disuelto. No se debe disolver con la temperatura de la autoclave,

generalmente el exceso de calor produce un medio con grumos debido a una deficiente disolución.

- Los medios de cultivo con yema de huevo, carbohidratos, urea o cualquier nutriente, no pueden ser esterilizados en autoclave. Estos medios se preparan esterilizando por separado lo que conocemos como base (se esteriliza en autoclave) y los suplementos por filtración o vapor fluyente; la mezcla de los componentes se realiza cuando la base se ha enfriado entre 45 y 50 °C.
- Los medios de agar SS, Bismuto de sulfito y otros no pueden ser esterilizados en autoclave.
- Todos los medios de cultivo después de prepararlos y vertidos en la caja de Petri, deben ser secados, con la finalidad de eliminar el exceso de agua. Para evitar la coalescencia y mezcla de las colonias cuando se hace la siembra.

Clasificación de los medios de cultivos

- *Sólidos*: Contienen agar, gelatina o huevo coagulado.
- *Líquidos*: Son los también llamados caldos de cultivo.
- *Selectivos*: Poseen sustancias que favorecen el crecimiento de ciertos microorganismos, ejemplo agar McConkey.
- *Diferenciales*: Son aquellos donde el metabolismo bacteriano produce cambios en el medio, lo cual permite identificar la bacteria.
- *Mantenimiento*: Son preparaciones utilizadas para conservar cepas de bacterias. Ejemplo. BAB y agar blanco para enterobacterias.
- *Medios no selectivos*: Permite el desarrollo de diversos tipos de bacterias. Ejemplo: caldo nutritivo y agar nutritivo.
- *Enriquecidos*: Contienen sangre, leche, suero, extracto de animales o vegetales. Lo cual incrementa el número de bacterias deseadas. Estos medios de cultivo y su utilización se basan en el aprovechamiento óptimo de nutrientes combinados con temperatura y pH adecuados. Ejemplo: agar sangre.

Objetivo

Aplicar técnicas para la preparación de los medios de cultivo y reconocer la importancia de sus componentes para el crecimiento bacteriano.

Material y métodos

1. Observación de medios de cultivos deshidratados: Para cada uno de los medios de cultivos deshidratados o de otros componentes que están dispuestos en exhibición, anote los siguientes datos: Nombre, composición, usos, preparación, destape el envase y determine (sin tocar su contenido): color, olor, textura (cristales, gránulos, polvo).
2. Preparación de medios de cultivo: las formulas son las siguientes:
 - a. Caldo de infusión de carne:
 - Carne fresca 500 g.
 - Agua destilada 1L.
 - Peptona 10 g.
 - NaCl 5 g.

Coloque la carne en agua destilada toda la noche, luego hierva por media hora, manteniendo el volumen durante el proceso (adicionando más agua si es necesario). Enfrié, filtre y adicione la peptona y la sal, caliente para disolver, ajuste pH entre 7.4 y 7.6; esterilice por 15 minutos a 15 libras de presión y 121 °C.

- b. Caldo nutritivo y Agar nutritivo:
 - Extracto de carne 3 g.
 - Peptona 5 g.

Disolver los ingredientes en un litro de agua, calentar hasta ebullición, luego esterilizar a 121 °C durante 15 minutos; en el caso de agar se le adiciona 15 g de agar-agar y se procede de la misma forma.

Preparación de medios de cultivos vegetales

- a. PDA (Papa, dextrosa, agar):

Este medio favorece el crecimiento de hongos, utilizado en el aislamiento de hongos patógenos y no patógenos de plantas y animales. Contiene:

- Caldo de papa 1L.
- Dextrosa 20 g.
- Agar 15 g.

Coloque 200 g de papa en 800 ml de agua y lleve hasta ebullición, filtre mediante una gasa delgada y posteriormente agregue la dextrosa y el agar, enrase a 1 litro.

b. Agar zanahoria:

Este puede ser preparado de igual forma que la papa. El jugo de tomate se usa a menudo en las mismas proporciones como el extracto de carne y se ha encontrado que es un medio para el crecimiento y la esporulación de hongos.

Tome 40-50 g de zanahoria fresca picada en trozos, agregue 800 ml de agua destilada, cocine la zanahoria hasta que se ablande, decante el líquido y complete hasta 1 litro, agregue 15 g de agar, caliente y agite constantemente, esterilice en autoclave.

Preparación de medios de cultivos comerciales

- Prepare 100 ml de agar nutritivo comercial, Siga las instrucciones de la etiqueta del frasco.
- Después de sacarlos del autoclave deje enfriar hasta 50 °C y vierta en caja de Petri cerca de 20 ml, deje enfriar, rotule y guarde en la nevera.
- Efectué los cálculos para preparar 30 ml de caldo nutritivo, siga las instrucciones de la etiqueta, vierta porciones de 5ml en tubos de ensayo, rotule esterilice y deje enfriar, luego guarde en la nevera.

Estos medios se guardarán para ser empleados en la siguiente práctica.

Protocolo 5

Características de los cultivos bacterianos y aislamiento de microorganismos

La observación e interpretación de los cultivos primarios después de la incubación es el paso definitivo en la decisión de continuar o no con la identificación de los microorganismos aislados, la observación se basa en la identificación de cada tipo de colonia, grado de pureza, coloración de Gram y los cambios en el medio de cultivo que rodea la colonia.

La decisión anterior está basada en la observación de cada colonia (características como color, forma, tamaño, número) y en el grado de pureza, coloración de Gram y la actividad metabólica reflejada por los cambios que ocurren en el medio, esto último uno de los criterios básicos usado en la identificación microbiológica.

- *Características del crecimiento:* Se debe tener en cuenta el aspecto que presenta en cuanto a: Tamaño, elevación, margen, color, superficie, consistencia y forma (puntiforme, circular, filamentos, rizoide, etc.).
- *Cambios en medios diferenciales:* Varios colorantes indicadores de pH evidencian la actividad metabólica y ayudan a identificar colonias aisladas.

Objetivo

Aplicar los métodos más usados en microbiología para el crecimiento y aislamiento de microorganismos.

Materiales

- 1 tubo con agar nutritivo inclinado.
- Caja de Petri con agar nutritivo.
- 4 cajas de Petri vacías y estériles.
- 3 tubos de ensayo con agar nutritivo fundido y enfriado a 45 °C.
- 1 tubo de ensayo con agar nutritivo en columna.
- 1 tubo con caldo nutritivo.

Métodos de siembra

Características de los cultivos bacterianos

- Esterilizar el asa utilizando la llama del mechero como se menciona anteriormente.
- Con el asa siembre separadamente una muestra del cultivo que le corresponda: *Proteus sp*, *E. coli*, *Salmonella sp*, *S. aureus*, *Pseudomonas sp*, o *klebsiella sp*, en un tubo inclinado. Para esto introduzca el asa e inocule la superficie del medio, flamee la boca del tubo y tápelo. Flamee nuevamente y esterilice asa para posteriormente colocarla en el porta asas.
- Repita el procedimiento anterior con agar nutritivo en columna.
- Obtenga otra muestra del cultivo bacteriano y raye suavemente de manera horizontal sobre la superficie del agar.
- Inocule de manera similar el cultivo disponible en caldo nutritivo, agitando bien el asa dentro del tubo.
- Incube por 18-24 horas, haga observaciones y esquemas, describa como crece el microorganismo estudiado.

Obtención de cultivos axénicos

Con el asa tome una muestra de un tubo con un cultivo bacteriano mixto, siembre por estrías sobre un tercio de la caja de Petri, que contiene agar nutritivo, de la siguiente manera:

- Flamee el asa.

- En un extremo de la caja con agar realice rayados suaves en forma horizontal sobre la superficie del agar utilizando el asa, para el primer aislamiento gire la caja 90 grados y flamee el asa. Continúe el aislamiento realizando el mismo procedimiento en los tres extremos restantes de la caja. En el último extremo, cuando esté realizando la estriación tenga cuidado de no tocar con el asa el primer rayado que realizó.

En profundidad

Esta técnica es muy usada para realizar el recuento a partir de diluciones. Con este método de siembra es más fácil observar reacciones metabólicas bacterianas, tales como: lipólisis, proteólisis y fermentaciones.

- El medio de cultivo preparado en tubos grandes, debe estar fundido y a 45 °C.
- Se le agrega 1 de la dilución a sembrar en el centro de la caja de Petri estéril.
- Verter el medio de cultivo en la caja de Petri y homogeneizar por movimientos giratorios horizontales en varias direcciones, teniendo cuidado de no formar burbujas, dejar solidificar e incubar.

Por dilución en agar

Este método se basa en la siembra de la muestra directamente en tubo de agar fundido y enfriado a 45 °C. Se realizan varias diluciones de la muestra con el fin de lograr un buen aislamiento.

- En el tubo No 1 con agar fundido coloque la muestra tomada con el asa, agite por rotación suave para mezclar el inóculo.
- Con el asa tome una muestra del tubo 1 y siembre en el tubo 2.
- Deposite el contenido del tubo 1 en la caja de Petri vacía y estéril.
- Con el asa estéril tome una muestra del tubo 2 y siembre el tubo 3, vierta el contenido del tubo 2 en una caja de Petri vacía, haga lo mismo con el tubo 3.
- Lleve las cajas marcadas a la incubadora.
- Deje incubar por 18-24 horas haga observaciones y saque sus propias conclusiones sobre cada método.

Protocolo 6

Caracterización bioquímica de enterobacterias

Esta familia está compuesta por bacilos Gram negativos de tamaño mediano, anaerobio facultativo, móviles o inmóviles, pero no esporulados.

Estas bacterias crecen bien en medios artificiales, tienen necesidades nutritiva simples, fermentan la glucosa con producción de ácido o ácido y gas, reducen los nitratos a nitritos y son oxidasa negativas, son organismos ubicuos de distribución mundial, encontrándose en el suelo, el agua, la vegetación y formando parte de la flora bacteriana normal de casi todos los animales.

Objetivo

Realizar las pruebas bioquímicas utilizadas por los microbiólogos para la identificación de cepas conocidas de enterobacterias para lograr una correcta identificación de género y especie.

Materiales

- Cepa de enterobacterias.
- Medios de cultivo para pruebas bioquímicas.

Método

- De los caldos, realice una siembra por agotamiento en agar McConkey, medio diferencial que nos separa las colonias fermentadoras de lactosa de las que no lo hacen, incubar a 37C por 18-24 horas.

- Observe la morfología, tamaño aspecto y color de las colonias, aquellas que presentan color rosado habrán fermentado lactosa.
- De las colonias aisladas, procedentes del agar sembrar en las siguientes pruebas bioquímicas.

TSI: contiene glucosa 0.5-1.0% fenol) sacarosa y lactosa, además rojo de fenol, que indica fermentación y sulfato ferroso, para demostrar la producción de H_2S , la siembra se hace punzando con el asa recta en profundidad y en estría en la superficie.

Reacción	Interpretación
Fondo ácido*superficie alcalina	Fermentación de glucosa (K/A)
Todo el medio ácido	Fermentador de glucosa, lactosa (A/A)
Burbujas	Aerógenos
Ennegrecimiento del fondo	H_2S
Medio alcalino**	No fermentador de azúcar (K/K)

**Alcalino-Rojo

*Acido-Amarillo

Lisina Decarboxilasa: La decarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen la enzima decarboxilasa son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo ($-COOH$), dando una amina o una diamina y anhídrido carbónico, se siembra igual que TSI: K/A, A/A o K/K.

Interpretación: La prueba es positiva cuando hay cambio de color del púrpura a amarillo (producido por la cadaverina); la prueba es negativa cuando no hay cambio de color. Se reporta con las mismas convenciones que el TSI: K/A, A/A; o K/K.

Citrato Simmons: Este medio contiene citrato como única fuente de carbono y sales de amonio como fuente de nitrógeno. No contiene aminoácidos, las bacterias que pueden utilizar el citrato también extraen nitrógeno con la producción de amonio que alcaliniza el medio de cultivo, el indicador de pH es azul de bromotimol, se siembra únicamente en superficie.

Interpretación: La prueba es positiva cuando se observa un crecimiento con un color azul intenso, y negativa cuando no se observa cambio de color.

Urea de Christensen: Si la bacteria posee la enzima ureasa, hidroliza urea del medio liberando amonio y CO_2 , el indicador es rojo de fenol, se siembra en superficie por estrías.

Interpretación: La prueba es positiva cuando se observa un cambio de color amarillo a rosado, negativa cuando no hay cambio de color.

Prueba de Indol y motilidad: La movilidad se observa en el medio SIM por desplazamiento alrededor de la línea de inoculación, realizada en profundidad y en el centro del agar.

Las bacterias con la enzima triptofanasa, son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con la producción de indol, ácido pirúvico y amonio. Se siembra con el asa recta, punzando el agar en profundidad.

Después de incubación por 18-24 horas adicione 0.1 del reactivo de Kovac's a los tubos con medio SIM, la presencia de Indol se destaca por la coloración roja.

La movilidad se observa por desplazamiento del crecimiento alrededor de la línea de inoculación. Algunos microorganismos producen ennegrecimiento del medio por formación de sulfuro de hidrógeno.

Interpretación: Después de la inoculación por 24 horas, se le debe agregar 8 gotas del reactivo de Kovac's, la presencia de Indol se observa por la aparición de una coloración rojiza en la superficie del tubo.

La movilidad se observa por el desplazamiento del crecimiento alrededor de la línea de inoculación. Algunos microorganismos pueden producir ennegrecimiento del medio por formación de sulfuro de hidrógeno.

Reacción del rojo de metilo: Sembrar con el asa un tubo con caldo MRVP, incubar por 24-48 horas, pasado este tiempo adicionar 5 gotas de la solución rojo de metilo.

Algunas bacterias utilizan la glucosa, de forma que el valor de pH desciende a menos de 4.4. En cambio otras bacterias producen menos ácido, reduciendo en menor cantidad el pH del medio. Esta distinción puede hacerse a través del rojo de metilo, que presenta color amarillo por encima del pH 5.1 y color rojo cuando el pH desciende de 4.4.

Ensayo de Voges Proskauer: Sembrar con el asa un tubo con caldo MRVP, incubar por 24-48 horas, pasado este tiempo adicionar 4-6 gotas de la solución de sulfato de cobre. En caso positivo se presenta un viraje a rojo después de algunos minutos.

A partir de la glucosa, numerosos microorganismos forman acetona, 2.3 butanoidol o diacetilo. La producción de estos productos metabólicos se lleva a cabo con reactivos de O MEARA, (Mejorado por Levine y Col) con sulfato de cobre o con el reactivo de Barrit.

Protocolo 7

Análisis microbiológico de alimentos

La investigación de alimentos requiere especial atención para identificar microorganismos patógenos para el consumidor. Este examen permite obtener pautas para establecimiento y sobre todo para las normas de higiene.

Microorganismos indicadores: Este término se aplica a cualquier grupo taxonómico, fisiológico o ecológico de microorganismos cuya presencia proporcione evidencias indirectas de que los alimentos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran determinar la llegada de microorganismos peligrosos o permitir la proliferación de especies patógenas o toxicogénicas. Los organismos patógenos son de gran utilidad tanto para determinar la calidad bacteriológica de los alimentos como la garantía que ofrecen al consumidor.

Escherichia coli y *coliformes*: Estos microorganismos habitan en el tracto digestivo de hombre y animales, su presencia indica contaminación directa o indirecta de origen fecal, la presencia de *E. coli* advierte el riesgo de que pudieran estar presente bacterias patógenas entéricas. Los coliformes son buenos indicadores de limpieza y desinfección inadecuada o de manipulación o tratamientos incorrectos de los alimentos.

Streptococcus salivarius: Es un microorganismo indicador de contaminación oral, puesto que forma parte de la flora bucal.

Staphylococcus aureus: Su presencia en el alimento se interpreta como contaminación proveniente de la piel, la boca o fosas nasales.

Clostridium botulinum y *Clostridium perfringens*: La presencia de esporas en alimentos enlatados no ácidos, es señal de un tratamiento térmico insuficiente.

Objetivo

- Determinar la calidad del producto en términos de contaminación microbiana.
- Establecer el número y tipo de microorganismos que se encuentran en distintos alimentos.

Materiales

- Cajas de Petri esterilizadas.
- Frasco con 90 ml de agua peptonada.
- Tubos de ensayo con 9 ml de agua peptonada.
- Tubos de ensayo con 10 ml de caldo brilla.
- Agar base ogye o saboreaud.
- Pipetas esterilizadas.
- Agar cuenta gérmenes.
- Cajas con agar EMB.
- Gradilla para tubos.
- Agar cristal violeta rojo neutro.

Método

Dilución de la muestra de alimentos:

- Mantener en refrigeración hasta 24 horas después de tomada la muestra.
- Antes de abrir los envases se debe desinfectar con alcohol al 70% y agitarse para homogenizar. Si es un material sólido se debe utilizar un mortero estéril para fragmentar el alimento.
- Se preparan diluciones del alimento de 10^{-1} hasta 10^{-5} .
- La dilución 10^{-1} se prepara midiendo 10 gramos (sólido) o 10 ml (líquido) de la muestra en un frasco dilución se prepara midiendo 10 o gramos de la muestra en un frasco que contenga 90 ml de diluyente (agua peptonada).

- Transferir 1 ml. de la dilución 10^{-1} a un tubo que contenga 9 ml del diluyente (agua peptonada) para obtener la dilución 10^{-2} y así sucesivamente hasta formar la dilución 10^{-5}
- Cada dilución sucesiva disminuirá 10 veces la concentración anterior. Los tubos deben estar bien rotulados.

Inoculación

Número más probable de coliformes totales y fecales

Prueba presuntiva para coliformes totales

- Se debe pipetear 1 de cada una de las diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) en tubos con caldo brilla, utilizando 3 tubos por dilución.
- Incubar los tubos a 37°C por 24-48 horas.
- Pasadas las 24-48 horas anotar los tubos que muestren producción de gas, lo cual puede observarse por el desplazamiento del tubo de Durham.

Prueba confirmativa para coliformes totales

Confirmar que los tubos con producción de gas en la prueba presuntiva son positivos, inoculando 3 a 5 gotas en otros tubos con caldo brilla

- Incubar los tubos a 44.5°C por 24 horas baño maría.
- Pasado 24 horas anotar los tubos que muestren producción de gas.
- Anotar los tubos que tiene producción gas y revelar el caldo triptona con el reactivo de Kovacs; agitar suavemente y observar la presencia de un anillo rojo en la superficie.

Interpretación de los resultados

Leer la tabla NMP (Número más probable) para saber el resultado de acuerdo con el número de tubos positivos, tanto para los coliformes totales, según el resultado de la prueba confirmativa y para los coliformes fecales, según el caldo brilla y el caldo triptona incubado a 44.5 °C.

Determinación de E coli

Se logra a partir de los tubos positivos de la prueba confirmativa –sembrar por estría– tomando una muestra con una asa de cada uno de los tubos en la superficie de una placa de agar EMB (Eosina azul de metileno).

- Incubar las cajas invertidas a 37 °C por 24 - 48 horas.

Pasado este tiempo se hace la lectura de las colonias típicas de *E coli*, aquella que presentan un brillo verde metálico.

Recuento de mesófilos

La presencia de este tipo de microorganismos refleja las deficiencias en el proceso de elaboración del alimento.

- Se debe transferir por duplicado alícuotas de 1 ml de cada una de las diluciones 10^{-1} a 10^{-5} en cajas de Petri vacías estériles y previamente marcadas.
- Inmediatamente adicionar a las cajas el agar cuenta gérmenes fundidos.
- Inmediatamente mezclar el inóculo con el medio fundido, moviendo suavemente la caja hacia arriba, hacia abajo y en forma circular.
- Dejar solidificar el agar.
- Invertir e incubar las cajas de petri a 37 °C durante 24 horas. Pasado este tiempo se deben contar las colonias que hayan crecido en cajas que contengan entre 30 y 300 colonias observables.

Los resultados deben expresarse con 2 dígitos y el resto en potencia de 10. Cuando el recuento se utiliza para determinar la aceptación de un alimento se compara con los valores límites establecidos según la normatividad del Ministerio de Salud, del Invima o las normas Icontec.

Recuento de enterobacterias totales

Generalmente, la contaminación del alimento se adquiere por un proceso de manipulación inadecuado y posterior a la preparación misma del producto.

- Transferir por duplicado alícuotas de una de cada uno de las diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) en cajas de Petri estériles y previamente marcadas.
- Adicionar el agar cristal violeta rojo neutro bilis glucosa.
- Mezclar las diluciones con el medio. Agregar 5 ml del agar mencionado anteriormente.
- Incubar durante 24 horas.
- Seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias violeta, rodeadas de un precipitado rojo violeta.
- Confirmar estas colonias con la prueba de oxidasa.

Prueba de oxidasa

Tomar una colonia del crecimiento del agar cristal violeta rojo neutro bilis glucosa, sembrar en la superficie del agar nutritivo inclinado, incubar a 37 °C por 24 horas.

Después de la incubación realizar la prueba de oxidasa, tomando una colonia del crecimiento del agar nutritivo, colocándola sobre un papel blanco, adicionarle una gota del reactivo de oxidasa, si la colonia se torna de color rosado la prueba es positiva, si permanece del mismo color del medio la prueba se considera negativa.

Recuento de hongos y levaduras

Generalmente, la presencia de hongos y levaduras en los alimentos se da por contaminación del aire en el momento de empaque del alimento, por manipulación de personas con lesiones en la piel ocasionados por hongos o por mal almacenamiento del producto.

- Transferir por duplicado alícuotas de cada una de las diluciones (10^{-1} a 10^{-3}) en cajas de Petri estériles previamente marcados.
- Inmediatamente se debe adicionar agar Ogye o Saboreaud fundido y mantenido a 45°C, mezclar suavemente.
- Dejar solidificar.
- Invertir e incubar las cajas a temperatura ambiente de 5 a 8 días.
- De aquí en adelante se procede igual a la prueba de recuento de mesófilos.

Cuestionario

- ¿Cuál es el fundamento de las diferentes pruebas que se han realizado?
- ¿Cuáles son los componentes de cada uno de los medios de cultivo y por qué se utilizan?

Protocolo 8

Caracterización bioquímica de *Bacillus cereus*

Introducción

La búsqueda de bacterias capaces de producir toxiinfecciones alimentarias es de especial importancia en la microbiología de los alimentos. El incremento de estas infecciones ha llevado a que la presencia de sus agentes se determine cada vez más en forma rutinaria y completa. El *Bacillus cereus* es un bacilo esporulado y aeróbico que normalmente se encuentra presente en el suelo, polvo y agua. Los alimentos en los cuales se pueden encontrar este bacilo, pueden ser platos de cereales a partir de maíz o almidón de maíz, puré de papas, verduras, carne picada, embutido de hígado, platos de arroz al estilo oriental, sopas, etc. El número mínimo de organismos necesarios para causar los síntomas es de unos 10^7 /g, excepto en el caso de niños pequeños en los que se produce la enfermedad con solo 10^5 /g.

Objetivo

Proporcionar al estudiante los elementos necesarios para hacer el diagnóstico bacteriológico de *Bacillus cereus*, mediante la identificación del mismo.

Materiales

- Caja de Petri con agar selectivo para *Bacillus cereus*.
- Tubos de ensayo con medios: agar leche, agar almidón, agar gelatina, caldo nitrato, caldo glucosa, caldo arabinosa, caldo xilosa.

- Solución de Lugol.
- Reactivo de Griess.
- Cloruro de mercurio al 15%.

Método

De la caja de Petri que contiene el cultivo de *B. cereus* siembre con un asa una muestra en cada uno de los tubos que contienen los siguientes medios:

1. Agar leche, agar almidón, agar gelatina, caldo nitrato, caldo glucosa, caldo arabinosa, caldo xilosa.
2. Incube a 37 °C por 24 horas.
3. Al día siguiente lea las pruebas bioquímicas de la siguiente manera:
 - Agar almidón: cubrir la superficie del tubo con solución de lugol, si no se ha producido hidrólisis de almidón, se tiñe de azul. Las áreas hidrolizadas aparecen como zonas claras.
 - Agar gelatina: añada al tubo 5 gotas de cloruro de mercurio, elimínelo después de 5 minutos, lave el tubo con agua corriente. La reacción es positiva cuando una zona clara rodea la estría.
 - Agar leche: observe una zona clara que aparece alrededor del crecimiento, lo cual indica degradación de la caseína.
 - Caldo glucosa, arabinosa y xilosa: observe si hubo o no fermentación, indicada por un color rosado en el medio de cultivo y si hubo o no producción de gas, indicada por la aparición de burbujas en el caldo.
 - Glucosa + (sin gas); arabinosa (-); xilosa (-).
 - Caldo nitrato: añada al tubo unos miligramos del reactivo de Griess y observe el color que presenta. El color rojo indica prueba positiva de reducción de nitratos. Si no hay cambio de color la prueba es negativa.

Protocolo 9

Análisis bacteriológico del agua por el método de los tubos múltiples

Introducción

La orientación de estos análisis se ha basado principalmente en el interés en los aspectos sanitarios. No se conocen bien las bacterias cuyo medio propio es el agua, en parte porque es difícil que muchas de ellas crezcan en medios de cultivo en laboratorio, pero hay muchas que se han identificado como población natural, entre las cuales encontramos *Serratia sp*, *Pseudomonas sp*, *Sarcina, micrococcus, Caulobacterias*.

Es necesario el análisis bacteriano del agua para determinar su calidad para el consumo humano, así como para controlar la eficacia de los sistemas de potabilización del agua y de las piscinas de uso público.

Objetivos

- Realizar análisis bacteriológico del agua tratada y sin tratar para establecer su calidad sanitaria.
- Realizar el aislamiento de pseudomonas en una muestra de agua de piscina.

Materiales

- Agua peptonada.
- Cajas de Petri vacías estériles.

- Caldo brilla y caldo EC.
- Caldo nutritivo.
- Pipetas serológicas graduadas.
- Agar cuenta gérmenes.
- Lauryl sulfato triptona.
- Agar McConkey.
- Agar Cetrimide.

Métodos

Análisis bacteriológico del agua cruda

1. Recuento de mesófilos aeróbicos viables (mesoaerobios).
 - a. Dilución de la muestra: a partir de la muestra de agua tomar 10 ml y agregarlos a 90 ml de agua peptonada (dilución 10-1), seguidamente hacer diluciones sucesivas hasta 10-5 para agua cruda.
 - b. Realizar el procedimiento de la misma forma que en análisis de alimentos.
2. Prueba presuntiva para coliformes totales.
 - Realice el procedimiento de la misma forma que en análisis de alimentos, pero utilice el caldo lauryl sulfato, recomendado para análisis de aguas, puesto que permite el desarrollo de bacterias gran – negativas por ser un medio selectivo y de enriquecimiento.
 - Realice la lectura en la tabla de números más probable (NPM), para saber el resultado de acuerdo con el número de tubos positivos.
3. Prueba confirmativa para determinación de coliformes totales.

Realice el procedimiento de la misma forma que en análisis de alimentos.
4. Prueba para coliformes fecales.
 - De todos los tubos positivos tomar 0.5ml y agregar a cada tubo de caldo EC, incubar a 45°C por 24-48 horas.
 - Considere positivos los tubos que presenten turbidez y producción de gas.
 - Anotar sus resultados y buscar en la tabla adjunta, para realizar la lectura del índice del NMP, y límites de confianza de 95% para varias

combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se utilizan tre alícuotas de 10, tres de 1 y tres de 0.1ml-.

Determinacion de Escherichia Coli

- A partir de los tubos EC positivos transfiera una asada a agar McConkey e incube a 35-37°C por 24 horas.
- Escoja colonias aisladas lactosa positivas.
- Realizar pruebas bioquímicas e identificar *E coli*.

Análisis bacteriológico de agua potable

1. Recuento estándar de mesófilos aeróbicos viables.
 - Realizar el procedimiento de la misma forma que el agua no tratada, pero sembrando 1 ml, 0.1 ml y 0.01 ml de la muestra original.
2. Prueba presuntiva para determinación de coliformes totales
 - A 100 de muestra agregar 0.1 de tiosulfato de sodio al 10%, para neutralizar la acción del cloro sobre las bacterias.
 - A 3 tubos de lauryl sulfato concentración doble, agregar 10 de agua sin diluir.
 - A 3 tubos de lauryl sulfato concentración sencilla, agregar 1 de agua sin diluir.
 - A 3 tubos de lauryl sulfato concentración sencilla, agregar 0.1 de agua sin diluir.
 - Incubar los tubos a 35-37°C por 24 a 48 horas.
 - Tomar como positivos los tubos que tengan turbidez y gas.
3. Prueba confirmativa para determinación de coliformes fecales.
 - Realizar el procedimiento de la misma forma que el agua no tratada.
4. Determinación de *Escherichia coli*.
 - Realizar el procedimiento de la misma forma que el agua no tratada.

Análisis bacteriológico del agua de piscina

El agua de piscina se debe considerar como agua potable, por lo tanto, el análisis de mesófilos y coliformes se realiza de la misma forma que el agua tratada, con dos variantes adicionales.

1. A los 100 de muestra se le debe agregar 0.3 de tiosulfato de sodio al 10%.
2. Realizar aislamiento de *Pseudomonas sp.*

Aislamiento de Pseudomonas sp.

Se recomienda incluirlo en el análisis de agua de piscina, por la implicación clínica que pueda tener como agente etiológico de otitis.

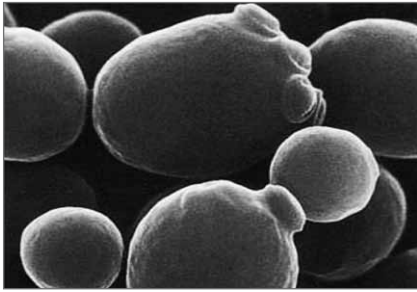
- Sembrar 50 ml de la muestra en 50 ml de caldo Olson.
- Incube a 35 °C durante 24 horas.
- Transfiera dos asadas del caldo agar Cetrimide sembrando en superficie por agotamiento.
- Incube a 37 °C por 24 a 48 horas.
- Informe el aislamiento.

Bibliografía

- APHA, Awwa (1992). *Wpcf. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- CASTRO, F.; GONZÁLEZ, I.A.; RONDÓN, F.; VÉLEZ M. C. (2002). *Manual de prácticas y talleres de Biología General*. Cali, Colombia: Universidad del Valle. Departamento de Biología.
- CUERVO, Raúl (2010). *Manual de microbiología*. Cali, Colombia: Universidad del Valle. Departamento de Biología.
- MERCK, E. (1994). *Manual de medios de cultivos*. Darmstadt, Alemania.
- OXOID (1998). *The Oxoid Manual*. 8th Edition. England.
- BENÍTEZ, Campo (2002). *Manual de Laboratorios de Microbiología*. Cali, Colombia: Universidad del Valle. Departamento de Biología.

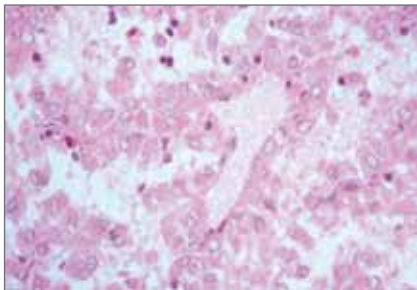
Anexos

Células de levaduras



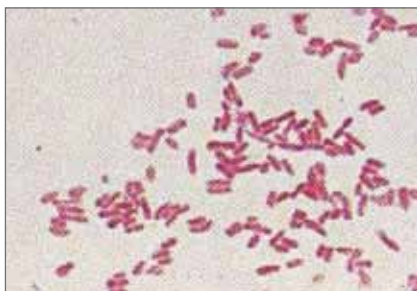
Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://ar.kalipedia>.

Coloración de Cápsula



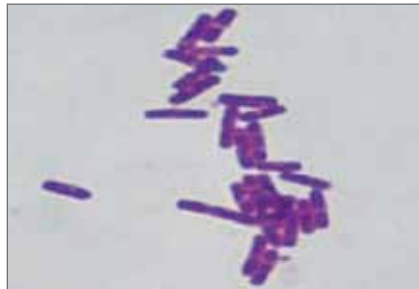
Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://alerce.pntic.mec.es>

Coloración Gram Negativa de Bacilos



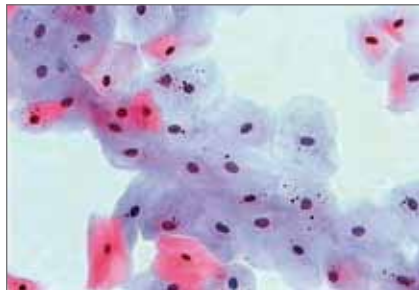
Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://alerce.pntic.mec.es>

Coloración Gram Positiva de Bacilos

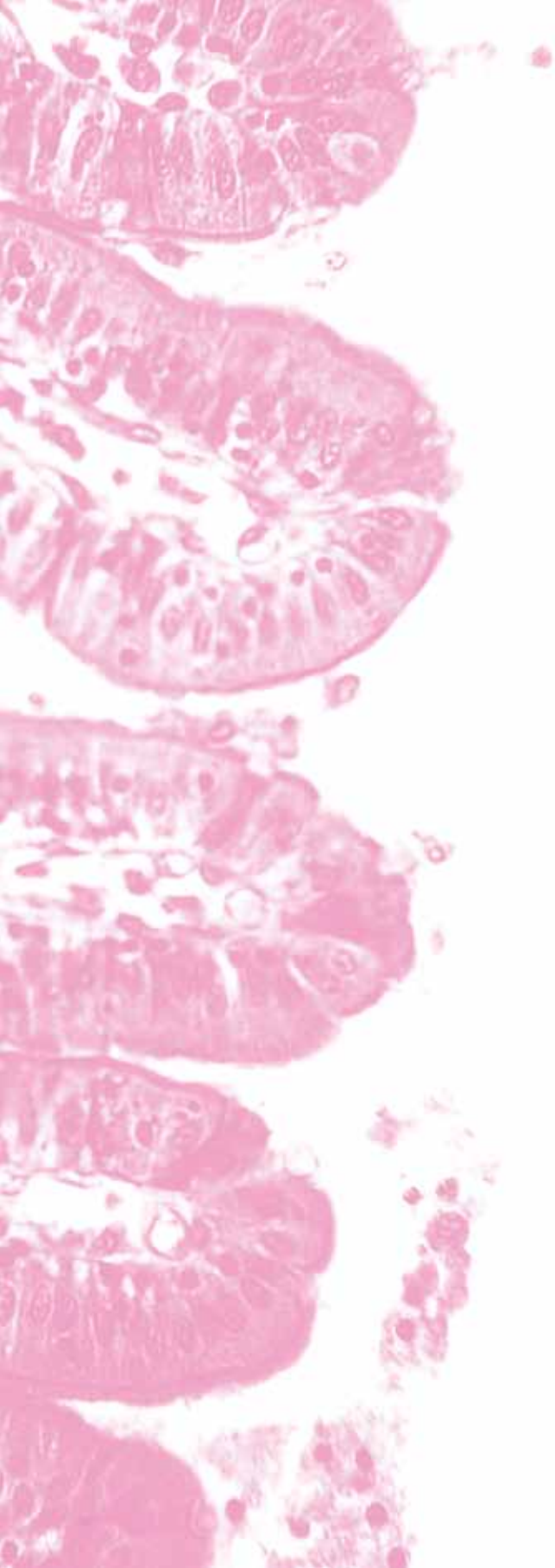


Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://alerce.pntic.mec.es>

Células de mucosa bucal



Tomado de. <http://www.google.com.co/imgres?imgurl=http://alerce.pntic.mec.es>



ISBN: 978-958-8436-46-3



9 789588 436463

La microbiología como rama de la biología y tomada como ciencia básica, incluye el estudio de los organismos biológicos, específicamente microorganismos, cómo reaccionan, sus interacciones con el medio y con otros organismos, y las técnicas comúnmente aplicadas para su investigación. Como ciencia aplicada incluye la microbiología industrial, ambiental y el control biológico. De cada uno de estos aspectos se exponen protocolos de laboratorios que permitan entender de manera sencilla y ágil los fundamentos teóricos de esta ciencia.

Por ello, en este libro se pretende que estudiantes de ingeniería agroindustrial, biología y todos aquellos que de una u otra forma trabajen en el área microbiológica, puedan adquirir los conocimientos básicos en las diferentes técnicas de análisis aplicadas en campo.

Los protocolos expuestos hacen referencia de forma concisa y clara sobre metodologías utilizadas en la industria y los recintos académicos cuyo quehacer diario es la microbiología, ya sea aplicada o básica. La mayoría de estas técnicas se basan en recopilaciones de análisis reconocidos, tanto nacional como internacionalmente, además de guías de laboratorios elaboradas por algunos autores de diferentes universidades.

Universidad de San Buenaventura, seccional Cali.

La Umbria, carretera a Pance

PBX: 318 22 00 - 448 22 22. Fax: 555 20 06

A.A. 7154 y 25162.

www.usbcali.edu.co