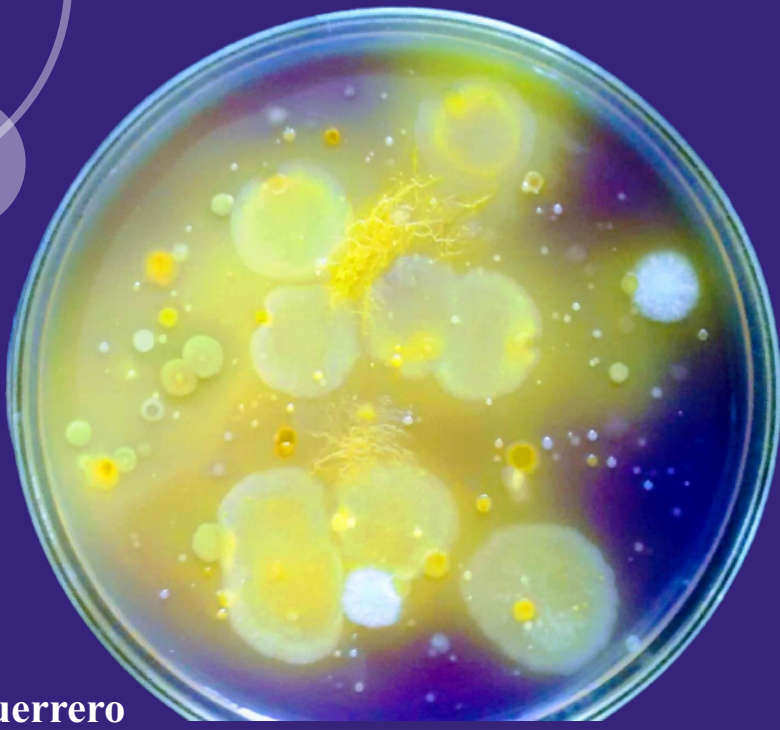
Manual de laboratorio en microbiología general

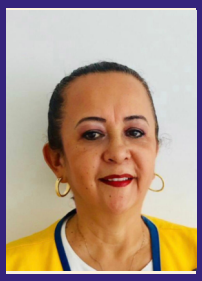


Maryeimy Varón López
Martha Lily Ocampo Guerrero
Julia Esther Gallego Santos
Leidy Adelaida Ángel González
Saira Romero Sánchez
Yeraldine González Sierra
Luis David Becerra Calderón

Universidad del Tolima
ACREDITADA DE ALTA CALIDAD
¡Construimos la universidad que soñamos!

Maryeimy Varón López

Bióloga de la Universidad del Tolima, magíster en Microbiología Agrícola de la Universidad Federal de Lavras y doctora en Ciencias de la Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Docente de planta del Departamento de Biología e investigadora vinculada al grupo de Genética y Biotecnología vegetal y microbiana de la Universidad del Tolima (GEBIUT). Trabaja las áreas de microbiología sanitaria y microbiología agrícola y ambiental, en las que ha dirigido trabajos de grado y generado tanto artículos como libros resultados de investigación.



Martha Lily Ocampo Guerrero

Licenciada en Bacteriología y Laboratorio Clínico, especialista en Microbiología Médica, con experiencia en el control de calidad de aguas y alimentos en la Secretaría de Salud del Tolima. Docente de cátedra del Departamento de Biología e investigadora vinculada al grupo de Genética y Biotecnología vegetal y microbiana de la Universidad del Tolima (GEBIUT). Ha liderado diferentes proyectos de investigación, así como, dirigido trabajos de grado en las áreas de microbiología sanitaria y microbiología ambiental. También posee publicaciones producto de investigación.

Manual de laboratorio en microbiología general

Maryeimy Varón López
Martha Lily Ocampo Guerrero
Julia Esther Gallego Santos
Leidy Adelaida Ángel González
Saira Romero Sánchez
Yeraldine González Sierra
Luis David Becerra Calderón

2023

Manual de laboratorio en microbiología general / Maryeimy Varón López … [et al.] -- 1ª. ed. -- Sello Editorial Universidad del Tolima, 2023.
178 p. : il., tablas
Contenido: Práctica 1: Normas de bioseguridad y equipos más usados en el laboratorio -- Práctica 2: Montaje en fresco y observación de bacterias (tinciones simples y diferenciales) -- Práctica 3: Medios de cultivo (preparación de soluciones) -- Práctica 4: Aislamiento y siembra de microorganismos a partir de diferentes ambientes -- Práctica 5: Pruebas bioquímicas -- Práctica 6: Métodos físicos y químicos para el control del crecimiento bacteriano -- Práctica 7: Cuantificación microbiana -- Práctica 8: Observación y reconocimiento de hongos -- Práctica 9: Bacteriófagos -- Práctica 10: Análisis microbiológico de muestras clínicas hemocultivo, urocultivo y coprocultivo -- Práctica 11: Calidad de agua, aire y alimentos.

ISBN: 978-628-7537-56-9 (PDF)

1. Microbiología – Manuales 2. Biología 3. Laboratorios de microbiología I. Título II. Varón López, Maryeimy III. Ocampo Guerrero, Martha Lily IV. Gallego Santos, Julia Esther V. Ángel González, Leidy Adelaida VI. Romero Sánchez, Saira VII. González Sierra, Yeraldine VIII. Becerra Calderón, Luis David

579.078
M294

© Universidad del Tolima, 2023
© Maryeimy Varón López, Martha Lily Ocampo Guerrero, Julia Esther Gallego Santos, Leidy Adelaida Ángel González, Saira Romero Sánchez, Yeraldine González Sierra, Luis David Becerra Calderón

Manual de laboratorio en microbiología general

Libro seleccionado para publicación mediante Convocatoria 03-2021 del Comité Central de Investigaciones de la Universidad del Tolima

Grupo de Investigación GEBIUT
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Universidad del Tolima

Sello Editorial Universidad del Tolima
Cll. 10 # 6-28, piso 4
editorial@ut.edu.co
Ibagué-Tolima, Colombia

Primera edición: Ibagué-Tolima, 2023

ISBN 978-628-7537-56-9 (PDF)

Coordinación Editorial:
Sello Editorial Universidad del Tolima

Impresión, corrección de estilo y diagramación:
Colors Editores S.A.S., Cra. 6 #11-83
Ibagué, Tolima – Colombia

Impreso y hecho en Colombia

Todos los derechos reservados. Queda prohibida la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio, sin autorización expresa del titular del derecho de autor.

Contenido

Introducción **17**

Práctica 1: Normas de bioseguridad y equipos más usados en el laboratorio **19**

1.1. Objetivo general 19

1.2. Objetivos específicos 19

1.3. Introducción 19

1.3.1. Normas generales para el ingreso y permanencia en el laboratorio 20

1.3.2. Eliminación de materiales contaminados 21

1.3.3. Equipos más usados 22

1.4. Equipo 25

1.5. Insumos y materiales 26

1.6. Procedimiento 26

1.7. Cuestionario 26

Referencias bibliográficas 27

Práctica 2: Montaje en fresco y observación de bacterias (tinciones simples y diferenciales) **29**

2.1. Objetivo general 29

2.2. Objetivos específicos 29

2.3. Introducción 29

2.3.1. Montaje en fresco 29

2.3.2. Tinciones 29

2.4. Equipos 32

2.5. Insumos y materiales 32

2.5.1. Medios y organismos 32

2.6. Procedimiento 32

2.6.1. Montaje en fresco 32
2.6.2. Preparación de frotis bacterianos 34
2.6.3. Tinción simple 35
2.6.4. Tinción de Gram (Figura 2.7.1) 36
2.6.5. Tinción ácido-alcohol resistente o Ziehl-Neelsen 37
2.6.6. Tinción de esporas 38
2.6.7. Tinción de cápsulas o tinción negativa 39
2.6.8. Tinción de flagelos 40
2.7. Resultados 40
2.8. Cuestionario 42
Referencias bibliográficas 43
Práctica 3: Medios de cultivo (preparación de soluciones) 45
3.1. Objetivo general 45
3.2. Objetivos específicos 45
3.3. Introducción 45
3.3.1. Unidades de concentración de soluciones 45
3.3.2. Medios de cultivo y su preparación 46
3.4. Equipos 48
3.5. Insumos y materiales 48
3.6. Procedimiento 48
3.6.1. Preparación de un medio de cultivo sólido 48
3.6.2. Preparación de un medio de cultivo sólido inclinado 49
3.6.3. Preparación de un medio de cultivo líquido 49
3.7. Resultados 50
3.8. Cuestionario 50
Referencias bibliográficas 52
Práctica 4: Aislamiento y siembra de microorganismos a partir de diferentes ambientes 53
4.1. Objetivo general 53
4.2. Objetivos específicos 53
4.3. Introducción 53
4.3.1. Aislamiento 53
4.3.2. Siembra de microorganismos 53
4.4. Equipos 57
4.5. Insumos y materiales 57
4.5.1. Material biológico 58

4.6. Procedimiento 58
4.6.1. Siembra de una muestra líquida y sólida en un medio líquido, mediante la técnica de mezcla o emulsión 58
4.6.2. Siembra de una muestra líquida en un medio sólido mediante la técnica de raya 58
4.6.3. Siembra de una muestra sólida en medio sólido mediante la técnica de estría 59
4.6.4. Siembra mediante la técnica de agotamiento o estría múltiple 60
4.6.5. Siembra mediante la técnica masiva o en película 61
4.6.6. Siembra en medio sólido inclinado mediante la técnica de estría 62
4.6.7. Siembra mixta en medio sólido inclinado 63
4.6.8. Siembra del catéter mediante la técnica de MAKI 64
4.7. Ambientes de muestreo 65
4.7.1. Siembra de microorganismos de la garganta y la piel 65
4.7.2. Procedimiento para tomar la muestra de garganta 65
4.7.3. Procedimiento para tomar la muestra de piel 66
4.7.4. Selección y diferenciación de aislamientos de garganta y piel 66
4.7.5. Tinción y características morfológicas de los aislados de garganta y piel 66
4.7.6. Siembra por medio de la técnica de filtración por membrana 67
4.8. Resultados 69
4.9. Cuestionario 71
Referencias bibliográficas 73
Práctica 5: Pruebas bioquímicas **75**
5.1. Objetivo general 75
5.2. Objetivos específicos 75
5.3. Introducción 75
5.4. Pruebas bioquímicas para Gram positivas 76
5.4.1. Equipos 84
5.4.2. Insumos y materiales 84
5.4.3. Procedimiento 84
5.4.4. Resultados 86
5.4.5. Cuestionario 86
Referencias bibliográficas 87
5.5. Pruebas bioquímicas para bacterias Gram negativas 88
5.5.1. Insumos y materiales 100

5.5.2. Equipos 100
5.5.3. Procedimiento 100
5.5.4. Resultados 133
5.5.5. Cuestionario 103
Referencias bibliográficas 104
Práctica 6: Métodos físicos y químicos para el control del crecimiento bacteriano 105
6.1. Objetivo general 105
6.2. Objetivos específicos 105
6.3. Introducción 105
6.4. Equipos 111
6.5. Insumos y materiales 111
6.5.1. Medios y organismos 111
6.6. Resultados 114
6.7. Cuestionario 117
Referencias bibliográficas 118
Práctica 7: Cuantificación microbiana 119
7.1. Objetivo general 119
7.2. Objetivo específico 119
7.3. Introducción 119
7.4. Equipos 122
7.5. Insumos y materiales 122
7.6. Medios y microorganismos 122
7.7. Procedimiento 122
7.7.1. Diluciones seriadas para recuento en placa (Figura 7.2) 122
7.7.2. Siembra en profundidad (Figura 7.2) 123
7.7.3. Siembra en superficie 123
7.7.4. Número más probable (Figura 7.3) 123
7.7.5. Cámara de Neubauer 124
7.7.6. Turbidimetría 124
7.8. Resultados 125
7.8.1. Número Más Probable (NMP) 125
7.8.2. Recuento en placa 125
7.8.3. Cámara de Neubauer 125
7.9. Cuestionario 125

Referencias bibliográficas 126

Práctica 8: Observación y reconocimiento de hongos **127**

8.1. Objetivo general 127

8.2. Objetivos específicos 127

8.3. Introducción 127

8.3.1. Los hongos: su relevancia médica y económica 133

8.4. Equipos 134

8.5. Insumos y materiales 134

8.5.1. Medios y organismos 134

8.6. Estudio de mohos 134

8.6.1. Montaje directo para mohos y levaduras 134

8.6.2. Impronta 134

8.6.3. Aislamiento por punción inversa 135

8.6.4. Microcultivo 135

8.7. Procedimiento 137

8.8. Resultados 138

8.8.1. Montaje directo, impronta y siembra invertida 138

8.9. Cuestionario 139

Referencias bibliográficas 140

Práctica 9: Bacteriófagos **143**

9.1. Objetivo general 143

9.2. Objetivos específicos 143

9.3. Introducción 143

9.3.1. Estructura viral 144

9.3.2. Replicación vírica 144

9.3.3. El ciclo lítico 144

9.3.4. Bacteriófagos Lambda (λ): ciclo lisogénico 145

9.4. Equipos 145

9.5. Insumos y materiales 145

9.6. Procedimiento 145

9.7. Resultados 147

9.8. Cuestionario 148

Referencias bibliográficas 150

Práctica 10: Análisis microbiológico de muestras clínicas hemocultivo, urocultivo y coprocultivo **151**

10.1. Objetivo general 151

10.2. Objetivo específico 151

10.3. Introducción 151

10.3.1. Hemocultivo 151

10.3.2. Urocultivo 151

10.3.3. Coprocultivo 152

10.4. Insumos y materiales 152

10.5. Procedimiento 153

10.6. Resultados 155

10.7. Cuestionario 156

Referencias bibliográficas 157

Práctica 11: Calidad de agua, aire y alimentos **159**

11.1. Objetivo general 159

11.2. Objetivos específicos 159

11.3. Introducción 159

11.3.1. Calidad de agua 159

11.3.2. Indicadores de contaminación fecal en aguas 160

11.3.3. Bacterias 161

11.3.4. Virus 162

11.3.5. Parásitos 162

11.3.6. Método de filtración por membrana 163

11.3.7. Alimentos 163

11.4. Número Más Probable (NMP) para aguas 164

11.4.1. Equipos 164

11.4.2. Insumos y materiales 164

11.4.3. Medios de cultivo 164

11.4.4. Procedimiento 165

11.5. Alimentos y agua envasada 167

11.5.1. Equipos 168

11.5.2. Insumos y materiales 168

11.5.3. Medios y microorganismos 168

11.5.4. Procedimiento 168

11.6. Aire 173

11.6.1. Métodos de muestreo 173
11.6.2. Equipos 173
11.6.3. Insumos y materiales 173
11.6.4. Procedimiento 173
11.7. Resultados 174
11.8. Cuestionario 176
Referencias bibliográficas 178

Lista de figuras

Figura 1.1. El microscopio y sus partes. **22**

Figura 2.1. Obtención y observación de glóbulos rojos; ST: Sólidos Totales. **33**

Figura 2.2. Montaje y observación de una suspensión de levaduras. **33**

Figura 2.3. *Procedimiento para la lectura química y observación microscópica de un parcial de orina.* **34**

Figura 2.4. Observación montaje en fresco de flujo vaginal. **34**

Figura 2.5. Preparación de frotis bacterianos. **35**

Figura 2.6. Procedimiento realizado para la preparación de una tinción simple, para la observación de bacterias. **36**

Figura 2.7.1. Procedimiento parar realizar la tinción de Gram, donde se muestran los pasos y tiempos necesarios de cada colorante. **L:** Lavar; **E:** Escurrir. **36**

Figura 2.7.2. Observación de bacterias Gram negativas. **37**

Figura 2.7.3. Observación de bacterias Gram positivas. **37**

Figura 2.8.1. Procedimiento para la realización de la tinción. L: Lavar; E: Escurrir **37**

Figura 2.8.2. Observación de la tinción ácido-alcohol resistente, las bacterias azules corresponde a *S. aureus* y las rosadas a *Mycobacterium.* **38**

Figura 2.9.1. Procedimiento para la realización de la tinción de endoesporas. L: Lavar; E: Escurrir. **38**

Figura 2.9.2. Observación de endosporas de *Bacillus sp.* El color verde corresponde a la endospora y el rosado a las células vegetativas. **39**

Figura 2.10.1. Procedimiento para la realización de la tinción negativa, para la observación de cápsulas. **39**

Figura 2.10.2. Observación de cápsula de la bacteria *Klebsiella sp.* **40**

Figura 3.1. Pasos para la preparación de un medio de cultivo sólido. **49**

Figura 3.2. Pasos para la preparación de un medio de cultivo sólido inclinado y líquido. **50**

Figura 4.1. Técnicas de siembra. **A:** Siembra en raya. **B:** Siembra por estría con división de la caja de Petri en cuatro cuadrantes. **C:** Siembra en estría. **59**

Figura 4.2. Técnica de siembra por agotamiento, donde se describe paso a paso como debe realizarse, para tener colonia aisladas. **61**

Figura 4.3. Técnica de siembra masiva o en película. Paso a paso para realizar un antibiograma**.** **62**

Figura 4.4. *S*iembra en tubo. **A***:* En medio sólido inclinado por estría*.* **B:** En medio semisólido por punción. **C:** Siembra mixta, donde se realiza primero la punción y luego una siembra por estría. **64**

Figura 4.5. Siembra del catéter mediante la técnica de MAKI. **65**

Figura 4.6. Siembra de microorganismos **A:** Muestra de la garganta. **B:** Muestra de la piel **67**

Figura 4.7. Técnica de siembra por filtración de membrana en diferentes agares*.* **68**

Figura 4.8. Resultados obtenidos a partir de los distintos tipos de siembra. **69**

Figura 5.1. Coagulasa. La flecha indica un resultado positivo para *Staphylococcus aureus*. **77**

Figura 5.2. Novobiocina. La presencia del halo indica sensibilidad de *Staphylococcus epidermidis* al antibiótico. **77**

Figura 5.3. Agar sangre, Flora Nasofaríngea. En las zonas marcadas se presentan las hemolisis **A:** Gamma, **B:** Alfa *y* **C:** Beta **78**

Figura 5.4. Agar chocolate Flora Nasofaríngea*.* Se observa utilización del HEM. **78**

Figura 5.5. Agar Baird Parker. Colonias *Staphylococcus aureus* que reducen el telurito de potasio y presentan actividad lipolítica*.* **79**

Figura 5.6. Reacción de la fermentación del manitol. **80**

Figura 5.7. Agar Salado Manitol. **A:** *Staphylococcus spp* no fermenta manitol. **B:** *Staphylococcus aureus* fermentando manitol. **80**

Figura 5.8. *Reacción de la hidrólisis del ADN.* **81**

Figura 5.9. Agar DNA después de adicionar el ácido clorhídrico, resultado negativo (a) y positivo b). **81**

Figura 5.10. Sulfito Polimixina y Sulfadiazina (SPS). **A:** No hay presencia de endosporas de clostridium sulfito reductores. **B:** Presencia de una colonia. **C:** Clostridium sulfito reductores positivo. **82**

Figura 5.11. Prueba de oxidasa. El color púrpura que se observa en la figura evidencia que el resultado de esta prueba fue positivo. **88**

Figura 5.12. Agar EMB*.* **A:** *E. coli.* Se observa un brillo verde metálico característico de este organismo. **B:** *Klebsiella.* Se observa colonias grandes de color negro azulado. **89**

Figura 5.13. Base de Agar ENDO*.* **A:** *E. coli.* Presenta colonias moradas con brillo metálico. **B:** Muestra fecal. Se evidencia el crecimiento de organismos. **90**

Figura 5.14. Agar MacConkey. **A:** *E. coli. Se observan colonias rosadas.* **B:***Klebsiella.* Colonias mucoides de color rosado. **91**

Figura 5.15. Agar cetrimide. *Pseudomona chlororaphis.* Colonias con fluorescencia bajo luz UV de 3 a 15W. **92**

Figura 5.16. Caldo asparagina. *Pseudomona sp.* Se observa turbidez y fluorescencia bajo luz UV. **92**

Figura 5.17. Agar xilosa lisina desoxicolato. **A:** *E. coli.* Organismo fermentador de xilosa con colonias amarillas. **B:** *Salmonella infantis.* Organismo no fementador de xilosa y productor de H_2S con colonias rojas y centros negros. **93**

Figura 5.18. Agar SS. **A:** *E. coli.* **B:** *Salmonella infantis.* **94**

Figura 5.19. Agar TSI. Fotografía tomada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Tolima. GEBIUT. Microorganismo no fermentador de glucosa y lactosa **(A),** microorganismo fermentador anaerobio **(B)**, microorganismos fermentador facultativo, fermenta en aerobiosis lactosa y en anaerobios glucosa **(C).** **95**

Figura 5.20. Reacción de indol con el reactivo de Kovacs. **96**

Figura 5.21. Medio SIM. Microorganismo con motilidad e indol positivo (A), microorganismo motilidad e indol negativo **(B)**. **A:** *E. coli.* **B:** *Proteus.* **96**

Figura 5.22. Hidrólisis de la urea. **97**

Figura 5.23. Medio urea. Resultado Negativo **A)**, el medio no vira de color: Resultado Positivo **B)**, el medio toma un color morado más intenso, ejemplos de *Proteus sp* y *Klebsiella sp.* **97**

Figura 5.24. Agar LIA. Descarboxilación positiva **A)** y **C)**, Desaminación positiva, parte superior vino tinto e inferior fermentación de la glucosa **B)**, Descarboxilación negativa **(D)**. **98**

Figura 5.25. Simmons citrato. **A:** Resultado Negativo, no hay cambio de color en el medio, sin embargo se observa crecimiento **B:** Resultado Positivo, una parte del medio se tornó azul rey. **99**

Figura 5.26. Química del citrato. **99**

Figura 5.27. Agar TCBS. Medio inoculado con muestra fecal, no se observó crecimiento después de 24 horas. **100**

Figura 6.1. Espectro de la actividad de los antibióticos. **106**

Figura 6.2. Espectro de la actividad de los antibióticos. **110**

Figura 6.3. Metodología para evaluar agentes físicos y químicos en el control del crecimiento bacteriano. **114**

Figura 6.4. Observación y presentación de los halos inhibitorios. **116**

Figura 7.1. Cámara de Neubauer. **A.** Campo 10x, observación del retículo completo. **B.** Campo 40x, ampliación de una cuadrícula del retículo completo (Área de conteo). **121**

Figura 7.2. *R*ecuento en placa. Esquema experimental de los métodos de siembra. **1.** En profundidad. **2.** En superficie. **123**

Figura 7.3. Técnica del Número Más Probable (NMP). Primera fase para la determinación y análisis microbiológico de diferentes muestras. **124**

Figura 8.1. Árbol filogenético que muestra la diversidad y las relaciones dentro del reino fungi a partir de métodos de secuenciamiento molecular . **129**

Figura 8.2. Desarrollo de mohos cultivados por punción inversa. **135**

Figura 8.3. Montaje de los elementos utilizados para el microcultivo de mohos. **136**

Figura 8.4. Metodología a seguir para el montaje, tinción, observación e identificación de mohos. **1.** Siembra con el medio invertido. **2.** Microcultivo. **3.** Montaje directo. **4.** Impronta. **137**

Figura 9.1 Metodología para el aislamiento y reconocimiento de fagos. **147**

Figura 9.2. Experimento donde se utilizaron soluciones con fagos. **149**

Figura 10.1. Pasos para el hemocultivo. **153**

Figura 10.2. Paso a paso de la siembra de un urocultivo. **154**

Figura 10.3. Paso a paso toma coprocultivo. **155**

Figura 10.4. Resultado hemocultivo. **A:** Negativo. **B:** Positivo. **C:** Control positivo para el caldo (BHI) y negativo para hemocultivo. **155**

Figura 11.1. Metodología para hallar el número más probable en aguas. **A:** Prueba presuntiva. **B:** Prueba confirmativa. **C:** Test de Mackenzie. **166**

Figura 11.2. Primera parte: metodología para hallar el número más probable en alimentos y agua envasada. **A:** Prueba presuntiva. **B:** Prueba confirmativa. **C:** Test de Mackenzie. **170**

Figura 11.3. Segunda parte metodología para hallar el número más probable en alimentos y agua envasada. **A:** Recuento de mesófilos. **B:** Recuento de mohos y levaduras. **C:** Recuento de esporas CSR. **172**

Figura 11.4. Metodología para determinar la calidad del aire. **173**

Lista de tablas

Tabla 2.1. Reporte de resultados obtenidos en los distintos tipos de tinción de microorganismos. 40

Tabla 4.1. Tipos de siembra. Explicación de los tipos de siembra más común en microbiología. 54

Tabla 4.2. Tipo de siembra según el medio. 57

Tabla 4.3. Siembra de microorganismos de la garganta y de la piel. 70

Tabla 4.4. Tinción y características morfológicas de los aislados de piel y garganta. 70

Tabla 4.5. Información de apoyo para describir los resultados obtenidos en cada uno de los medios de cultivo realizados. 71

Tabla 5.1. Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas. 83

Tabla 5.2. Resultados pruebas bioquímicas para Gram. 86

Tabla 5.3. Pruebas bioquímicas Enterobacteria. 102

Tabla 5.4. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas principales de bacterias Gram negativas. 103

Tabla 6.1. Acción molecular de algunos agentes químicos sobre las estructuras y funciones bacterianas. 106

Tabla 6.2. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de temperatura y exposición UV. 115

Tabla 6.3. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de temperatura y exposición UV. 115

Tabla 6.4. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de antibiograma. 115

Tabla 6.5. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas. 116

Tabla 7.1. Fórmula para la preparación de escala de McFarland. 122

Tabla 8.1. Condiciones ambientales promedio requeridas por los hongos. 128

Tabla 8.2. Características microscópicas, macroscópicas y especies comunes de los siete filos de hongos. 132

Tabla 8.3. Infecciones fúngicas de mayor relevancia para los humanos. 133

Tabla 8.4. Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de hongos de montaje directo, impronta y siembra invertida. 138

Tabla 9.1. Reporte de resultados del experimento con fagos. 149

Tabla 11.1. Tabla de NMP por 100 ml para agua y alimentos. Series de tres tubos. 167

Tabla 11.2. Reporte de resultados obtenidos de la prueba presuntiva. 174

Tabla 11.3. Reporte de resultados obtenidos de la prueba confirmada. 175

Tabla 11.4. Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos. 175

Tabla 11.5. Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos procesados 176

Tabla 11.6. Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos. 176

Tabla 11.7. Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos. 177

Introducción

La microbiología es una ciencia maravillosa que estudia un mundo microscópico, con unas características inigualables que, aún si se observarse a simple vista, si podemos disfrutar de todos sus beneficios y claro, también de sus efectos perjudiciales. Los microbios son un grupo diverso, en morfología, metabolismo y distribución. Pueden ser encontrados en el agua, aire, suelo, dentro y fuera de todos los organismos, cumpliendo una amplia gama de funciones vitales para el equilibrio de todos los ecosistemas. Sin ellos no existiría la vida que conocemos.

Es por esto que este *Manual de laboratorio en microbiología general* fue creado y dirigido a estudiantes y docentes, quienes estén desarrollando un curso de Microbiología o áreas afines. Este es el resultado de un trabajo realizado de manera colectiva entre docentes y estudiantes, donde se recoge la experiencia, tanto académica como investigativa, adquirida en el ejercicio profesional de las docentes y el interés de los estudiantes en mejorar su formación; cuya finalidad es tener un documento que sea de uso trasversal en diferentes programas, lo que ayudará a unificar conceptos basados en los estándares usados en Microbiología y ajustados a las condiciones de los laboratorios de docencia.

El manual consta de 11 prácticas en las que se incluyen elementos teóricos y prácticos. Inicia con las normas básicas y de bioseguridad que se deben cumplir dentro del laboratorio, a continuación de esto se describen los procedimientos necesarios para aislar, caracterizar e identificar bacterias, hongos y virus, resaltando su importancia en la calidad del aire, aguas, suelo y alimentos. También, se identifican los agentes patógenos en las infecciones más frecuentes.

Adicionalmente, este manual está diseñado de forma didáctica con imágenes, fotos y videos explicativos que ayudarán a mejorar la comprensión y aplicación de las técnicas específicas usadas en los diferentes programas en los que se orienta esta cátedra para, de este modo, contribuir a mejorar las destrezas en el desarrollo de la praxis y su aplicación en el ejercicio profesional e investigativo.

Práctica 1.

Normas de bioseguridad y equipos más usados en el laboratorio

1.1 Objetivo general

Conocer los protocolos de bioseguridad de un laboratorio de microbiología, los posibles riesgos, accidentes y cómo actuar frente a ellos.

1.2 Objetivos específicos

- Establecer la relación entre los diferentes niveles de bioseguridad en el laboratorio y los microorganismos asociados.
- Adquirir destreza en el uso y funcionamiento de los equipos y materiales más usados en el laboratorio de microbiología.
- Identificar las rutas de evacuación y eliminación de residuos para evitar la contaminación ambiental.

1.3 Introducción

Estar en un laboratorio de microbiología puede ser una experiencia enriquecedora y emocionante si se siguen correctamente las normas de bioseguridad para evitar accidentes o contaminación por microorganismos de fuentes exógenas. La manipulación inadecuada de productos químicos, equipos y/o cultivos microbianos, es peligrosa y puede provocar lesiones o infecciones, por lo tanto, el entorno siempre debe estar limpio con las técnicas de asepsia adecuadas (Leboffe y Pierce, 2016).

Aunque la virulencia de los microorganismos utilizados en el entorno de los laboratorios académicos se ha reducido considerablemente, debido a su mantenimiento a largo plazo en medios artificiales, todos los microorganismos deben tratarse como patógenos potenciales de producir enfermedades (Cappuccino y Welsh, 2019).

Por lo tanto, deben manipularse de manera segura para evitar poner en riesgo el personal dentro y fuera del laboratorio, así como el medioambiente.

Existen cuatro grupos de riesgo de bioseguridad para clasificar el riesgo potencial de los microorganismos (Brown y Smith, 2017; Kaufman, 2020), a continuación se describen los lineamientos para las prácticas, instalaciones y equipo de laboratorio a usar según esta clasificación:

- **Grupo de riesgo 1:** (riesgo individual y poblacional escaso o nulo), microorganismos que tienen poca posibilidad de ocasionar enfermedades en el hombre y animales; de acuerdo con esto puede manejarse en **Laboratorio de nivel de bioseguridad I o Básico** y se usa en

enseñanza básica e investigación. Estos microbios pueden manipularse al aire libre y no se requiere equipos especiales de contención.

- **Grupo de riesgo 2:** (riesgo individual moderado y poblacional bajo), microorganismos que si causan enfermedades en el hombre y animales, pero poca probabilidad de ocasionar daño al personal de laboratorio, al ganado o al ambiente, la exposición si puede causar infección, pero deben mantenerse medidas de protección, por lo tanto, se debe manejar en **Laboratorio de nivel de bioseguridad II Básico,** el cual se usa para protección primaria, diagnóstico e investigación. Los microorganismos se trabajan al aire libre, pero si hay probabilidad de aerosoles se debe usar cámara de seguridad biológica.

- **Grupo de riesgo 3:** (riesgo individual elevado y poblacional bajo), microorganismos que provocan enfermedades en el hombre y animales, graves, pero con poca probabilidad de propagarse de un individuo a otro, deben mantenerse medidas de prevención, por lo tanto, debe manejarse en **Laboratorio de nivel de bioseguridad III Contención,** el cual se usa para diagnóstico especial e investigación. Siempre se debe usar cámara de bioseguridad biológica y medios de protección primaria en todas las actividades.

- **Grupo de riesgo 4:** (riesgo individual y poblacional elevado), microorganismos que provocan enfermedades graves en el hombre y animales, se trasmiten fácilmente de un individuo a otro de forma directa o indirecta, normalmente las medidas de protección y terapéuticas no son eficaces, por lo tanto, se debe manejar en **Laboratorio de nivel de bioseguridad IV Contención Máxima,** el cual se usa en unidades de patógenos peligrosos. Siempre se debe usar cámara de seguridad biológica III, autoclaves, aire filtrado y trajes presurizados para los operarios.

1.3.1. Normas generales para el ingreso y permanencia en el laboratorio

Durante la estancia en el laboratorio se deben aplicar normas, que permitan evitar accidentes y poner en riesgo el personal o el medioambiente (Brown y Smith, 2017; Leboffe y Pierce, 2016; Rojas-Triviño, 2011).

- Al ingresar al laboratorio, coloque abrigos, libros, bolsos y demás en el gabinete dispuesto, nunca en mesones de trabajo, a estos solo se llevará lo necesario para el procedimiento y lo demás debe ir en el sitio dispuesto para útiles escolares.

- Lávese las manos correctamente, use detergente líquido y séquese con toallas de papel, este procedimiento debe realizarse al llegar, y antes de salir del laboratorio, también cuando se ha estado en contacto con algún fluido corporal.

- Recójase el cabello, use pantalón largo, zapatos cerrados, bata de laboratorio, cofias, gafas y tapabocas. Cuando esté a punto de empezar la práctica colóquese guantes.

- Mantenga las puertas y ventanas cerradas durante la sesión de laboratorio, para evitar la contaminación de los medios de cultivo por corrientes de aire.

- Al comienzo y al final de cada sesión de laboratorio, limpie los mesones con una solución desinfectante de hipoclorito de 5000 ppm, deje secar hasta que se evapore.

- No coloque instrumentos contaminados, como asas de inoculación, agujas y pipetas, sobre las mesas de trabajo. Las asas y las agujas deben esterilizarse mediante incineración y las pipetas desechables deben desecharse en los recipientes designados.

- Al finalizar la sesión de laboratorio, coloque todos los cultivos y materiales en el área de eliminación designada.

- Se requiere una manipulación rápida y eficaz de los cultivos de hongos para evitar la diseminación de sus esporas reproductivas en el entorno del laboratorio.
- Mantenga los tubos de ensayo siempre en una gradilla, tanto en el mesón como para su transporte, así evita accidentes y contaminación del medioambiente.
- Nunca retire medios, equipos o especialmente cultivos microbianos del laboratorio. Hacerlo está absolutamente prohibido.
- En caso de presentarse derrame de un medio de cultivo o fluido corporal, cubra inmediatamente los cultivos derramados o los tubos de cultivo rotos con toallas de papel y, luego, satúrelos con una solución desinfectante de hipoclorito de 5000 ppm. Después de 15 minutos de tiempo de reacción, retire las toallas y deséchelas de la manera indicada por el personal de laboratorio.
- Informe inmediatamente al personal de laboratorio sobre cortes o quemaduras accidentales.
- Nunca pipetee con la boca ningún reactivo químico. Hacerlo está estrictamente prohibido. El pipeteado debe realizarse únicamente con la ayuda de un dispositivo de pipeteo mecánico o digital.
- Para identificar los medios de cultivo utilice marcador permanente, cinta de enmascarar o de preferencia etiquetas autoadhesivas.
- Hable en voz baja y evite movimientos innecesarios por el laboratorio para evitar distracciones que puedan provocar accidentes.
- Nunca se aplique cosméticos o coloque sus lentes de contacto en el laboratorio, no fume, coma ni beba en el laboratorio. Estas actividades están absolutamente prohibidas.
- Se debe leer el manual con anterioridad y resolver inquietudes que se tengan antes de iniciar el desarrollo de la práctica, para evitar contaminación de los medios por partículas de saliva que puedan alterar los resultados.

1.3.2 Eliminación de materiales contaminados

Seguir las normas para la disposición de los residuos de origen biológico y químico establecidas en el Programa de Gestión Integral de Residuos Hospitalarios (PGIR) para laboratorios de docencias en microbiología.

En la mayoría de los casos el método preferido, para descontaminar los desechos microbiológicos, fluidos corporales y el equipo reutilizable, es la autoclave (Porres y Ruiz, 2018; Vega et al., 2017), para esto siga todos los pasos como se muestra a continuación:

1. Retire todas las etiquetas o marcas de los tubos o cajas de Petri, frascos de medios de cultivo, etc. Llévelos al autoclave de material contaminado por 1 hora a 121 °C, a 15Lb de presión.
2. Después de autoclavado, deje enfriar este material y otros elementos; en bolsas, posteriormente, lleve a la disposición final institucional (normalmente es en bolsa roja para residuos peligrosos).
3. Deseche todas las muestras de hemoderivados en el recipiente designado para inactivación y posterior esterilización en autoclave.
4. Coloque los portaobjetos usados que contengan muestras en un recipiente para objetos punzantes, para esterilización en autoclave, o sumérjalos en una solución desinfectante

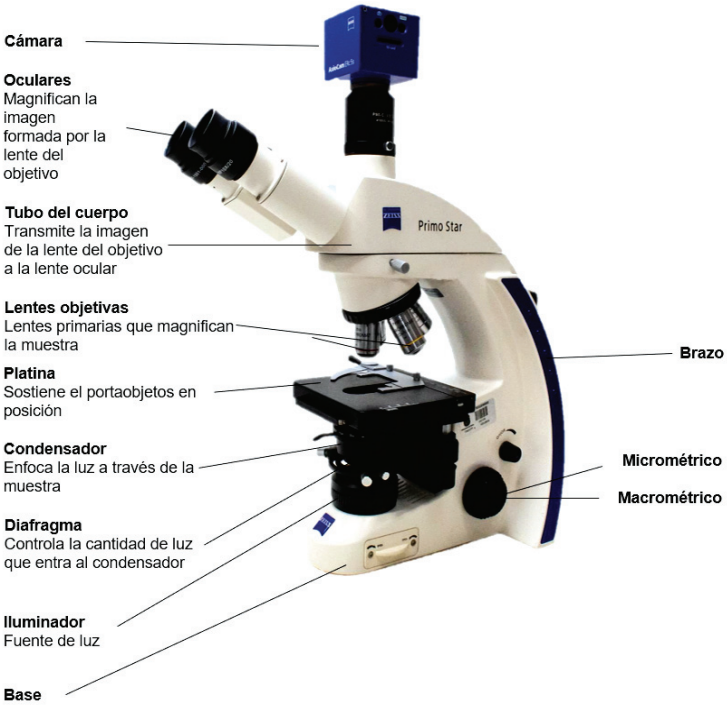
durante al menos 30 minutos antes de limpiarlos o desecharlos. Siga las pautas de su laboratorio para desechar el vidrio.

5. Coloque los vidrios rotos contaminados y otros objetos afilados (cualquier cosa que pueda perforar una bolsa) en un recipiente para objetos punzantes para esterilización en autoclave. El vidrio roto no contaminado no debe esterilizarse en autoclave, pero deben eliminarse en un recipiente específico.

1.3.3 Equipos más usados

- **Microscopio** El uso del microscopio óptico es fundamental para el laboratorio de microbiología, ya que la mayoría de los agentes infecciosos no son perceptibles a simple vista. El microscopio óptico utiliza luz visible para observar las muestras, la luz pasa a través de estas y posteriormente, atraviesa varias lentes de aumento, generando una imagen mucho mayor a la de la muestra, el aumento total alcanzado depende de las lentes utilizadas **(Figura 1.1)** (Porres y Ruiz, 2018). Además, es necesario la ayuda de las diferentes técnicas de tinción para que se puedan observar a detalle y tratar de identificar y clasificar los agentes etiológicos de una manera rápida y relativamente sencilla.

Figura 1.1. *El microscopio y sus partes.*



Fuente: Autores (2023).

La mayoría de los microscopios utilizados en microbiología tienen varias lentes de objetivo, incluidas 10X (baja potencia), 40X (alta potencia) y 100X (inmersión en aceite), la mayoría de las lentes oculares magnifican las muestras en un factor de 10, al multiplicar la ampliación de una lente de objetivo específica por la del ocular, se evidencia que las ampliaciones totales serían 100X para baja potencia, 400X para alta potencia y 1000X para aceite de inmersión (Tortora et al., 2019).

Cada estudiante será responsable del cuidado y uso adecuado del microscopio, para proteger el equipo se deben seguir los siguientes procedimientos (Cappuccino y Welsh, 2019):

Los microscopios están almacenados en armarios especiales y los usuarios deben trasladarlos a sus mesas de laboratorio, la forma correcta y aceptable de hacer esto es agarrar el brazo del microscopio firmemente con la mano derecha y la base con la mano izquierda, y levantar el microscopio del estante del gabinete, llévelo cerca del cuerpo y colóquelo suavemente sobre la mesa de laboratorio, esto evitará la colisión con muebles o compañeros de trabajo, y lo protegerá contra daños y desajustes.

1. Previamente retire todos los materiales innecesarios (como libros, papeles, carteras) de la mesa del laboratorio.
2. Desenrolle el cable eléctrico del microscopio y conéctelo a un tomacorriente.
3. Limpiar todos los sistemas de lentes; la menor cantidad de polvo, aceite, pelusa o pestañas disminuirá la eficiencia del microscopio, las lentes oculares, de escaneo, de baja potencia 4X, 10X y de alta potencia 40X, se pueden limpiar inicialmente soplando con una pera de succión y, posteriormente, frotando varias veces con un paño para lentes o papel de arroz, nunca use toallas de papel o trapos sobre la superficie de una lente, si la lente de inmersión en aceite está pegajosa, se usa un trozo de papel para lentes humedecido con xilol o alcohol isopropílico para limpiarla, el xilol se elimina inmediatamente con un pañuelo humedecido con alcohol al 95% y la lente se seca con papel para lentes.

Nota: este procedimiento de limpieza con xilol solo debe realizarlo el laboratorista y solo si es necesario; el uso constante de xilol puede aflojar la lente.

Se deben seguir los siguientes pasos de rutina para la observación al microscopio y, de esta manera, garantizar su uso correcto y eficiente (Cappuccino y Welsh, 2019).

1. Coloque el portaobjetos dentro de los clips de la platina, mueva el portaobjetos para centrar la muestra directamente sobre la fuente de luz para facilitar el enfoque.
2. Mueva el carro (donde se encuentra la platina), usando el tornillo macrométrico del microscopio, tanto como sea posible, gire el objetivo de 4X a su posición y ajuste con este mismo tornillo mientras mira a través de la lente ocular.
3. Mientras mira a través de la lente ocular, ajuste el micrométrico, girándolo ligeramente hacia adelante y hacia atrás, para enfocar la muestra con nitidez.
4. Ajuste el condensador hasta tener un mejor enfoque.
5. Ajuste la intensidad de la luz mediante el condensador y/o el diafragma.
6. La mayoría de los microscopios son parafocales, lo que significa que cuando una lente está enfocada, otras lentes también tendrán la misma distancia focal y se pueden girar a su posición sin mayores ajustes, en la práctica normalmente se necesita media vuelta del micrométrico en cualquier dirección para un enfoque nítido.
7. Una vez que haya enfocado la muestra con nitidez con el objetivo 40X, se pueden hacer los preparativos para visualizar la muestra con aceite de inmersión, coloque una gota de aceite en el portaobjetos directamente sobre el área a visualizar, gire el revólver hasta que el objetivo de inmersión encaje en su posición.

Nota: se debe tener cuidado de no permitir que el objetivo de alta potencia (40X) toque la gota de aceite, la muestra se observa desde un lado mientras el objetivo de 100X se gira lentamente hacia su posición, esto asegurará que el objetivo se sumerja correctamente en el aceite, el micrométrico se reajusta para enfocar la imagen con nitidez.

8. Durante el examen microscópico de los microorganismos, siempre es necesario observar varias áreas de la preparación, esto se logra escaneando el portaobjetos.

Nota: esto requerirá ajustes continuos y muy finos mediante la rotación lenta hacia adelante y hacia atrás del micrométrico.

9. Al finalizar el ejercicio de laboratorio, devuelva el microscopio a su gabinete en su estado original. Se recomiendan los siguientes pasos:

- Limpie todas las lentes con papel limpio y seco para lentes.

Nota: utilice xilol o alcohol isopropílico para eliminar el aceite del escenario únicamente. Coloque el objetivo de baja potencia en posición y baje la platina.

- **Autoclave.** Las altas temperaturas destruyen las enzimas celulares que se desnaturalizan de forma irreversible. La aplicación de calor es un medio común de destruir microorganismos, tanto el calor seco como el húmedo son eficaces, sin embargo, el calor húmedo provoca la coagulación de las proteínas, mata las células más rápidamente y a temperaturas más bajas que el calor seco, por esto, en la esterilización se destruyen todas las formas de vida, se realiza en 15 minutos a 121 °C con calor húmedo (vapor) a presión; el calor seco requiere una temperatura de 160 °C a 180 °C durante 1 1⁄2 a 3 horas, como los microorganismos presentan diferencias en su resistencia al calor húmedo, las esporas bacterianas requieren temperaturas superiores a 100 ° C para su destrucción, mientras que la mayoría de las células vegetativas bacterianas mueren a temperaturas de 60 ° C a 70 ° C en 10 minutos, los hongos se pueden matar a una temperatura de 50 ° C a 60 ° C, y las esporas de hongos requieren de 70 ° C a 80 ° C durante 10 minutos para su destrucción, debido a esta variabilidad, el calor húmedo puede esterilizar o desinfectar, las aplicaciones comunes incluyen vapor de flujo libre bajo presión (autoclave), vapor de flujo libre a 100 ° C (tindalización) y el uso de temperaturas más bajas (pasteurización) (Cappuccino y Welsh, 2019).

- **Cabina de bioseguridad biológica.** En la cabina de Clase II, el aire se aspira desde la habitación y se pasa a través de un filtro HEPA antes de su liberación al medioambiente. Este patrón de flujo de aire está diseñado para evitar que los microbios en aerosol se escapen del gabinete, cuando la cabina no está en uso, se enciende una luz ultravioleta para esterilizar el aire y la superficie de trabajo (Leboffe y Pierce, 2016).

Otra manera de sembrar en un ambiente de esterilidad es a través de la utilización de un mechero Bunsen, realizando todos los procedimientos en las inmediaciones de una llama, ya que a su alrededor dispondremos de un entorno estéril, la llama también servirá para esterilizar el asa de siembra cuando esta sea de metal (Porres y Ruiz, 2018), siga las indicaciones a continuación:

Lámpara de alcohol. Es un recipiente de cristal que posee en su interior una mecha, la base del recipiente es más ancha y está rellena de alcohol industrial etílico (98%); este asciende por capilaridad, la mecha sale al exterior por una zona más estrecha denominada mechero, la lámpara posee un capuchón de vidrio que evita que se evapore el alcohol cuando no se está utilizando (Porres y Ruiz, 2018), siga los pasos a continuación para un uso adecuado de la lámpara.

1. Asegúrese que el nivel de alcohol es adecuado y que la mecha está bien centrada y ajustada, es muy importante cerciorarse de esto, ya que, si no está bien ajustado, los vapores de alcohol saldrán a través de este entrando en contacto con la llama y propagando dicha llama al interior del recipiente, lo que podría causar un accidente.

2. Cerciórese de que no existen derrames de alcohol por fuera de la lámpara.

3. Asegúrese de que en el entorno no existan materiales que pueden arder con facilidad o que no sean imprescindibles para la realización del procedimiento que se vaya a llevar a cabo, siempre es importante llevar el pelo recogido.

4. La existencia de materiales que puedan apagar el fuego en caso de derrames, por ejemplo, una manta antifuga o un extintor.

5. Encender la lámpara de alcohol con una cerilla o encendedor, nunca encender con otra lámpara, ya que al inclinar una lámpara sobre la otra se vertería el alcohol y empezaría a arder.

6. Cuando se haya terminado de utilizar la lámpara, apagarla colocando el capuchón, una vez que se haya extinguido la llama, levantar de nuevo el capuchón y volver a colocar, este último paso evita que se genere un vacío que podría dificultar levantar el tapón nuevamente.

7. Nunca apagar la llama soplando. El aire puede descender la mecha y provocar la entrada de la llama al interior del recipiente.

8. Si no se va a utilizar la llama en un tiempo, se debe apagar, aunque se tenga planeado encenderla después, solo se debe tenerla encendida el tiempo imprescindible y bajo supervisión.

9. Guardar la lámpara en un lugar seguro.

- **Mechero Bunsen.** Consiste en un tubo metálico sobre una base que está conectada a una tubería por la que entra un gas combustible. El mechero, además, posee un collarín regulador del aire, gracias al cual podemos variar la cantidad de oxígeno que entra al interior del tubo (Porres y Ruiz, 2018), siga los pasos a continuación para su uso.

1. Asegúrese de que en el entorno no existan materiales que puedan arder con facilidad o que no sean imprescindibles para la realización del procedimiento que se vaya a llevar a cabo, es importante tener el cabello recogido.

2. Cerrar la entrada de aire mediante el collarín regulador.

3. Abrir las llaves del gas de laboratorio que conectan con el mechero y, por último, la del propio mechero si la hay.

4. Acercar una cerilla o un encendedor en la boca del mechero, se encenderá una llama amarilla, hay que tener cuidado de que no entre la llama al interior del mechero, ya que es peligroso, esto ocurre si entra demasiado aire, si se diera tal caso se debería cerrar la llave del gas inmediatamente.

5. Algunos mecheros poseen una válvula de seguridad, en este caso se debe mantener presionado el botón del mecanismo a la vez que se acerca la llama del mechero Bunsen y, una vez encendido, se debe soltar el botón progresivamente.

6. La llama del mechero deberá ser de un color azulado estable, dicho color se consigue abriendo la entrada del aire, pues el oxígeno permite una combustión total del gas. Una llama azul es más calorífica que una llama amarilla, se debe tener cuidado ya que es más difícil de ver. Para aumentar o disminuir el tamaño de la llama se puede abrir o cerrar más la llave de gas del mechero (algunos mecheros no poseen dicha llave).

7. Para apagar el mechero cerrar en primer lugar la llave del gas de la mesa y, después, la del mechero, cerciorarse de que queden cerradas las llaves del gas del laboratorio.

1.4 Equipos

Microscopio, autoclave, cabina de seguridad biológica, incubadora, estufas, vortex, pHmetro, plancha de calentamiento, balanza.

1.5 Insumos y materiales

Cajas de Petri, pipetas, asas, tubos de ensayo, pinzas.

1.6 Procedimiento

- Se hará un recorrido por el laboratorio para que los estudiantes se familiaricen con los equipos y materiales y reconozcan las rutas de evacuación.
- Socialización del primer punto del cuestionario a compañeros y docentes.

1.7. Cuestionario

1. Realice una presentación, sobre el funcionamiento de los siguientes equipos de laboratorio. Equipos a revisar: **a)** Diferentes tipos de autoclave, **b)** Tipos de microscopio, **c)** Campana de flujo laminar y sus tipos, **d)** Estufa de calentamiento para agares, **e)** Centrífuga, **f)** Baño maría, **g)** Vortex, **h)** pHmetro, **i)** Incubadora, **j)** Balanzas y **k)** Pipetas mecánicas y digitales.
2. Señale sus partes y explique cómo ponerlas en funcionamiento, ¿qué tipo de equipo es?, ¿para qué agentes de grupo de riesgo es adecuado? Describa los pasos a seguir para el funcionamiento durante las prácticas de laboratorio y cuidado de estos.
3. Investigue a profundidad sobre los métodos de esterilización y desinfección, incluirlos a la presentación en grupos del punto anterior, el docente le indicará a cada grupo el tema, para que no se repita.
4. Realice un mapa conceptual de los métodos de esterilización y desinfección presentados por sus compañeros.
5. ¿Cuáles son las barreras primarias al ingreso al laboratorio, indumentaria y equipos más usados del laboratorio, que cree usted que son imprescindibles?
6. ¿Cuál es la temperatura ideal para la destrucción completa de virus, esporas, hongos y bacterias?
7. Consulte otras normas de bioseguridad a las que se presentan en este libro y diga cuáles podría seguir dentro del laboratorio.
8. En caso de sufrir un accidente de un derrame de un compuesto altamente contaminante, ¿qué haría usted?, ¿qué haría usted si a un compañero se le incendia un guante?, ¿cuál es el protocolo que deberá seguir?
9. ¿Cuál es la disposición final de las agujas y material contaminado?

Referencias bibliográficas

Brown, A. E. y Smith, H. R. (2017). *Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology* (Fourteenth, Vol. 7). New York: Mc Graw Hill Education.

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Kaufman, S. G. (2020). *Prepare and protect: safer behaviors in laboratories and clinical containment settings.* John Wiley & Sons.

Leboffe, M. J. y Pierce, B. E. (2016). *Microbiology: laboratory theory & application, brief.* (Third edit). Morton publishing Company.

Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo.

Rojas-Triviño, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general.* Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira, Colombia, 161.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Vega, A. E., Favier, G. I., Escudero, M. E., Estrada, C. L., Cáceres, C. S. y Arismendi-Sosa, A. C. (2017). Serie didáctica: material didáctico para estudiantes. Guías de Trabajos Prácticos: Microbiología. En *Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia Universidad de San Luis*. San Luis.

Práctica 2.

Montaje en fresco y observación de bacterias (tinciones simples y diferenciales)

2.1 Objetivo general

Conocer metodologías que permitan diferenciar las características morfológicas, estructurales y funcionales de los microorganismos.

2.2. Objetivos específicos

- Adquirir conocimientos que le permitan al estudiante tener un buen desempeño al momento de elaborar una tinción.
- Aprender el fundamento de tinciones simples y diferenciales.

2.3 Introducción

Los microorganismos son seres unicelulares o pluricelulares muy pequeños, que pueden estar presentes en diferentes ambientes; debido a su tamaño solo pueden ser observados por medio de un microscopio, herramienta de gran importancia para su observación e identificación. Existen algunos procedimientos utilizados para observar bacterias, hongos o estructuras a través de la microscopía directa sin utilizar tinciones, pero al ser casi incoloros en algunos casos es necesario recurrir a diferentes técnicas de tinción.

2.3.1. Montaje en fresco

La observación en fresco de una suspensión microbiana, se usa para examinar muestras sin colorear, lo que evita daños que se puedan ocasionar en la fijación y en la tinción, esta técnica permite observar microorganismos vivos y ciertas funciones fisiológicas como la motilidad y la fisión binaria, así como apreciar sus distintas formas, tamaños y agrupaciones. Se utilizan principalmente para la visualización de bacterias, hongos unicelulares, protozoos y helmintos.

La preparación de montaje en fresco se realiza colocando la muestra en una gota de agua o solución salina isotónica sobre un portaobjetos y cubriéndola con un cubreobjetos, debido a que no se usa tinción y la mayoría de las células son transparentes, la visualización se realiza mejor con la menor iluminación posible (Leboffe y Pierce, 2016).

2.3.2. Tinciones

Las técnicas de tinción nos permiten identificar estructuras celulares de los microorganismos y su morfología, en función de la capacidad que tienen estos para retener el colorante, esto dependerá de la carga positiva o negativa que tenga la célula y el colorante. Un colorante es un compuesto orgánico, que está conformado por un anillo de benceno que será el solvente orgánico incoloro,

un grupo químico denominado cromóforo que proporcionará el color al benceno y un grupo químico auxocromo que intensificará la capacidad del cromóforo de absorber el colorante y, por ende, el color se unirá a las células mediante enlaces iónicos, covalentes o hidrófobos (Willey et al., 2017).

Los tintes que se unen a las células mediante interacciones iónicas son probablemente los colorantes más utilizados, estos colorantes ionizables, se pueden dividir en dos clases generales según la naturaleza de su grupo cargado: básicos y ácidos (Willey et al., 2017). Las tinciones ácidas son aniónicas, lo que significa que, la porción cromógena muestra una carga negativa y, por tanto, tiene una fuerte afinidad por los componentes positivos de la célula (Cappuccino y Welsh, 2019). Incluye eosina, fucsina ácida y nigrosina. Las tinciones básicas son catiónicas, porque la porción cromógena exhibe una carga positiva y, por ende, tiene una fuerte afinidad por los componentes moleculares cargados negativamente (Cappuccino y Welsh, 2019). En este grupo se encuentra cristal violeta, azul de metileno, verde malaquita y safranina.

El uso de una sola tinción para colorear una célula bacteriana es conocido como tinción simple, los colorantes comúnmente utilizados para realizar una tinción simple son los tintes básicos, pueden usarse tinciones simples para determinar la morfología de las células bacterianas que se pueden clasificar en tres tipos morfológicos: bacilos (varillas), cocos (esféricos) y espirales (varillas en forma de sacacorchos) (Brown y Smith, 2017). El propósito principal de una tinción simple es resaltar todo el microorganismo para que las formas celulares y las estructuras básicas sean visibles (Tortora et al., 2019).

Las tinciones diferenciales reaccionan de manera distinta con diferentes tipos de bacterias y, por lo tanto, se pueden usar para distinguirlas (Tortora et al., 2019). Son aquellas en las cuales se utiliza más de un colorante y tienen por objetivo la observación de estructuras bacterianas y de paredes. Este tipo de tinciones se caracterizan por presentar un colorante principal o primario (básico que tiñe células cargadas negativamente), un agente mordiente (sales metálicas, solución yodada o lugol, ácido tánico o fenol que potencia el desarrollo de color), un agente decolorante (disolventes orgánicos), y un colorante secundario o de contraste (de distinto color al utilizado en el primer colorante) (Rojas-Triviño, 2011).

Las tinciones diferenciales se dividen en dos grupos, las utilizadas para distinguir grupos de bacterias (pared) (Tinción de Gram y Tinción Ácido-Resistente (AAR)) y las utilizadas para diferenciar estructuras bacterianas (Tinción de Cápsulas, Esporas y Flagelos).

- **Tinciones para observar paredes bacterianas.** En la **tinción de Gram**, dos tipos de células, Gram positivas y Gram negativas, se diferencian según la estructura y composición de la pared celular; estos tipos de células pueden identificarse por sus respectivos colores, morado y rosa o rojo, después de realizar el método de tinción; el procedimiento se basa en el hecho de que las bacterias Gram positivas retienen un complejo de colorante púrpura, mientras que las bacterias Gram negativas se decoloran y deben contrateñirse con un colorante rojo para visualizarlas al microscopio (Brown y Smith, 2017).

  La tinción de Gram utiliza cuatro reactivos diferentes: un colorante primario llamado "cristal violeta" (violeta de genciana) que tiñe todas las células de color violeta; el yodo, que se utiliza como agente mordiente y aumenta la afinidad de las células con el colorante e intensifica el color; alcohol acetona, como agente decolorante. Las células Gram positivas retienen el complejo de yodo violeta cristalino y, por lo tanto, estas células aparecerán de color púrpura bajo el microscopio; por otro lado, el complejo tinte-mordiente se elimina de las células Gram negativas, dejándolas incoloras y, por último, la safranina es utilizada para teñir de rosa aquellas células que han sido previamente decoloradas, dado que solo

las células Gram negativas experimentan decoloración, ahora pueden absorber la contratinción y las células Gram positivas retienen el color púrpura de la tinción primaria.

- La tinción **ácido-resistente** se une fuertemente solo a las bacterias que tienen un material ceroso en sus paredes celulares (Tortora et al., 2019). Este material ceroso es llamado ácido micólico, un lípido complejo que está compuesto por ácidos grasos y alcoholes grasos que tienen cadenas de hidrocarburos de hasta 80 carbonos de longitud; afecta significativamente las propiedades de tinción de estas bacterias y evita que se tiñan con muchas de las tinciones que se utilizan habitualmente en microbiología (Brown y Smith, 2017). Está presente en la pared celular de bacterias del género *Mycobacterium* sp.

  La tinción Ácido-Resistente utiliza tres reactivos: como colorante primario el carbol fucsina (fucsina fenicada) una tinción de color rojo oscuro en fenol al 5% que es soluble en los materiales lipoidales que constituyen la mayor parte de la pared celular micobacteriana, penetra en estas bacterias y se retiene. La aplicación de calor mejora aún más la penetración, lo que impulsa el carbol fucsina a través de la pared lipoidea y hacia el citoplasma; esta aplicación de calor se utiliza en el método Ziehl-Neelsen (Cappuccino y Welsh, 2019). Un agente decolorante como alcohol ácido que retiene la tinción primaria y las micobacterias permanecerán rojas, en el caso de microorganismos no ácido resistentes que carecen de ceras celulares, la tinción primaria se elimina más fácilmente durante la decoloración, dejando estas células incoloras o sin teñir. Por último, se utiliza azul de metileno como reactivo final para teñir las células que fueron previamente decoloradas.

- **Tinciones para observar estructuras bacterianas.** Una **endospora** es una estructura latente y resistente formada dentro de una célula, que protege a una bacteria de condiciones ambientales adversas; aunque las endosporas son relativamente poco comunes en las células bacterianas, pueden ser formadas por unos pocos géneros de bacterias; no se pueden teñir con métodos ordinarios, como la tinción simple y la tinción de Gram, porque los tintes no penetran en la pared de la endospora, es por esto que la tinción más utilizada es la tinción de endosporas de Schaeffer Fulton (Tortora et al., 2019). Como colorante primario se utiliza el verde de malaquita; para que haya mayor penetración es necesario aplicar calor. Se utiliza agua destilada para eliminar el exceso de colorante y, por último, se hace la contratinción con safranina para teñir las partes de las células que no se tiñeron anteriormente.

  Muchas células bacterianas están rodeadas por una capa extracelular similar a un gel que se encuentra fuera de la pared celular denominada "cápsula" y esta puede variar en su composición química (Brown y Smith, 2017). El material capsular está compuesto principalmente por polisacáridos complejos como, dextranos y celulosas (Cappuccino y Welsh, 2019). Si está compuesto de polisacáridos, se conoce como glucocálix (Brown y Smith, 2017). La tinción de las cápsulas es más difícil que otros tipos de procedimientos de tinción, porque los materiales capsulares son solubles en agua y pueden desprenderse o eliminarse durante un lavado riguroso, para demostrar la presencia de cápsulas se puede mezclar las bacterias en una solución que contenga una suspensión coloidal fina de partículas coloreadas (generalmente tinta china o nigrosina) para proporcionar un fondo de contraste (Tortora et al., 2019).

Los flagelos bacterianos suelen ser demasiado delgados para ser observados con el microscopio óptico y con tinciones comunes. Se han desarrollado varios tintes especiales para flagelos que utilizan un mordiente para ayudar a incrustar los flagelos con tinte hasta un espesor visible, la tinción de flagelos permite la observación directa de flagelos. La presencia

y disposición de flagelos puede ser útil para identificar especies bacterianas (Leboffe y Pierce, 2016). La técnica de tinción utilizada para la coloración de los flagelos es la de Leifson. Se emplea inicialmente ácido tánico para recubrir el flagelo y aumentar su grosor, posteriormente, se tiñe con solución de rosanilina, que permitirá observar los flagelos al microscopio con una coloración rosa o azul (Porres y Ruiz, 2018).

2.4 Equipos

Microscopio, centrífuga.

2.5 Insumos y materiales

Portaobjetos, cubreobjetos, papel absorbente, parcial de orina debidamente rotulado, muestra sólida: flujo vaginal, concentrado de glóbulos rojos, suspensión de levaduras, tubos de ensayo, hisopos de algodón estériles, goteros, tubos Eppendorf o cónicos, mechero, bandeja de tinción, solución salina isotónica al [0.9%], anticoagulante EDTA, tiras reactivas de orina, azul de metileno, cristal violeta, carbol fucsina, safranina, verde de malaquita, tinta china, rosanilina, acido tánico, agua destilada, alcohol etílico al 95% (500 ml) y acetona (300 ml), lugol.

2.5.1. Medios y organismos

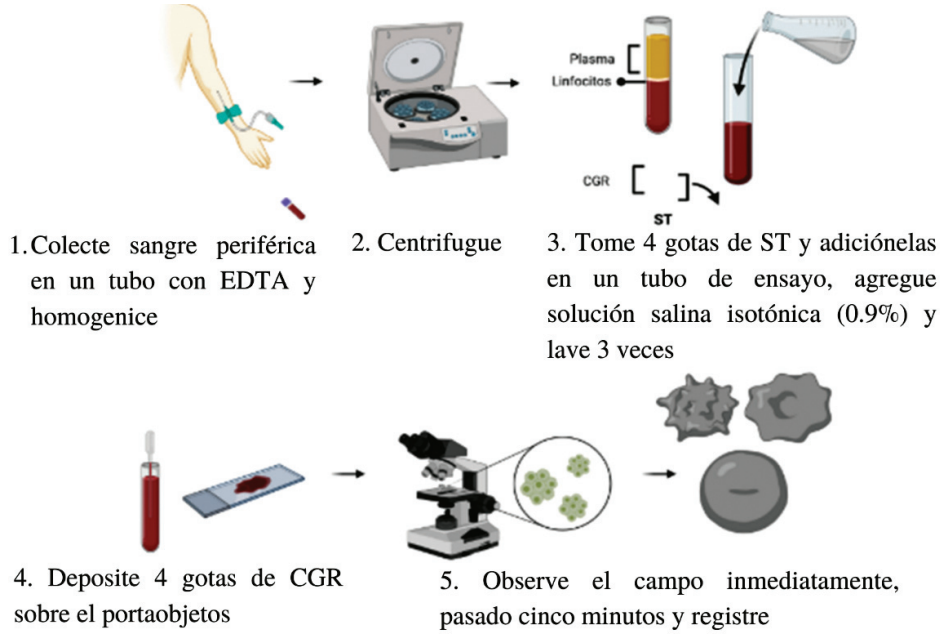
Cepa bacteriana en agar nutritivo (*Staphylococcus aureus - Escherichia coli*), suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* tomado del medio de Ogawa y mezclado con colonias de *Staphylococcus aureus* de un agar salado manitol, cepa bacteriana de *Bacillus sp*, cepa bacteriana *Klebsiella sp* en agar nutritivo.

2.6. Procedimiento

2.6.1. Montaje en fresco

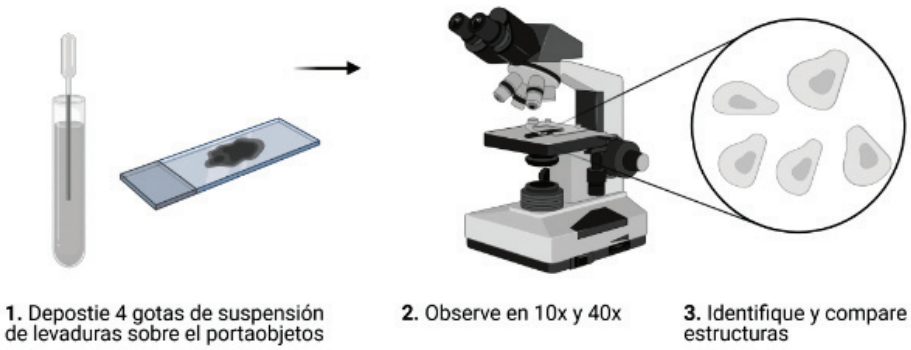
1. Tome un microscopio y colóquelo sobre la mesa o espacio de trabajo, verifique que la plataforma esté completamente hacia abajo y que el objetivo de escaneo esté en su lugar.
2. Tome un cubre y portaobjetos, límpielo para eliminar cualquier residuo y prepare montajes húmedos de las muestras disponibles, siguiendo los diagramas de procedimientos que se encuentran más adelante dependiendo de cada muestra **(Figuras 2.1, 2.2, 2.3 y 2.4)**.
3. Enfocar la muestra con el aumento 10X y 40X, que le permita ver la estructura que desea completa.
4. Al terminar, deseche los cubre y portaobjetos en el guardián.
5. Pase los hisopos por el mechero antes de desecharlos.

Figura 2.1. *Obtención y observación de glóbulos rojos; ST: Sólidos Totales.*



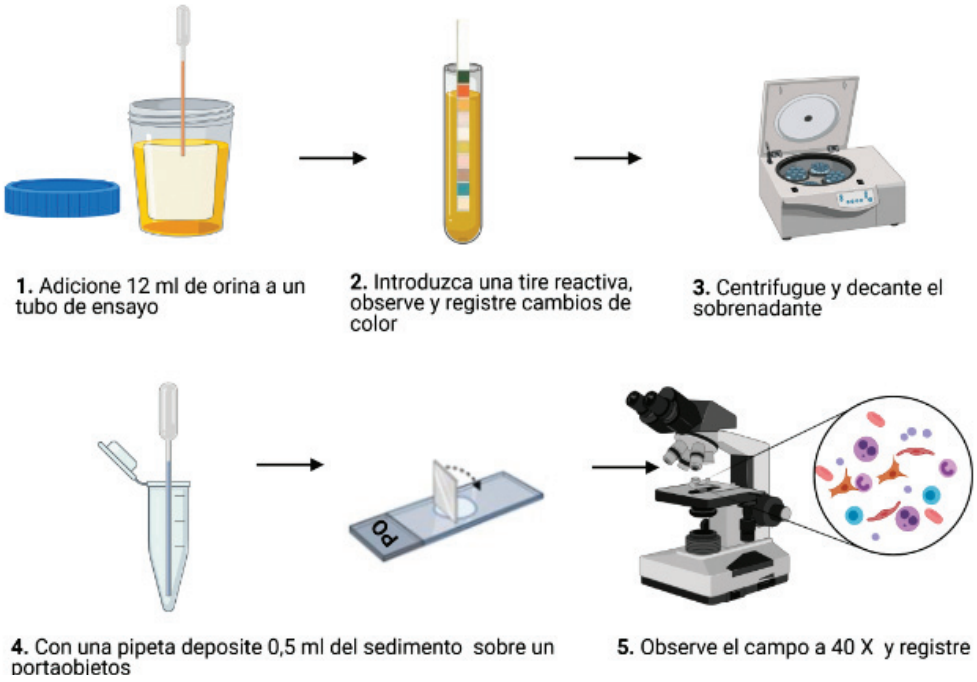
Fuente: Autores (2023).

Figura 2.2. *Montaje y observación de una suspensión de levaduras.*



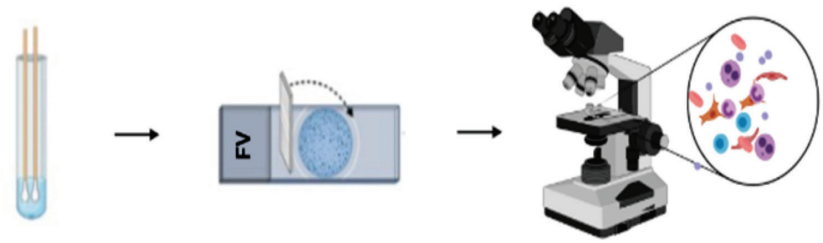
Fuente: Autores (2023).

Figura 2.3. *Procedimiento para la lectura química y observación microscópica de un parcial de orina.*



Fuente: Autores (2023).

Figura 2.4. *Observación montaje en fresco de flujo vaginal.*



Fuente: Autores (2023).

2.6.2. Preparación de frotis bacterianos

1. **Prepara el portaobjetos:** lavarlos con agua, jabón y, posteriormente, limpiarlos con alcohol al 95% para eliminar cualquier grasa o residuo que esté presente.
2. **Marcar:** escribir las iniciales del organismo con el que se esté trabajando en los bordes del portaobjetos y el número del grupo.

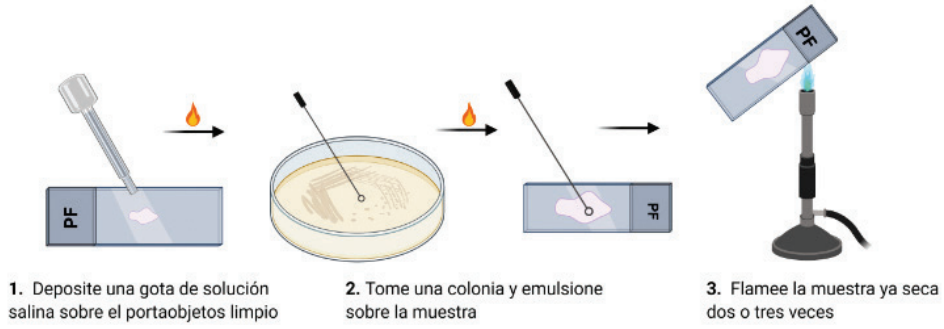
3. **Frotis:** evitar frotis espesos, solo se requiere una pequeña cantidad del cultivo bacteriano. Se utilizan diferentes técnicas dependiendo de si el frotis se hace a partir de un cultivo en caldo o en medio sólido. Al finalizar hay que dejarlo secar al aire.

Cultivos en caldo: resuspenda el cultivo golpeando el tubo con el dedo, dependiendo del tamaño del asa y la cantidad de crecimiento del cultivo, aplique uno o dos trazos llenos al centro del portaobjetos con un asa de inoculación estéril (Cappuccino y Welsh, 2019). Extiéndalo formando un espiral, de esta manera no pasará dos veces por el mismo sitio hasta cubrir un área del tamaño de una moneda.

Cultivos en medio sólido: antes de colocar la muestra del cultivo, debe colocarse una gota de solución salina fisiológica 0.9% de NaCl en el centro del portaobjetos. Transfiera las células usando un asa de inoculación estéril o una aguja, solo la punta del asa o la aguja debe tocar el cultivo para evitar la transferencia de demasiadas células. La suspensión se logra esparciendo las células en un movimiento circular en la gota de agua con el asa o aguja para evitar la acumulación de células (Cappuccino y Welsh, 2019). El frotis terminado debe ocupar un área del tamaño de una moneda y debe aparecer como una película blanquecina confluente translúcida o semitransparente, debe secarse a temperatura ambiente **(Figura 2.5)**.

4. **Fijación por calor**: pase el extendido seco dos o tres veces sobre el flameador o mechero.

Figura 2.5. *Preparación de frotis bacterianos***.**



Fuente: Autores (2023).

2.6.3. Tinción simple

1. Colocar un portaobjetos en la bandeja de tinción e inundar el frotis, teniendo en cuenta el tiempo de exposición adecuado según el colorante a utilizar: carbol fucsina de 15 a 30 segundos; cristal violeta de 20 a 60 segundos y azul de metileno de 1 a 2 minutos **(Figura 2.6)**.
2. Pasado el tiempo, lave cuidadosamente la lámina para remover el exceso de colorante con agua del grifo tomada en un frasco.
3. Dejar secar al aire libre.
4. Observar al microscopio con aceite de inmersión a 100X.

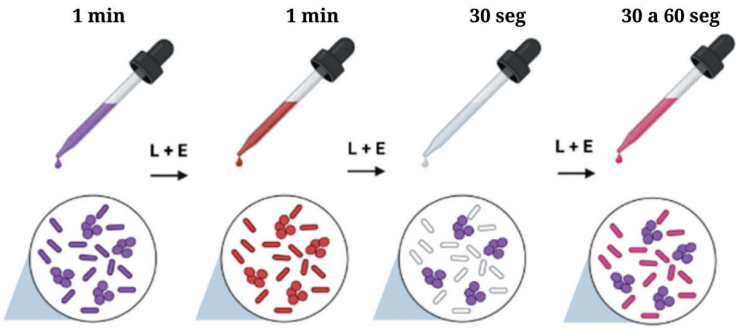
Figura 2.6. *Procedimiento realizado para la preparación de una tinción simple, para la observación de bacterias***.**

Fuente: Autores (2023).

2.6.4. Tinción de Gram (Figura 2.7.1)

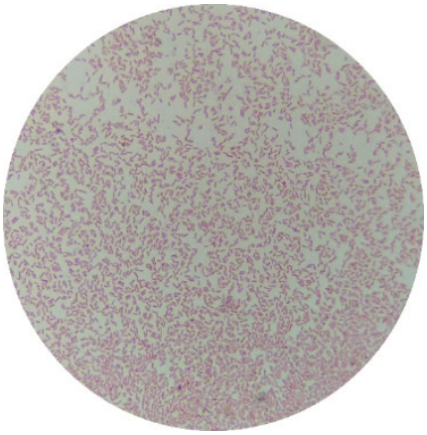
1. Colocar el portaobjetos en la bandeja de tinción y agregar el cristal violeta, durante 1 minuto.
2. Lavar con agua por 1 minuto, de la llave o destilada, para retirar el exceso de colorante.
3. Agregar lugol, dejar actuar y, posteriormente, lavar para retirar excesos.
4. Agregar la solución decolorante (alcohol acetona) durante 30 segundos. Luego, lave para retirar el exceso. Si al terminar este tiempo no se ha decolorado completamente se puede repetir la operación hasta que quede decolorado.
5. Agregar la safranina durante 30 a 60 segundos, dejar actuar y lavar para retirar excesos. Secar a temperatura ambiente.
6. Observar al microscopio con aceite de inmersión a 100X **(Figuras 2.7.2 y 2.7.3)**.

Figura 2.7.1. *Procedimiento parar realizar la tinción de Gram, donde se muestran los pasos y tiempos necesarios de cada colorante. L: Lavar; E: Escurrir.*



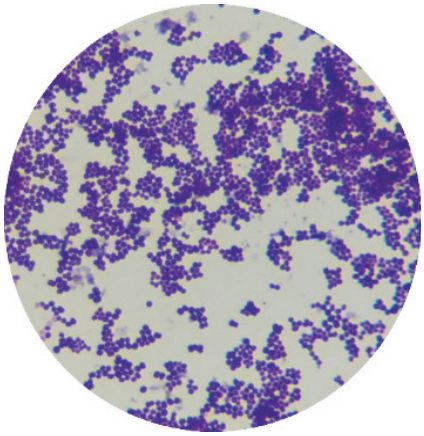
Fuente: Autores (2023).

Figura 2.7.2. *Observación de bacterias Gram negativas.*



Fuente: Autores (2023).

Figura 2.7.3. *Observación de bacterias Gram positivas.*

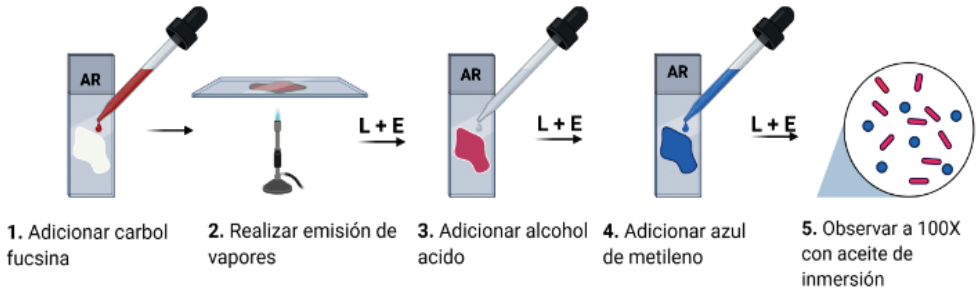


Fuente: Autores (2023).

2.6.5. Tinción ácido-alcohol resistente o Ziehl-Neelsen

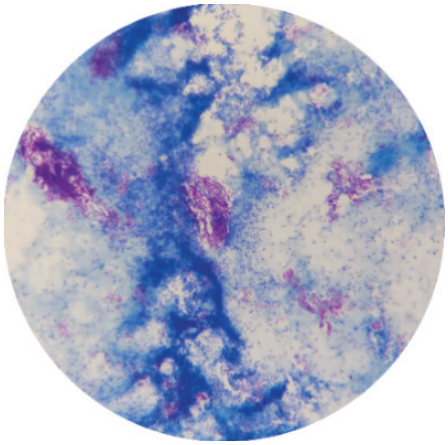
1. Cubrir el frotis con carbol fucsina y realizar la técnica de emisión de vapores durante 5 minutos pasando el mechero o asa encendida cubierta con algodón y mojada en alcohol, posteriormente, dejar enfriar y lavar el exceso con agua de la llave.
2. Decolorar completamente con alcohol ácido y lavar añadiendo agua gota a gota para eliminar excesos.
3. Agregar azul de metileno y lavar durante 2 minutos.
4. Dejar secar al aire y observar al microscopio con aceite de inmersión y objetivo de 100 X **(Figura 2.8.1)**.

Figura 2.8.1. *Procedimiento para la realización de la tinción.* ***L:*** *Lavar;* ***E:*** *Escurrir.*



Fuente: Autores (2023).

Figura 2.8.2. *Observación de la tinción ácido-alcohol resistente, las bacterias azules corresponde a S. aureus y las rosadas a Mycobacterium.*

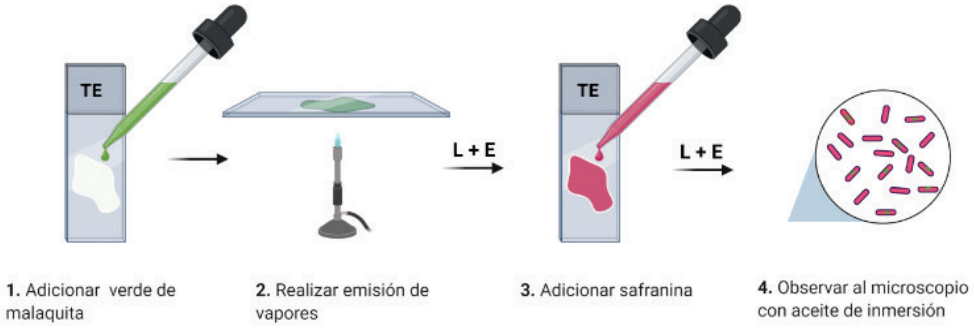


Fuente: Autores (2023).

2.6.6. Tinción de esporas

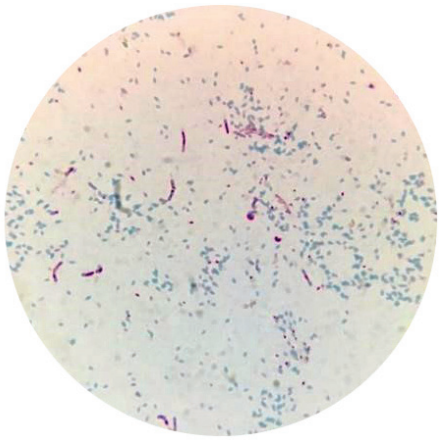
1. Agregar verde de malaquita al frotis y realizar la técnica de emisión de vapores durante 8 minutos, posteriormente, dejar enfriar y lavar el exceso con agua de la llave.
2. Aplicar safranina para la contratinción durante 1 minuto. Retirar el exceso con agua destilada. dejar secar a temperatura ambiente.
3. Observar al microscopio con aceite de inmersión **(Figuras 2.9.1 y 2.9.2).**

Figura 2.9.1 *Procedimiento para la realización de la tinción de endoesporas.* ***L:*** *Lavar;* ***E:*** *Escurrir.*



Fuente: Autores (2023).

Figura 2.9.2. *Observación de endosporas de Bacillus sp. El color verde corresponde a la endospora y el rosado a las células vegetativas.*

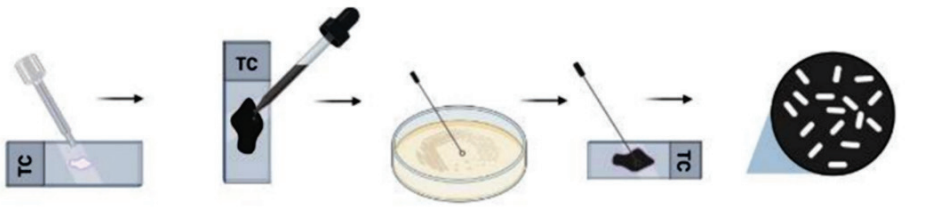


Fuente: Autores (2023).

2.6.7. Tinción de cápsulas o tinción negativa

1. Deposite una gota de solución salina sobre el portaobjetos limpio y, luego, añada tinta china.
2. Tome una colonia, adiciónela al portaobjetos y emulsiónelo.
3. Coloque una lámina cubreobjetos.
4. En uno de los sitios menos densos de la muestra observe en 10x.
5. Observe sobre el mismo sitio, pero con el objetivo a 40x.
6. Observe en el microscopio con aceite de inmersión y coloque a 100x **(Figuras 2.10.1 y 2.10.2)**.

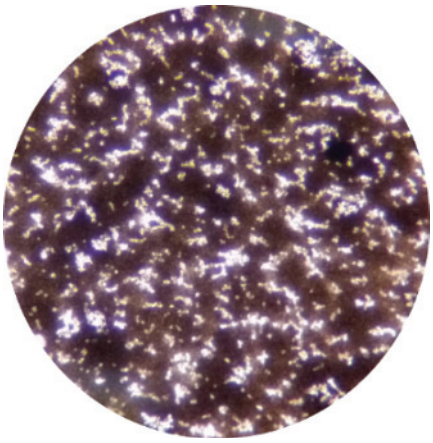
Figura 2.10.1. *Procedimiento para la realización de la tinción negativa, para la observación de cápsulas.*



1. Deposite una gota de solución salina sobre el portaobjetos limpio
2. Adicionar tinta china
3. Tome una colonia y emulsione sobre la muestra
4. Observe a 10X, 40X y por último a 100X con aceite de inmersión

Fuente: Autores (2023).

Figura 2.10.2. *Observación de cápsula de la bacteria Klebsiella sp.*



Fuente: Autores (2023).

2.6.8. Tinción de flagelos

1. Se fija la suspensión bacteriana mediante formol y se hace la extensión en un portaobjetos.
2. Se deja secar al aire, sin calentamiento alguno.
3. Se añade una mezcla de ácido tánico y el colorante rosanilina.
4. Se retira el colorante con agua y se deja secar al aire antes de su observación al microscopio.

CONSEJO PARA LA PRÁCTICA: tenga en cuenta que los tiempos pueden variar de acuerdo al reactivo.

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo de los tipos de tinción.
https://www.youtube.com/watch?v=5Q0xAzBMYjc

2.7. Resultados

Tabla 2.1. *Reporte de resultados obtenidos en los distintos tipos de tinción de microorganismos.*

Montaje en Fresco		
Muestra:		
Organismo:		
Observación:		
Forma:		
Muestra:		
Organismo:		
Observación:		
Forma:		

Muestra:		
Organismo:		
Organismo:		
Forma:		
Tinción Simple		
Colorante:		
Muestra:		
Organismo:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Colorante:		
Muestra:		
Organismo:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Tinción Gram		
Organismo:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Color de la célula:		
Organismo:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Color de la célula:		
Ácido-Resistente		

Organismo:		
Tipo de tinción:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Color de la célula:		
Endosporas		
Organismo:		
Tipo de tinción:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Color de la célula		
Cápsulas		
Organismo:		
Tipo de tinción:		
Objetivo microscopio:		
Morfología:		
Agrupación:		
Color de la célula:		

Fuente: Autores (2023).

2.8. Cuestionario

1. ¿Cuál es la ventaja de usar preparaciones con organismos vivos en vez de muestras ya teñidas?
2. ¿A qué se denomina movimiento browniano?
3. ¿Cuál es el propósito de un colorante primario, mordiente, agente decolorante y reactivo de contratinción?
4. ¿Cuál es la función de las endosporas en las bacterias?
5. ¿A qué se debe que las bacterias se clasifiquen en Gram positivas y en Gram negativas?
6. ¿Para qué se utiliza el aceite de inmersión?
7. ¿Para qué se hace uso de la técnica de emisión de vapores en la tinción de Ziehl-Neelsen?

Referencias bibliográficas

Brown, A. E. y Smith, H. R. (2017). *Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology* (Fourteenth, Vol. 7). New York: Mc Graw Hill Education.

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Leboffe, M. J. y Pierce, B. E. (2016). *Microbiology: laboratory theory & application, brief.* (Third edit). Morton publishing Company.

Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo.

Rojas-Triviño, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general.* Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira, Colombia, 161.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Willey, J. M., Sherwood, L. M. y Woolverton, C. J. (2017). *Prescott´s microbiology* (Tenth edit). Mc Graw.

Práctica 3.

Medios de cultivo (preparación de soluciones)

3.1 Objetivo general

Conocer los diferentes medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos, su clasificación y las unidades de concentración de soluciones.

3.2. Objetivos específicos

- Conocer las unidades de concentración de soluciones y su correcto desarrollo.
- Adquirir habilidades para la preparación de medios de cultivo específicos.
- Desarrollar de manera correcta los cálculos para realizar la preparación de los medios de cultivo.

3.3. Introducción

3.3.1. Unidades de concentración de soluciones

Concentración es la cantidad de soluto disuelta en una cantidad dada de disolvente o de solución. Entre mayor sea la cantidad de soluto disuelta, más concentrada estará la solución. Las unidades de concentración más usadas son porcentajes, partes por millón, normalidad y molalidad, entre otras (Whitten et al., 2015).

- **Porcentajes (peso/peso):** indica la cantidad de soluto en cada 100 unidades de solución. Este porcentaje conviene cuando se dispone de una balanza precisa para determinar tanto el peso del soluto como el de la solución.

$$\%p/p = \frac{Peso\ del\ soluto}{Peso\ de\ la\ solución} \times 100$$

- **Porcentaje peso volumen (p/v):** indica la cantidad de unidades en peso de un soluto por cada 100 unidades en volumen de una solución. Usualmente se expresa en gramos de soluto por cada 100 mL de solución.

$$\%p/p = \frac{Peso\ del\ soluto}{Volumen\ de\ la\ solución} \times 100$$

- **Porcentaje volumen volumen (v/v):** expresa la cantidad de unidades en volumen de un soluto por cada 100 unidades en volumen de una solución. Manejar esta unidad conviene cuando los solventes como los solutos son líquidos.

$$\%p/p = \frac{Volumen\ del\ soluto}{Volumen\ de\ la\ solución} \times 100$$

- **Partes por millón (ppm):** expresa el número de unidades en masa de un soluto por cada millón, partes en peso de solución, usualmente se expresa en miligramos de soluto por cada kilogramo de solución.

$$\%p/p = \frac{Mg\ de\ soluto}{V\ (L)\ de\ la\ solución}$$

- **Normalidad (N):** expresa el número de equivalentes gramo (N° eq-g) por litro de solución o el número de miliequivalentes gramo (N°meq-g) por mililitro de solución.

$$N = \frac{N°\ eq\ -g}{V\ (L) de\ la\ solución} \quad N = \frac{N°\ m\ -g}{V\ (mL)\ de\ la\ solución}$$

- **Molaridad (M):** es una manera corriente de expresar la concentración de las soluciones. Se define como el número de moles de soluto por litro de solución.

$$M = \frac{N°\ de\ moles\ de\ soluto}{N°\ litros\ de\ la\ solución}$$

- **Molalidad (m):** es el número de moles de soluto por kilogramo de solvente.

$$m = \frac{N°\ de\ moles\ de\ soluto}{N°\ kilogramos\ de\ la\ solución}$$

La diferencia entre estas dos últimas unidades es que molalidad (m) está definida en términos de la masa del solvente, en cambio la molaridad (M) está definida en términos del volumen de la solución. La molalidad de una solución dada no varía con la temperatura, sin embargo, la molaridad cambia con la temperatura a causa de la expansión o contracción de la solución.

3.3.2. Medios de cultivo y su preparación

Un medio de cultivo es una solución nutritiva que se utiliza para promover el crecimiento de microorganismos. Para cultivar microorganismos en el laboratorio es fundamental suministrarles todos los nutrientes que necesitan, el requerimiento de estos varía ampliamente (Madigan et al., 2016). Los organismos requieren diferentes suplementos nutricionales y no todos en la misma cantidad. Algunos nutrientes, llamados macronutrientes, se requieren en grandes cantidades, mientras que otros, llamados micronutrientes, solo en cantidades trazas (Brown y Smith, 2017).

De acuerdo con lo anterior, ¿qué criterios debe satisfacer el medio de cultivo? Primero, debe contener los nutrientes adecuados para el microorganismo específico que se desea cultivar. También debe contener humedad suficiente, un pH ajustado de manera apropiada y una concentración conveniente de oxígeno, que algunas veces está ausente por completo. El medio que se va a sembrar debe ser estéril, es decir, en un principio no debe contener microorganismos viables, de modo que el cultivo contenga solo los microbios (y su descendencia) que se agreguen al medio. Por último, el medio de cultivo sembrado debe incubarse a la temperatura correcta (Tortora et al., 2019).

En microbiología se utilizan dos clases principales de medios de cultivo: medios definidos y medios complejos. Los medios definidos se preparan agregando cantidades precisas de compuestos químicos orgánicos o inorgánicos al agua destilada. Por tanto, se conoce la composición química exacta de un medio definido (cualitativa y cuantitativamente). La fuente de carbono es de fundamental importancia en cualquier medio de cultivo, ya que la mayoría de las células necesitan grandes cantidades de carbono para sintetizar nuevo material celular (Madigan et al., 2016).

Por otra parte, los medios complejos emplean componentes de productos microbianos, animales o vegetales, como caseína (proteína de la leche), carne (extracto de carne), soja (caldo de

soja tríptico), células de levadura (extracto de levadura) u otras sustancias muy nutritivas. Estos productos de digestión están disponibles comercialmente en forma deshidratada y solo requieren hidratación para formar un medio de cultivo. Sin embargo, la desventaja de utilizar un medio complejo es el hecho de que su composición nutricional no se conoce con precisión **(Figuras 3.1 y 3.2)** (Madigan et al., 2016).

Clasificación de los medios de cultivo de acuerdo con su **estado físico, naturaleza y propósito**.

- **Según su estado físico** los medios se clasifican en: medios de cultivo sólidos, semisólidos y líquidos. Los líquidos no contienen agar, mientras que los sólidos (1,5 a 2% de agar) y semisólidos (0,5% de agar) difieren en su concentración. Existe una presentación diferente llamada bifásica que contiene una fase sólida y una líquida (Rojas-Triviño, 2011).

- **Según su naturaleza o composición** existen los naturales, que se emplean tal y como se encuentran en la naturaleza, ej. Sangre diluida, leche, jugos vegetales. Los medios de cultivos sintéticos, que son de composición exactamente conocida ej. Medios comerciales o deshidratados y, por último, los medios de cultivo vivos, los cuales contienen células u organismos vivos, como células de riñón (Rojas-Triviño, 2011).

Finalmente, los medios de cultivos según su utilidad se clasifican en (Willey et al., 2017):

- **Simples o primarios**: pueden ser líquidos o sólidos, tales como el Caldo Nutritivo (CN) y el Agar Nutritivo (AN), estos poseen nutrientes mínimos necesarios para el desarrollo microbiano, pero no permite diferenciar los microorganismos por no tener agentes selectivos ni indicadores de pH, sin embargo, sirve para mantener los microorganismos iniciales o para recuperarlos.

- **Compuestos o secundarios:** poseen un medio simple, más un extracto y un fluido corporal, ejemplos: Agar Sangre (AS), Agar Chocolate (ACH), que por la diferencia de cantidad de sangre agregada y temperatura se puede usar para observar las hemólisis (AS) o la utilización del grupo HEM en (ACH).

- **Medios enriquecidos:** son un medio en el cual se aportan nutrientes y condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de un microorganismo específico. Además, para recuperar microorganismos de difícil y lento crecimiento, para lo cual se utiliza la adición de fluidos corporales y suplementos (isovitales, factores de coagulación, aminoácidos, entre otros) (Tortora et al., 2019).

- **Medios selectivos**: los cuales tienen adición de algunas sustancias que no permiten el desarrollo de un grupo de microorganismos, sin afectar el desarrollo de los grupos de interés (Tortora et al., 2019). Ejemplos: Thayer Martin (antibióticos: vancomicina, nistatina, colistina y trimetoprim-sulfametoxazol) selectivo para el género *Neisseria,* Eosina Azul de Metileno, EMB (colorante eosina azul de metileno) que inhibe la flora Gram positiva y permite el desarrollo de flora Gram negativa, Agar Salado Manitol (ASM) (se utiliza el NaCl en concentración del 7.5%) permite solo el desarrollo de microorganismos halófilos como *Staphylococcus aureus.*

- **Medios diferenciales:** como su nombre lo indica, facilitan la diferenciación de colonias de un microorganismo deseado, de otras colonias que crecen en la misma placa. (Como por ejemplo a través de la observación de hemólisis, coloraciones de colonias y otras reacciones indicadoras) identificación aerobios y anaerobios, utilización de enzimas o sustratos (TSI) a través de un indicador de pH, entre otros (Tortora et al., 2019).

Otras clases de medios son:

- **Medios de recuento:** sirven para cuantificar la cantidad de microorganismos y se informa

en ufc/ml, hoy en día existen las paletas de recuento para orina, los de petrifilms para recuento de coliformes en agua o se puede realizar por el método de diluciones seriadas.

- **Medio de susceptibilidad:** que sirve para que una sustancia se difunda en el medio y se pueda observar su acción, ejemplo agar *Müller Hilton,* que se usa para la técnica de radio-difusión en la lectura de antibiogramas.

- **Medio de transporte:** que debe mantener viables temporalmente los microorganismos, hasta llegar al laboratorio y poderlos repicar, solo contienen buffers y sales, como por ejemplo, caldo tioglicolato, medio *Stuart,* Venkat-Ramakrishnan (VR) medio para el *V. cholerae.*

- **Medio de almacenamiento:** es un medio para la conservación de las cepas, debe ser semi-sólido, con baja concentración de glucosa para que no haya tanta actividad metabólica de los microorganismos, se debe mantener en temperatura de refrigeración 2 a 8 °C, y pueden durar los microorganismos viables por 2 meses (Porres y Ruiz, 2018).

  El medio de cultivo debe manejarse de acuerdo con las condiciones del fabricante, habitualmente debe esterilizarse antes de su uso y el proceso de esterilización se logra llevando el medio al autoclave a 15 libras de presión, donde se alcanza una temperatura de 121ºC y un tiempo de 20 minutos (Madigan et al., 2016).

3.4 Equipos

Autoclave, incubadora, balanza, pHmetro, cabina de flujo laminar, placa de calentamiento.

3.5 Insumos y materiales

Cajas de Petri estériles, tubos de ensayo estériles, mechero, gradilla, probeta, tubos tapa rosca azul o erlenmeyer, cinta de enmascarar y/o marcador, medios de cultivo.

3.6 Procedimiento

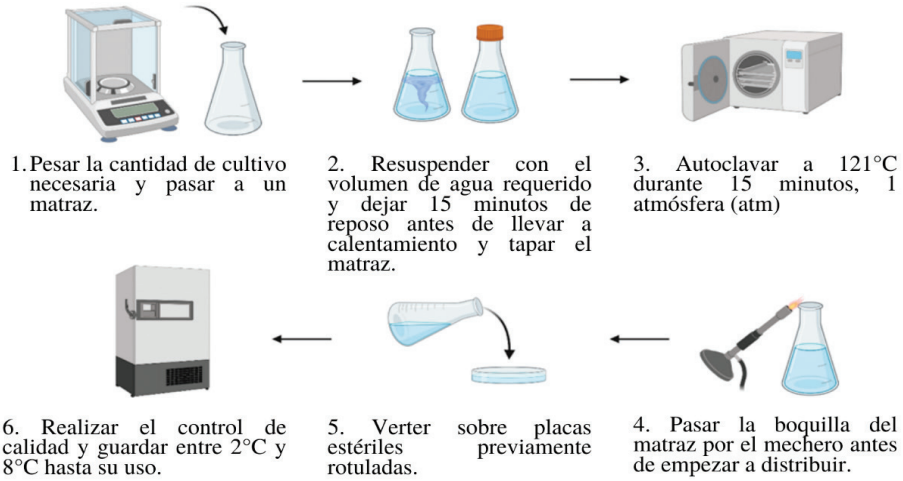
La preparación de los medios de cultivo es a partir de medios deshidratados suministrados comercialmente. La presentación inicial de un medio puede ser en polvo, granulado o en pastillas, se debe realizar los cálculos y es necesario saber si la presentación final será sólida o líquida para preparar el contenedor (caja de Petri o tubo tapa rosca) para versarla. De acuerdo con eso se usa aproximadamente: tubo tapa rosca grande volumen final 10 ml, tubo tapa rosca pequeño volumen final 5 ml, caja de Petri grande volumen final 15 ml, caja de Petri pequeña volumen final 8 ml.

3.6.1. Preparación de un medio de cultivo sólido

1. Rotular los instrumentos a utilizar.
2. Pesar la cantidad de medio de cultivo deshidratado necesaria y añadirlo a un matraz. Se debe tener en cuenta que cada medio tiene la cantidad necesaria para 1 litro de agua destilada.
3. Hidratar el medio.
4. Llevar el medio a punto de ebullición. Dejar hervir durante un minuto y retirar.
5. Tapar el matraz con algodón graso o papel aluminio. Rotular con nombre del medio, fecha, cantidad y responsables.
6. Se debe tener en cuenta las instrucciones recomendadas en el envase del medio de cultivo, sin embargo, la mayoría se autoclava a 121°C durante 15 minutos.
7. Sacar el matraz de la autoclave y dejar atemperar hasta 50°C.

8. Verter sobre placas estériles previamente rotuladas en un ambiente estéril (aproximadamente 15 ml por placa). Pasar la boquilla del matraz por el mechero antes de empezar a distribuir. Dejar las placas destapadas hasta que el medio se haya solidificado.
9. Se debe realizar un control de calidad, incubando las placas de 12 a 24 horas para corroborar su esterilización. Cerrar las placas y guardar entre 2°C y 8°C hasta su uso.

Figura 3.1. *Pasos para la preparación de un medio de cultivo sólido.*



Fuente: Autores (2023).

3.6.2. Preparación de un medio de cultivo sólido inclinado

1. Seguir los pasos del 1 al 4 del procedimiento anterior.
2. Distribuir el medio de cultivo en los tubos de ensayo, con ayuda de una pipeta estéril. Los tubos deberán estar colocados sobre gradillas. El volumen del medio introducido deberá ser la tercera parte del volumen del tubo.
3. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos (tener en cuenta recomendaciones del envase del medio de cultivo).
4. Sacar los tubos y colocarlos inclinados.
5. Una vez solidificado guardar a una temperatura entre 2°C y 8°C.

3.6.3. Preparación de un medio de cultivo líquido

1. Seguir los pasos del 1 al 3 del primer procedimiento.
2. Distribuir el medio en los recipientes que se vayan a utilizar.
3. Tapar los recipientes de la manera adecuada para cada uno.
4. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos (tener en cuenta recomendaciones del envase del medio de cultivo).
5. Sacar de la autoclave, y dejar atemperar.

Figura 3.2. *Pasos para la preparación de un medio de cultivo sólido inclinado y líquido.*

1. Pesar la cantidad de cultivo necesaria y pasar a un matraz.

2. Resuspender la cantidad de medio pesado previamente, y colocarlo en el matraz con el volumen de agua requerido, llevar a calentamiento y tapar.

3. Distribuir el medio en los recipientes que se vayan a utilizar.

4. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos, luego sacar los tubos y dejar atemperar.

5. Según sea el caso, una vez solidificado guardar a una temperatura entre 2°C y 8°C (inclinado) o dejar atemperar para su posterior uso (líquido).

Fuente: Autores (2023).

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo de los tipos de medio de cultivo, preparación de medios en polvo y medios licuados como agar chocolate, agar sangre y agar Baird Parker.
https://youtu.be/fl27DPdlOWs

3.7. Resultados

Realice los siguientes ejercicios.

- ¿Cuánto se debe pesar de medio TSA (Tripticasa Soya Agar) para preparar agar sangre, 20 cajas grandes y 10 cajas pequeñas, sabiendo que para cada litro de medio se debe pesar 40 gramos?

De acuerdo con el punto anterior, indique la clasificación del medio de cultivo, en relación con su composición, su propósito y estado físico.

- Calcule la molaridad (M) de una solución que contiene 3,65 gramos de ácido clorhídrico (HCl) en 2,00 litros de solución.

3.8 Cuestionario

1. ¿Por qué se debe utilizar agua destilada para hidratar el cultivo?
2. ¿Qué objetivo tiene la esterilización?
3. ¿Cuáles son los medios selectivos para bacterias Gram negativas?
4. ¿Cuánto se debe pesar de medio agar triple azúcar hierro (TSI) para preparar 25 tubos grandes, sabiendo que para un litro de medio se debe pesar 62,5 gramos?

5. Se prepara una solución que contiene 6,9 g de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) con 100 g de agua. ¿Cuál es el porcentaje del soluto en esta solución?

Referencias bibliográficas

Brown, A. E. y Smith, H. R. (2017). *Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology* (Fourteenth, Vol. 7). New York: Mc Graw Hill Education.

Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2016). *Brock. Biología de los microorganismos*. Pearson.

Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo.

Rojas-Triviño, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general.* Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira, Colombia, 161.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Whitten, K., Davis, R., Peck, L. y Stanley, G. (2015). *Química*. 10a. edición. Cengage Learning.

Willey, J. M., Sherwood, L. M. y Woolverton, C. J. (2017). *Prescott´s microbiology* (Tenth edit). Mc Graw.

Práctica 4.

Aislamiento y siembra de microorganismos a partir de diferentes ambientes

4.1. Objetivo general

Adquirir destreza en la aplicación de las técnicas de aislamiento, siembra y descripción de los morfotipos de las colonias a partir de microorganismos desde diferentes ambientes.

4.2. Objetivos específicos

- Estudiar las técnicas de aislamiento y siembra desde diferentes ambientes.
- Aprender a diferenciar y caracterizar las distintas formas de las colonias, para agruparlas en morfotipos.
- Comprobar la presencia de microorganismos en todos los hábitats naturales, animales y humanos.

4.3. Introducción

En casi todos los ambientes encontramos microorganismos que se encuentran integrando comunidades mixtas, es decir, poblaciones de diferentes especies, de manera que, para llevar a cabo el estudio de estos microorganismos y de sus propiedades, es muy común separarlos o aislarlos en especies individuales, para obtener **cultivos axénicos** o puros, los cuales contienen un solo tipo de microorganismo y procede generalmente de una sola célula, a esto se le denomina **colonia bacteriana,** la cual es un conjunto de células bacterianas que se pueden observar macroscópicamente y que proceden de una misma célula (Porres y Ruiz, 2018).

4.3.1. Aislamiento

Para obtener cultivos puros a partir de una población microbiana mixta, se utilizan las técnicas de aislamiento, término que es utilizado para referirse a la obtención de colonias puras de un microorganismo (Porres y Ruiz, 2018).

4.3.2. Siembra de microorganismos

Se entiende por siembra al acto de transferir o colocar un microorganismo en un medio de cultivo adecuado, la transferencia se efectúa desde el hábitat natural (nicho ecológico) al medio de cultivo, se efectúan siembras desde distintos ambientes, por ejemplo, de materiales biológicos (esputo, orina, materia fecal, etc.), cuando existe sospecha de infección y se desea aislar el agente causal. También se pueden efectuar siembras desde el agua, suelo, aire, superficies, etc., con esto se demuestra la universalidad de los microorganismo (Vega et al., 2017).

El cultivo de los microorganismos se puede realizar en medio sólido sobre cajas de Petri o en tubos con medio sólido, líquido y en semisólido, además, cuando se realiza la siembra en cajas

de Petri, es posible utilizar diferentes técnicas en función al objetivo final y de la muestra inicial de la que se parta. Aunque los patrones de siembra varían de simples a más complejos, todos están diseñados para separar las células depositadas en la superficie del agar, de modo que las células individuales crecen en colonias aisladas (Leboffe y Pierce, 2016) **(Tabla 4.1 y 4.2)**. Después de la siembra, las muestras se llevan a incubación de acuerdo con las características fisiológicas del microorganismo y la prueba en concreto que se esté realizando **(Figura 4.1)** (Porres y Ruiz, 2018).

Tabla 4.1. *Tipos de siembra. Explicación de los tipos de siembra más común en microbiología.*

TIPO DE SIEMBRA		OBJETIVO	PROCEDIMIENTO
REPIQUE	*En tubo con medio líquido*	Transferir una colonia separada de un medio de cultivo ya existente en el laboratorio, se utiliza para obtener grandes cantidades de biomasa o estudiar características específicas del microorganismo.	Tomar una colonia separada (previamente crecida en el medio de preferencia) de la siguiente manera: Con asa: se sumerge el asa cargada en el medio y se agita. Con pipeta: se vierte el volumen en el caldo y se homogeneiza. Con escobillón: se realiza igual que con el asa.
	En caja de Petri o en tubo con medio sólido	Hacer crecer el microorganismo para conocer su metabolismo, su producción de pigmentos o simplemente conservarlo, se usa para el análisis de alimentos, aguas y otros materiales de importancia sanitaria.	En cajas de Petri, se puede realizar con diferentes técnicas de siembra y herramientas de inoculación. En medios semisólidos se puede usar asa recta.
	Transporte	El transporte seguro de las muestras desde el lugar donde se toma la muestra al laboratorio, para que se mantengan viables los microorganismos.	Tomar la muestra con el escobillón contenido en el tubo estéril, el cual tiene medio especial, por ejemplo, Stuart y componentes como carbón activado, todo esto para asegurar que la muestra perdure durante el traslado, el transporte debe realizarse en una nevera especial.
MEZCLA O EMULSIÓN	*Tubo con medio líquido*	**Sobre superficie inclinada en zigzag:** se usa para obtener masa de microorganismos, renovar cepas (resiembra) y pruebas bioquímicas.	Con el asa bacteriológica esterilizada tomar la muestra e introducirla en el centro del medio líquido, agitándose sin tocar la pared del tubo.

ESTRÍA	*Caja de Petri con medio sólido* **Siembra por agotamiento** Disminuir la cantidad de bacterias presentes para obtener finalmente colonias aisladas, por lo que en el primer cuadrante las estrías deberán ir muy juntas y en los siguientes más separados. **Siembra por cuadrantes** Reducir el inóculo a medida que se realizan estrías en la superficie del agar, con esta técnica se espera que al menos en el cuarto cuadrante (última estría realizada) se encuentren colonias separadas de la bacteria aislada.	**Siembra en estría o en zigzag:** Este patrón de inoculación se suele realizar cuando la muestra no tiene una alta densidad celular y se desea incrementar. Marcar los cuatro cuadrantes por la parte inferior de la caja de Petri y sembrar en el primer cuadrante mediante estrías, flamear el asa y dejar enfriar, arrastrar del cuadrante 1 algunas colonias y sembrar en el cuadrante 2, esterilizar el asa y realizar el paso anterior, para el último cuadrante realizar una estría más suelta y hacia el centro de placa. Dividir la caja de Petri en 4 cuadrantes, esterilizar el asa y realizar estrías en los cuatro cuadrantes (sin esterilizar el asa y sin volver a tomar el inóculo) desde la parte exterior del agar hacia la parte interior, sin salirse del cuadrante.	A partir del inóculo, sembrar con el asa en forma zigzag cada vez más amplio, para ello, el asa debe contactar la superficie del agar, sin hacer presión excesiva, para no romper el medio.
MIXTA	*Tubo agar inclinado*	Se usa para identificar si el microorganismo utiliza los sustratos de forma aeróbica o anoxia.	En un tubo con medio inclinado y con asa recta realizar una picadura profunda y en la superficie realizar una estría ascendente, moviendo el asa en forma de zigzag.
PICADURA	*Superficie caja de Petri*	Obtener crecimiento de UFC lo suficientemente separadas para que no se solapen entre ellas, por ej. en mohos y levaduras el crecimiento es apical y radial.	En una placa con agar realizar tres picaduras superficiales equidistantes, con asa fúngica (aguja de disección) o un palillo estéril siempre con el medio invertido. AGAR OGY, PDA, para cultivo de mohos y levaduras.
	Profunda en tubo	Se emplea para pruebas de identificación, movilidad, pruebas bioquímicas y almacenamiento.	Realizar punción profunda con el asa recta hasta la mitad del medio, teniendo en cuenta que se extrae por la misma línea donde se introdujo, se usa por ejemplo medio de cultivo SIM.
MASIVA O EN PELÍCULA	*Caja de Petri*	Se usa para pruebas de sensibilidad y resistencia.	Con un escobillón estéril tomar inóculo del tubo, eliminar exceso en las paredes de este y sembrar en la caja de Petri pasando el escobillón 2-3 veces, girando la caja y, por último, pasar alrededor de la caja, con el fin de cubrir completamente todos los espacios de la superficie del agar, dejar secar de 4-5 minutos con la caja semiabierta e invertida y colocar los sensidiscos.
	Agitación en frascos	Se pretende obtener una mayor biomasa del microorganismo, ya sea para obtener un mayor crecimiento o sus subproductos.	Adicionar la muestra en un frasco y llevar al agitador horizontal para favorecer el crecimiento.

RECUENTO	*Caja de Petri*	Extensión en superficie	Se utiliza para realizar recuentos o aislamientos a partir de microorganismos suspendidos en una muestra líquida.	En la caja de Petri con el medio verter y extender con el asa Drigalski previamente esterilizada, 0.1ml de la muestra usando una micropipeta.
		Vertido en placa o profundidad	Recuento de M.O viables.	Depositar 1 ml del inóculo, verter de 15-20 ml del medio fundido a 45-55°C, homogenizar, dejar solidificar y llevar a incubar con la caja de Petri invertida.
		Sándwich	Para recuento de anaerobios.	Depositar 1 ml del inóculo, verter de 15-20ml del medio fundido a 45-55°C, homogenizar, dejar solidificar y volver a verter otra capa del medio, llevar a incubar con la caja de Petri invertida.
		Sándwich en tubo	Se usa para esporas clostridium sulfito reductoras.	Llevar al baño maría a 80°C durante 10 minutos 1 ml de la muestra en un tubo estéril, adicionar medio SPS, dejar solidificar, adicionar otra capa de agar y dejar solidificar.
EXPOSICIÓN	*Placa Petri con medio sólido*		Conocer los microorganismos que se encuentran en el medioambiente de un área específica.	Destapar las cajas de Petri y dejarlas expuestas para que se depositen en la superficie los microorganismos que se encuentran suspendidos en el medioambiente de un área específica, por un tiempo de 1 a 2 horas, los medios más comunes son agar nutritivo, sangre, chocolate y OGY.
	Paleta de recuento o contacto		Se basa en una paleta de agar de doble cara que se utiliza para detectar e identificar diversos microorganismos comúnmente presentes en alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos.	Utilizando las dos manos coger el tapón y la lengüeta final del laminocultivo, flexionar el tapón formando un ángulo de 90° y poner en contacto el agar con la superficie a muestrear (o sumergirlo en caso de que la muestra sea líquida), realizar una ligera presión uniforme con ambas manos para facilitar el contacto, introducir el laminocultivo en su tubo original y enroscarlos sin cerrar totalmente, incubar a 37°C durante 24-48h, para hongos y levaduras prolongar la incubación 24-48h adicionales a 25°-30C.
ROLL TUBE	*En tubo con agar semisólido*		Crecimiento y recuento de bacterias viables en anaerobiosis, se usan medios BBL.	Insertar la aguja a través del tapón e inyectar la muestra en el medio, retirar la aguja lentamente para no introducir aire en el tubo, los organismos para el subcultivo en este medio, primero, deben aislarse en cultivo puro en un medio sólido apropiado, preparar una suspensión del cultivo puro en 0,5–1,0 ml de caldo reducido estéril e inocular el tubo con una o dos gotas, para lograr el enriquecimiento, inocular el medio previamente reducido con una o dos gotas de muestra después de inocular los medios en placa primarios.

			Preparar los tejidos y otras muestras sólidas triturando y pulverizando la muestra en 0,5–1,0 ml de caldo reducido estéril e inocular el tubo con una o dos gotas. Inocular los tubos a 35 ± 2 ºC durante un máximo de una semana antes de descartarlos como negativos. Para actinomicosis, osteomielitis, endocarditis y otras infecciones graves presuntivas, incubar los tubos durante un máximo de dos semanas antes de descartarlos como negativos.
FILTRACIÓN POR MEMBRANA	*En caja de Petri*	Determinar la presencia de coliformes fecales y enterococos de una muestra de agua	Pasar el agua por el filtro, posteriormente, colocar este filtro sobre la superficie del medio de cultivo adecuado como por ejemplo el agar Endo y se lleva a incubar.

Fuente: Autores (2023).

Tabla 4.2. *Tipo de siembra según el medio.*

En medio líquido	En medio sólido	En medio semisólido
Con asa recta o redonda Se sumerge el asa cargada en el medio y se agita, (el inóculo no debe generar turbidez al sembrar.	*Placa de Petri* Por extensión en superficie: con espátula de Drigalski. Por estrías: con ansa en anillo o ansa recta. Por placa vertida: inóculo más agar fundido y enfriado a 45-50°C.	*Medios semisólidos* Por punción
Con pipeta: Se vierte el contenido de la pipeta sobre el medio de cultivo y se homogeneiza.	*En superficie inclinada (pico de flauta)* *Por estrías o por contacto.*	
Con escobillón: Se realiza de igual modo con el asa.		

Fuente: Autores (2023).

4.4. Equipos

Mechero Bunsen**,** incubadora, gradilla, medidor de turbidez McFarland, (si no se tiene se puede hacer una comparación visual con los patrones McFarland previamente preparados), equipo de filtración de membrana estéril, estereoscopio, cámara de flujo laminar.

4.5. Insumos y materiales

- Caja de Petri con los medios de cultivo: agar sangre (4), agar a elección (5), agar nutritivo, agar Sabouraud, agar Endo, agar chocolate, agar Mueller Hilton o Tinsdale, agar Enterococcus, tubos de ensayo con caldo nutritivo (2), tubos con medio sólido inclinado, tubo con caldo BHI, tubo estéril con solución salina (2).

- Asa de inoculación redonda, guantes y tapaboca, escobillón estéril (2), pinzas de disección o dispensador automático de antibióticos para antibiograma, discos antibióticos para usar como por ejemplo, ampicilina, tetraciclina, amikacina y ertapenemen, tubo estéril tapa roja para trasladar el catéter, hisopo de algodón estéril, bajalenguas, filtros estériles de 45 (2), pinzas de punta roma, un vaso de precipitados con alcohol, pipeta estéril o cilindro graduado, según sea necesario, agua de enjuague esterilizada, cubre y portaobjetos.

4.5.1. Material biológico

Orina, materia fecal, colonias de *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *S. aureus*, para hacer repique.

4.6. Procedimiento

4.6.1. Siembra de una muestra líquida y sólida en un medio líquido, mediante la técnica de mezcla o emulsión

Este procedimiento se utiliza para estudiar las características específicas del microorganismo sembrado o para obtener grandes cantidades de biomasa (Porres y Ruiz, 2018), se pueden utilizar cepas puras o líquidas de diferentes procedencia como sangre que no sea en hemocultivo, líquidos unidad renal, peritoneal, pericárdico, cefalorraquídeo o sólidas como las heces.

1. Ubicar los tubos que se vayan a sembrar en una gradilla y rotularlos.
2. Sostener el asa de siembra con la mano dominante y esterilizarla en la llama hasta observar incandescencia, mantener el asa en las inmediaciones de la llama para mantener la esterilidad y esperar que se enfríe.
3. Destapar el frasco donde se encuentra la muestra, introducir el asa y tomar el inóculo.
4. Con la mano no dominante agarrar el tubo que contiene caldo nutritivo y con el meñique de la mano dominante y sin soltar el asa, destapar el tubo y sostener con ese dedo la tapa, con la parte inferior del mismo (la que está en contacto con el interior del tubo) mirando hacia abajo, evitando tocar cualquier superficie o la palma de la mano, para evitar contaminaciones.
5. Flamear la boca del tubo, introducir el asa con el inóculo hasta tocar el caldo nutritivo y golpear las paredes del tubo con el asa suavemente, poner el tapón.
6. Esterilizar el asa y llevar a incubación por 24h a 37°C.
7. Observar el crecimiento y registrar los resultados.

4.6.2. Siembra de una muestra líquida en un medio sólido mediante la técnica de raya

Con esta técnica de siembra se busca obtener colonias aisladas para realizar identificación bacteriana, pero si se desea hacer recuento se debe utilizar asa calibrada, se pueden utilizar diferentes muestras líquidas.

1. Rotular la caja de Petri en la que se va a realizar la siembra por la parte inferior con la fecha y el número o código de la muestra.
2. Flamear el asa hasta observar incidencia, sostenga el asa verticalmente, sumérjala en la muestra de orina, luego retírela con cuidado para obtener el volumen correcto de orina, no la incline hasta que la coloque en su posición sobre la placa.
3. Inocular el agar sangre posicionando el asa inicialmente en un punto del agar (**Figura 4.1**),

depositar la mayor cantidad de muestra allí, posteriormente, deslizar el asa con cuidado realizando una sola línea a lo largo del diámetro de la placa.

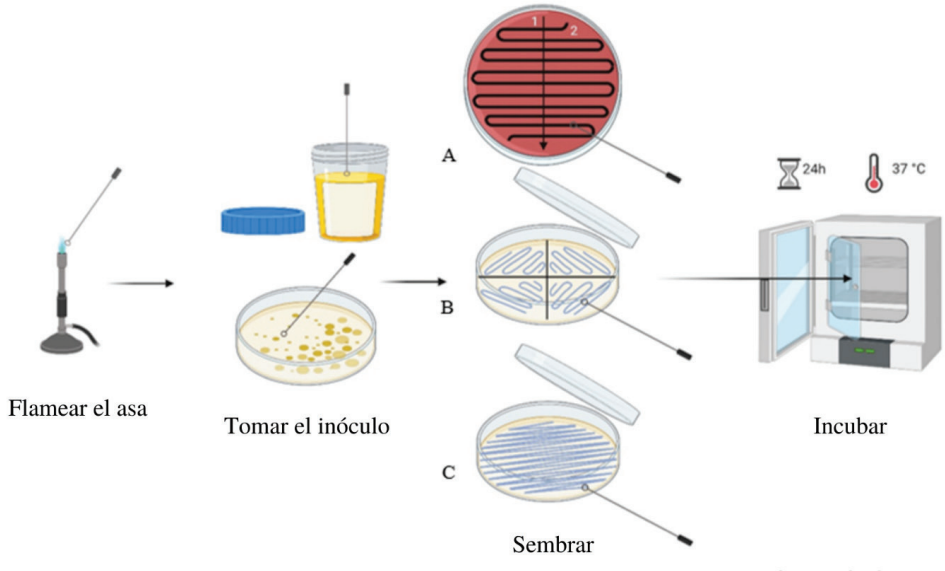
4. Sin flamear el asa, extender la muestra por toda la superficie del agar realizando estrías en forma de zigzag, tratando de llenar toda la placa sin dañar el agar.

5. Invierta e incube la placa durante 24 horas a 37° C.

6. Retire la placa de la incubadora, observe las colonias y registre los resultados.

Nota: tener en cuenta cualquier morfología de colonia diferente indicaría una posible colonización por más de una especie (Leboffe y Pierce, 2016), si sembró con asa calibrada podrá realizar recuento de colonias.

Figura 4.1. *Técnicas de siembra.* ***A:*** *Siembra en raya.* ***B:*** *Siembra por estría con división de la caja de Petri en cuatro cuadrantes.* ***C:*** *Siembra en estría.*



Fuente: Autores (2023).

4.6.3. Siembra de una muestra sólida en medio sólido mediante la técnica de estría

Esta técnica se usa para hacer identificación bacteriana de muestras, como por ejemplo, materia fecal, secreción vaginal, pus (la secreción de un absceso) o hacer repique con colonias ya existentes en el laboratorio.

1. Rotular la caja de Petri en la que se va a realizar la siembra por la parte inferior con la fecha y el número o código de la muestra.

2. Esterilizar el asa de siembra calentándose hasta observar incandescencia, esperar que se enfríe, sin alejar de la zona de esterilidad, sujetándola con la mano dominante.

3. Tomar el inóculo correctamente, ya sea de una muestra fresca o de una colonia ya existente.

4. En el agar elegido, sembrar mediante estrías toda la caja, teniendo cuidado de no presionar muy fuerte para no cortar el agar, al terminar esterilizar el asa.
5. Cuando se tienen varias muestras se divide la caja de Petri en 4 cuadrantes y se realiza la siembra por estría en cada uno de estos cuadrantes, para cada especie sembrada se deberá flamear el asa.
6. Llevar a incubación las cajas de Petri en posición invertida.
7. Registrar los resultados observados.

4.6.4. Siembra mediante la técnica de agotamiento o estría múltiple

La siembra por estría es un método rápido de aislamiento cualitativo, es una técnica de dilución que extiende una muestra de cultivo sobre la superficie de una placa de agar, para separar y diluir los microorganismos y asegurar el crecimiento de colonias individuales (Cappuccino y Welsh, 2019). Para sembrar por estría, imagine una línea que divide la caja de Petri en 4 cuadrantes y, luego, si proceda con la técnica indicada en cada cuadrante como lo ilustra la figura a continuación **(Figura 4.2)**.

CONSEJO PARA LA PRÁCTICA: el objetivo es ir disminuyendo la cantidad de bacterias presentes para obtener finalmente colonias aisladas, por lo que en el primer zigzag, las líneas deben estar muy juntas y en los siguientes, cada vez más separadas.

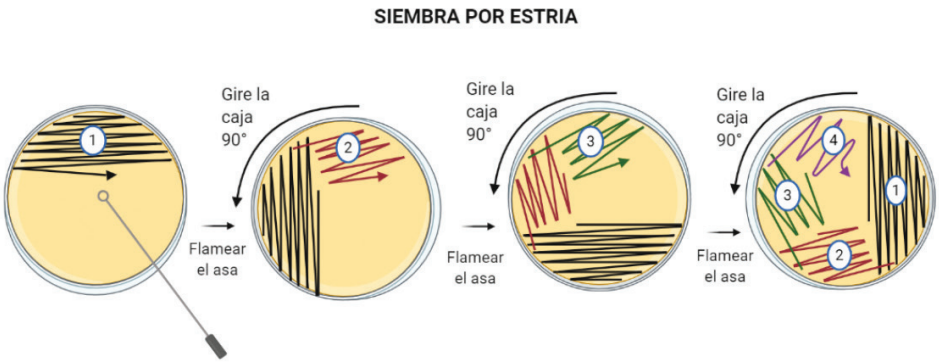
1. Rotular la caja de Petri en la que se va a realizar la siembra, por la parte inferior, la fecha y el número o código de la muestra.
2. Esterilizar el asa de siembra calentándose hasta observar incandescencia, esperar que se enfríe, sin alejar de la zona de esterilidad, sujetándola con la mano dominante.
3. Si la muestra procede de otra caja de Petri, tomar una colonia con el asa, si la muestra procede de un tubo con medio líquido, abrir el tubo sujetando el tapón con el dedo meñique de la mano dominante (en la que se sigue sosteniendo el asa), flamear la boquilla del tubo, introducir el asa sumergiéndola en el medio, sacar el asa y cerrar el tubo.
4. Abrir la caja de Petri cogiéndola con la mano no dominante. Posar el asa de siembra con el inóculo y deslizar por la superficie con un movimiento en zigzag, cubriendo alrededor de un tercio de esta.
5. Flamear el asa en la llama y dejar enfriar.
6. Girar la placa de Petri 90° tocar con el asa en el final de superficie sembrada y deslizar de nuevo con un movimiento de zigzag hasta cubrir el otro tercio de la superficie.
7. Flamear el asa en la llama y dejar enfriar.
8. Repetir el paso 6 y realizar una cuarta estría repitiendo los pasos 5 y 6 nuevamente.
9. Flamear el asa, cerrar la caja de Petri e incubar.

Nota: si lo que se pretende es generar gran cantidad de biomasa bacteriana, realizar una única estría por toda la superficie, girar la placa y volver a extender deslizando el asa de nuevo por toda la superficie sobre la siembra.

Ejercicio

- Tomar la caja de Petri con agar MacConkey o el elegido por el docente y realizar una siembra en estría en el cuadrante 1, flamear el asa y girar la caja 90° a su izquierda para sembrar el cuadrante 2, flamear el asa y repetir el procedimiento en el cuadrante 3 y 4, como se muestra en la **Figura 4.2.** Utilice las bacterias proporcionadas por el laboratorio, las de uso más común para aprender esta técnica son: *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *S. aureus*.

Figura 4.2. *Técnica de siembra por agotamiento, donde se describe paso a paso como debe realizarse, para tener colonia aisladas.*



Fuente: Autores (2023).

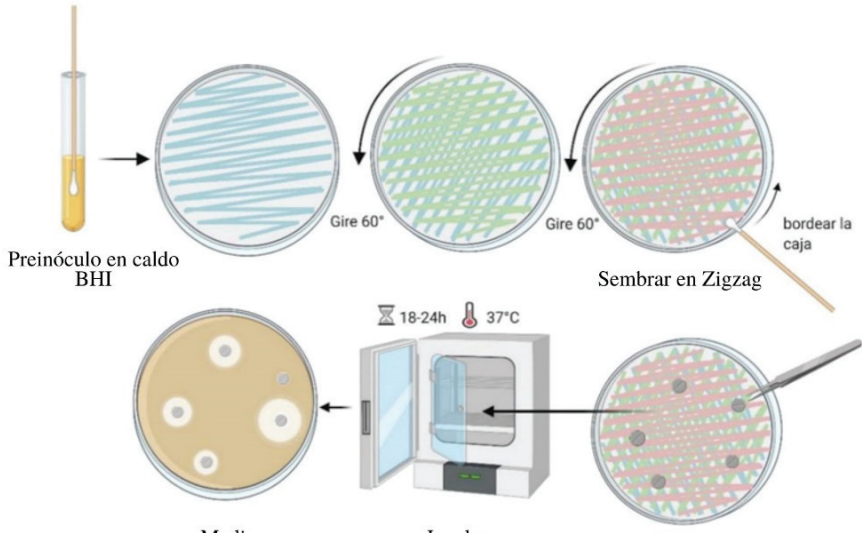
4.6.5. Siembra mediante la técnica masiva o en película

Este tipo de siembra se usa cuando queremos obtener una gran cantidad de colonias, por ejemplo, en pruebas de resistencia antimicrobiana. Los antibiogramas se pueden realizar de muchas maneras, pero siempre siguiendo las recomendaciones dadas por las sociedades responsables **(Figura 4.3)** (EUCAST o CLSI) (Porres y Ruiz, 2018).

1. Realizar un preinóculo en caldo BHI de 12 a 24 horas antes, ajustar la concentración 0.5 en la escala McFarland.
2. Rotular la placa de agar Mueller Hinton con la fecha y el nombre del microorganismo a evaluar.
3. Con el dedo meñique destapar el tubo que contiene el microorganismo en caldo BHI y flamear con cuidado la boquilla, introducir el escobillón estéril, tapar el tubo.
4. Sembrar de forma masiva en el agar (MH).
5. Una vez sembrada la placa de manera homogénea, tener las pinzas esterilizadas, o desinfectarlas, para ello, se sumerge la pinza en alcohol y, luego, se pasa por la llama del mechero Bunsen y se deja enfriar en la zona estéril alrededor de la llama, si se va a usar dispensador de antibióticos omitir el paso anterior.
6. Con las pinzas tomar del envase del antibiótico, un disco y ponerlo sobre el agar sin tocarlo con las pinzas, si esto sucede volver a desinfectar las pinzas, presionar suavemente sobre la superficie del disco para fijarlos al agar, repetir esta acción con los discos a evaluar.

7. Si se realiza con el dispensador de discos se debe cargar previamente con los discos a testar, corroborar la altura del dispensador, suficiente para que deposite los discos sin contaminarse con la placa sembrada y presionar el dispensador.
8. Incubar la placa hacia abajo a 37°C durante 18 a 24 horas, tras la incubación se observarán halos de inhibición de crecimiento alrededor de los discos.
9. Registre los resultados.

Figura 4.3. *Técnica de siembra masiva o en película. Paso a paso para realizar un antibiograma.*



Fuente: Autores (2023).

4.6.6. Siembra en medio sólido inclinado mediante la técnica de estría

Este tipo de siembra se utiliza para el crecimiento de organismos en aerobiosis, la preparación del medio inclinado permite que exista una mayor superficie sobre la cual sembrar en un espacio relativamente pequeño, por lo que el riesgo de contaminación es menor (Porres y Ruiz, 2018).

CONSEJO PARA LA PRÁCTICA: realizar todo el procedimiento en inmediaciones de la llama del mechero Bunsen para evitar contaminaciones.

1. Ubicar los tubos que se vayan a sembrar en una gradilla y rotularlos como indique el docente.
2. Flamear el asa de siembra en la llama del mechero Bunsen hasta observar incandescencia, dejar enfriar y mantenerla cerca de la zona de esterilidad.
3. Sostener con la mano no dominante el tubo o la placa donde se encuentra la muestra de la bacteria que se va a sembrar, en caso de que sea una placa abrir la tapa, en caso de que sea un tubo quitar su tapa con el dedo meñique de la mano dominante sin soltar el asa, la parte inferior de la tapa del tubo que está en contacto con el medio debe mirar hacia abajo y no se debe soltar sobre ninguna superficie ni debe tocar la palma de la mano, para evitar contaminaciones.
4. Flamear ligeramente la boca del tubo si este es de vidrio, introducir el asa y coger el

inóculo, sacar el asa con cuidado sin tocar las paredes, flamear ligeramente la boquilla del tubo y ponerle la tapa, si la muestra proviene de una caja de Petri, tomar una colonia que se encuentre separada de las otras.

5. Con la mano no dominante tomar uno de los tubos que se encuentran en la gradilla donde se desee realizar la siembra y realizar el mismo procedimiento del paso 3, flamear ligeramente la boquilla.
6. Introducir el asa dentro del tubo de siembra e ir depositando el inóculo sobre la parte inclinada del agar e ir deslizando en forma de Zigzag el asa de manera ascendente, hasta cubrir toda la superficie.
7. Flamear la boca de los tubos, cerrarlos y dejarlos en la gradilla.
8. Flamear el asa de siembra con el mechero, y llevar a incubar las muestras sembradas.

Nota: para la incubación en aerobiosis, no es necesario realizar ningún procedimiento específico, simplemente se introducen las placas, tubos o matraces en la incubadora que se vaya a usar a la temperatura deseada, durante el tiempo requerido, normalmente el tiempo varía entre 18 a 48 horas, aunque existen excepciones.

4.6.7. Siembra mixta en medio sólido inclinado

Se usa en algunas pruebas de identificación bioquímica, como en el agar *TSI* donde se realiza estría en la superficie para que el microorganismo crezca en aerobiosis, pero también se realiza una punción con asa recta para el crecimiento en **anaerobiosis** en el fondo del tubo (debe haber suficiente medio en el fondo del tubo para ello) **(Figura 4.4)** (Porres y Ruiz, 2018).

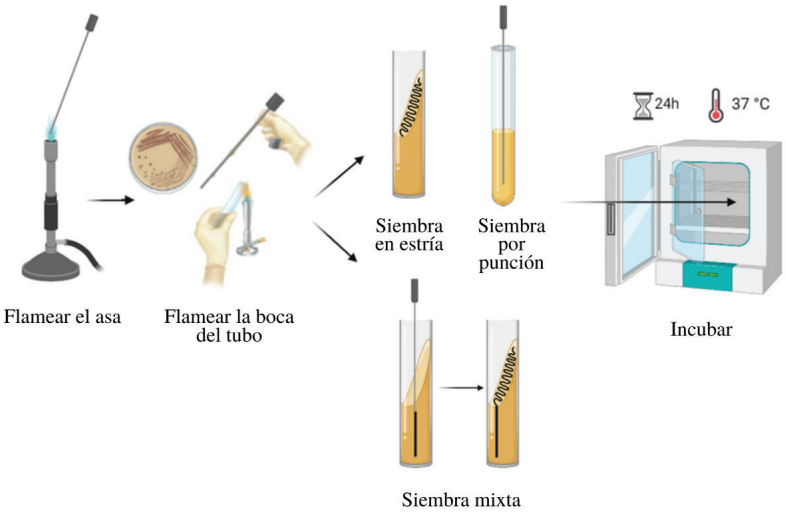
Flamear el asa recta y tomar el inóculo siguiendo los pasos del 1 al 5 del procedimiento anterior para la siembra en tubo inclinado.

Insertar el asa en profundidad en el agar en paralelo a la pared del tubo, dejando un espacio sin penetrar el fondo, inmediatamente se termina de realizar la punción (sin volver a tomar inóculo) sembrar en la superficie inclinada en forma de zigzag de manera ascendente.

Flamear la boquilla del tubo sembrado, ponerle la tapa y dejarlo en la gradilla.

Flamear el asa recta y llevar a incubación.

Figura 4.4. *Siembra en tubo.* ***A****: En medio sólido inclinado por estría.* ***B:*** *En medio semisólido por punción.* ***C:*** *Siembra mixta, donde se realiza primero la punción y luego una siembra por estría.*



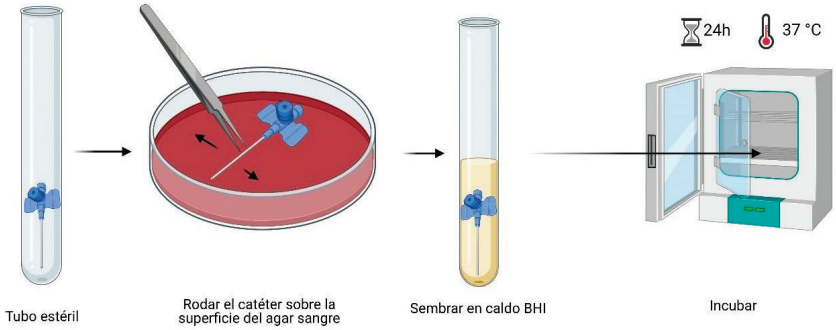
Fuente: Autores (2023).

4.6.8. Siembra del catéter mediante la técnica de MAKI

Es una prueba específica, para determinar si la enfermedad nosocomial que presenta el paciente es causada por el catéter, el paciente debe presentar síntomas como fiebre, dolor, enrojecimiento de la zona, entre otros **(Figura 4.5)**.

1. Retirar con cuidado el catéter del paciente y depositarlo en un tubo estéril, llevar al laboratorio de inmediato en una nevera de transporte de hemoderivados.
2. Sacar el catéter con una pinza estéril, colocarlo sobre el agar sangre, rodando a la derecha y a la izquierda.
3. Posteriormente, sumergirlo en un tubo con caldo BHI y llevar a incubar las dos siembras por 24 horas.
4. Observar el crecimiento de bacterias, si aparecen UFC en 15 unidades formadoras de colonias indica que el catéter está contaminado, en el caldo BHI se debe observar turbidez.
5. Una vez se confirma la presencia de bacterias, observar las características de las colonias y hacer las pruebas de identificación para Gram + o –, si hace hemólisis, prueba de la catalasa, coagulasa, fibrinolisina. Debe hacerse una batería hasta llegar a la especie de bacteria que está causando la enfermedad nosocomial.

Figura 4.5. *Siembra del catéter mediante la técnica de MAKI.*



Fuente: Autores (2023).

4.7. Ambientes de muestreo

4.7.1. Siembra de microorganismos de la garganta y la piel

Las especies de estreptococos son los organismos predominantes en los cultivos de garganta y algunas son la principal causa de dolores de garganta bacterianos (faringitis aguda), son Gram positivos y catalasa negativos, y se identifican por sus características bioquímicas, incluidas las reacciones hemolíticas y las características antigénicas (sistema de Lancefield). Las reacciones hemolíticas, se basan en hemolisinas que son producidas por estreptococos, mientras crecen en agar enriquecido con sangre pueden ocurrir tres patrones de hemólisis.

a. **Alfa-hemólisis:** zona verde y turbia alrededor de la colonia. La destrucción parcial de los glóbulos rojos se debe al peróxido de hidrógeno producido por bacterias.

b. **Beta-hemólisis**: hemólisis completa, dando una zona clara con un borde limpio alrededor de la colonia.

c. **Gamma-hemólisis:** sin hemólisis y sin cambios en el agar sangre alrededor de la colonia (Johnson y Case, 2019).

4.7.2. Procedimiento para tomar la muestra de garganta

1. Introducir el baja lenguas y con un hisopo de algodón estéril obtener una muestra del paladar o amígdala, girando el hisopo vigorosamente sobre su superficie sin tocar la lengua.
2. Colocar el hisopo en un tubo con solución salina y mezclar hasta obtener una suspensión uniforme, descarte el hisopo en una solución desinfectante.
3. Con un asa de inoculación estéril, sembrar por agotamiento una placa de agar sangre, agar chocolate, agar salado manitol y telurito de Mueller-Hinton o agar Tinsdale, todas las cajas deben estar previamente etiquetadas con la fuente de la muestra.
4. Incubar la placa de agar chocolate invertida en una incubadora de CO2, en una bolsa de incubación de CO2 o en un frasco de vela. Si usa el frasco de velas encienda una vela en un frasco desecador y cubra el frasco herméticamente para saturar el ambiente de CO2, a una concentración del 5% al 10%, valor requerido para el crecimiento de Neisseria. Incube el frasco durante 48 horas a 37°C.

4.7.3. Procedimiento para tomar la muestra de piel

1. Con un hisopo estéril y humedecido en solución salina estéril, obtener la muestra de la piel frotando vigorosamente sobre la superficie de interés.
2. Colocar el hisopo en un tubo con solución salina estéril y mezclar la solución.
3. Mediante la técnica de agotamiento, inocular una placa de agar sangre, agar sal manitol y agar Sabouraud.
4. Llevar a incubación a 37°C de 24 a 48 horas el agar salado manitol y el agar sangre. Invierta la caja de Petri con agar Sabouraud y llevar a incubación durante 48 horas a 25°C **(Figura 4.7).**

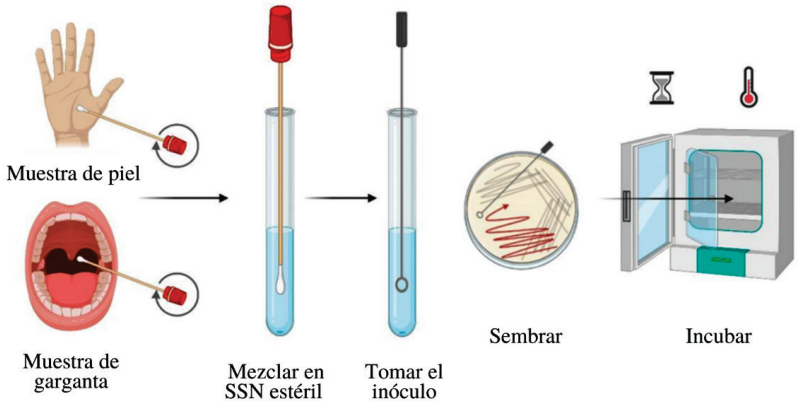
4.7.4. Selección y diferenciación de aislamientos de garganta y piel

1. Examine los cultivos en placa de agar sangre en busca de zonas de hemólisis.
2. Agregue oxalato de p-aminodimetilanilina a la superficie del crecimiento en la placa de agar chocolate. Observe la aparición de un color rosado-morado a negro en la superficie de cualquiera de las colonias.
3. Examine el telurito de Mueller-Hinton o la placa de agar Tinsdale para detectar la presencia de colonias negras.
4. Examine la placa de agar Sabouraud en busca de un crecimiento similar a un moho.
5. Examine la placa de agar con sal manitol para detectar la presencia de crecimiento que sea indicativo de Estafilococos, luego examine el color del medio que rodea el crecimiento, un color amarillo es indicativo de *S. aureus*.
6. Registre sus observaciones en el informe de laboratorio e indique los tipos de organismos que pueden estar presentes en cada muestra.

4.7.5. Tinción y características morfológicas de los aislados de garganta y piel

1. Preparar dos frotis para hacer tinción Gram de cada uno de los cultivos de agar sangre, eligiendo colonias bien aisladas que difieran en su apariencia y demuestren actividad hemolítica, observar microscópicamente la reacción de Gram, el tamaño, la forma y la disposición de las células, registrar las observaciones en el informe de laboratorio e intentar identificar cada aislamiento.
2. Preparar dos frotis teñidos con azul de lactofenol de organismos obtenidos de colonias discretas que difieran en apariencia en el cultivo de agar Sabouraud. Observar microscópicamente, dibujar un campo representativo en el informe de laboratorio, intentar identificar los hongos.

Figura 4.6. *Siembra de microorganismos* ***A:*** *Muestra de la garganta.* ***B:*** *Muestra de la piel.*



Fuente: Autores (2023).

4.7.6. Siembra por medio de la técnica de filtración por membrana

La técnica de filtración por membrana, se usa para determinar la presencia de coliformes fecales y enterococos de una muestra de agua y consiste en hacer pasar el agua por unos filtros finos con un tamaño de poro de 0.45 µm, los cuales sirven para la mayoría de las bacterias, estas quedan retenidas en el filtro, que luego se coloca en un medio de cultivo adecuado. En condiciones de campo, los nutrientes se agregan a una almohadilla absorbente gruesa sobre la que se coloca el filtro, permitiendo que estos se difundan a través del filtro y sean metabolizados por bacterias que quedan atrapadas en el filtro, posteriormente, cada una de las bacterias que están allí, se convertirán en una colonia facilitando el conteo de estas, pero cuando se usan medios selectivos o diferenciales como el agar Endo, las colonias tendrán un aspecto distintivo. El agar Endo se diferencia en que las colonias de bacterias que fermentan la lactosa tienen colonias de rosa a rojo con un brillo verde metálico **(Figura 4.7)** (Johnson y Case, 2019).

Primera parte

1. Configurar el equipo de filtración, retirar los envoltorios a medida que encaja cada pieza en su lugar.
2. Conectar la trampa del filtro a la fuente de vacío.
3. Colocar la base del portafiltro (con tapón) sobre el matraz de filtración, enseguida poner el matraz en la trampa del filtro.
4. Usando las pinzas estériles, colocar un filtro en el portafiltros.
5. Colocar el embudo en el soporte del filtro y fijarlo en su lugar.
6. Agitar bien la muestra de agua para resuspender todo el material, verter o pipetear un volumen medido en el embudo, el volumen lo indicará el docente (para muestras de 10 ml o menos, vierta primero 20 ml de agua esterilizada en el embudo).
7. Encender el vacío y dejar que la muestra pase al matraz de filtrado. Dejar la aspiradora encendida.
8. Verter el agua de enjuague estéril en el embudo, girar el embudo mientras vierte para lavar

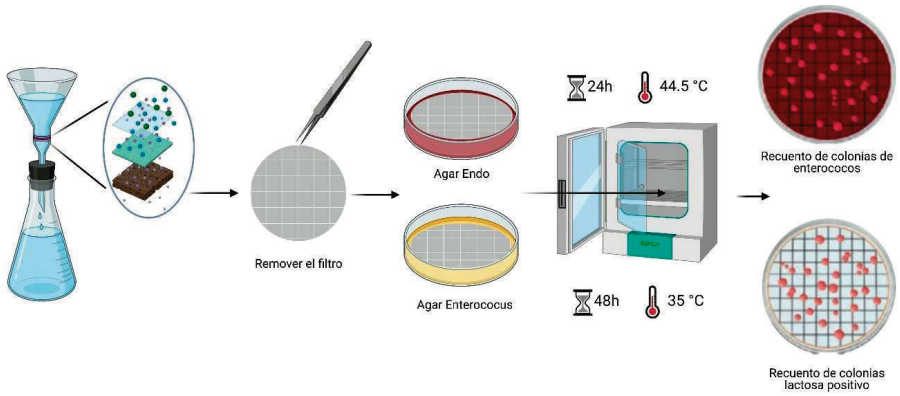
las bacterias de los lados del embudo. (Utilizar el mismo volumen que la muestra). Dejar que el agua de enjuague pase a través del filtro, apagar la aspiradora.

9. Inocular el filtro.
10. Retirar con cuidado el filtro del portafiltros con unas pinzas estériles.
11. Colocar con cuidado el filtro sobre el agar Endo. No doblar el filtro; colocar un borde hacia abajo primero, luego coloque con cuidado el resto. No dejar espacios de aire entre el filtro y el agar.
12. Colocar el filtro en el agar como estaba en el soporte del filtro.
13. Invertir la placa e incubar durante 24 horas a 44,5 ° C.
14. Repetir los pasos 1, 2 y 3 utilizando la misma fuente de agua. Colocar el filtro en agar Enterococcus. Invierta la placa e incube durante 48 horas a 35 ° C **(Ver Figura 4.7).**

Segunda parte

1. Examinar la placa Endo usando un estereoscopio. En agar Endo, los coliformes formarán colonias rojas con un brillo metálico verde. Cuente las placas con 20 a 80 colonias de coliformes y no más de 200 colonias de todos los tipos.
2. Examine la placa de Enterococcus con un estereoscopio. En agar Enterococcus, los enterococos formarán colonias rojas. Cuente las placas con 20 a 60 colonias de enterococos y no más de 200 colonias de todos los tipos.
3. Calcule las bacterias en la muestra de agua original: número de coliformes fecales (o enterococos) por 100 ml de agua =100 número de colonias de coliformes fecales (o enterococos) / volumen de muestra filtrada.

Figura 4.7. *Técnica de siembra por filtración de membrana en diferentes agares.*



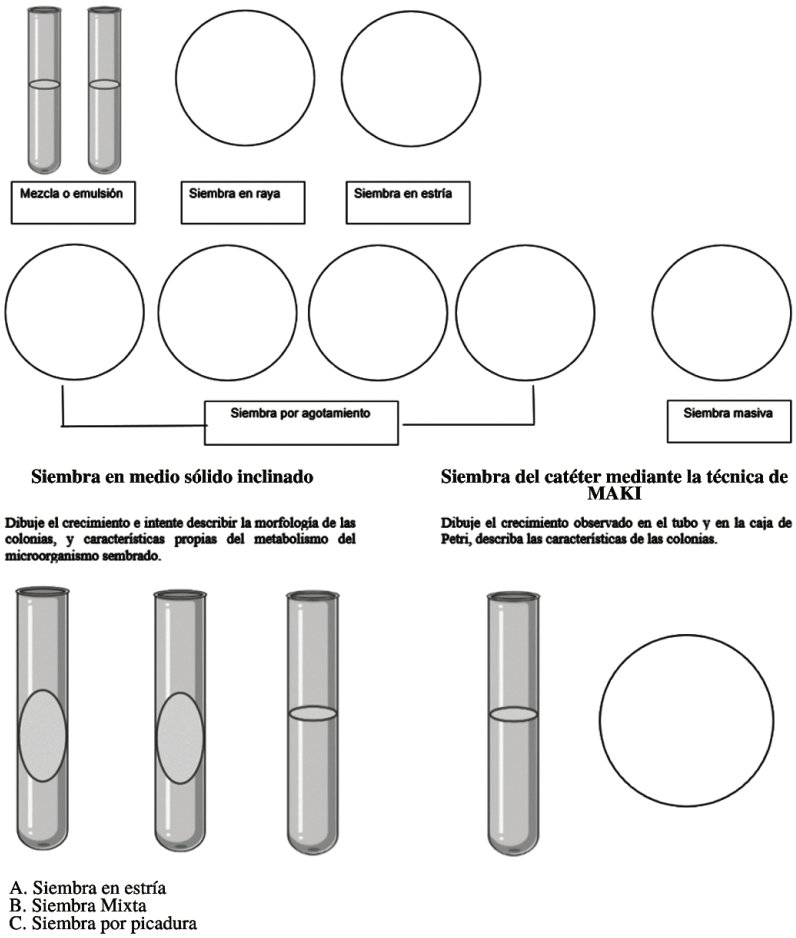
Fuente: Autores (2023).

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo de los tipos de siembra.
https://youtu.be/ADQQUmTGrss

4.8. Resultados

Dibuje el crecimiento observado, identifique la morfología de las colonias y describa las características propias del metabolismo del microorganismo sembrado **(Figura 4.8)**.

Figura 4.8. *Resultados obtenidos a partir de los distintos tipos de siembra.*



Fuente: Autores (2023).

Diga ¿cuáles son las especies encontradas en los diferentes aislados, así como las características metabólicas propias de los microorganismos?

Tabla 4.3. *Siembra de microorganismos de la garganta y de la piel.*

Medios de cultivo	Especies de bacterias en garganta	Especies de bacterias en la piel

Fuente: Autores (2023).

Tabla 4.4. *Tinción y características morfológicas de los aislados de piel y garganta.*

Especímenes	Aislado 1	Aislado 2
De la piel Dibuje un campo representativo		
De la garganta Dibuje un campo representativo		

- Describa la morfología, organismos, tinción Gram:

Fuente: Autores (2023).

4.9. Cuestionario

1. ¿Qué muestra (s) de agua es (son) potable?, ¿qué muestras de agua están contaminadas con materia fecal?
2. ¿Qué suposición básica se hace en esta técnica si el número de bacterias se determina a partir del número de colonias?
3. ¿*E. coli* crecerá en agar Enterococcus y Enterococcus crecerá en agar Endo? Explica brevemente.
4. ¿Por qué se puede utilizar la filtración para esterilizar los medios de cultivo?
5. Si utilizó la técnica de tubos múltiples, enumere una ventaja y una desventaja de cada método de detección de coliformes.
6. ¿Por qué es útil la técnica del filtro de membrana para un sanitario que trabaja en el campo?

Tabla 4.5. *Información de apoyo para describir los resultados obtenidos en cada uno de los medios de cultivo realizados.*

EN MEDIO SEMISÓLIDO	• Desarrollo • Movilidad
EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS	**Crecimiento en superficie** **Floculento:** contiene masas de formas diversas que flotan en el medio líquido. **En anillo:** desarrollo adherido al vidrio en el borde de la superficie del líquido de cultivo. **En película:** desarrollo de una capa delgada uniforme.
	Sedimento **Características**: compacto, granular, grumoso, escamoso, viscoso. **Cantidad de sedimento:** Abundante, escaso, nulo.
	Turbidez **Características:** ligera, regular, intensa, transitoria, persistente, nula.
EN MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS	**En agar nutritivo inclinado:** Desarrollo abundante, moderado o escaso.
	En agar sangre observar: **Alfa hemólisis:** hemólisis parcial, observándose un halo de hemólisis de color verde alrededor de la colonia. **Beta hemólisis:** en este caso hay hemólisis total y alrededor de la colonia se observa un halo transparente. **Gamma hemólisis:** cuando no se observa hemólisis ni en la superficie ni en la profundidad del medio de cultivo, ejemplo típico: *Enterococcus faecalis.*

En agar nutritivo en placa Petri: Desarrollo con o sin aislamiento. En caso de aislamiento exitoso se pueden observar colonias. Toda especie bacteriana en medio de cultivo **sólido** forma un tipo característico de agrupación llamada **colonia.** Una colonia es la progenie de una sola célula al proliferar en un medio de cultivo sólido. **Importante: NO se forman colonias en medios de cultivo líquidos.**
Forma **Puntiforme:** muy pequeñas, pero visibles a simple vista, diámetro menor de 1 mm. **Circular:** diámetro mayor de 1 mm **Rizoide:** ramificada en forma de raíces En forma de huso
Elevación, altura o perfil • Plana • Convexa • Pulvinada • Pitting
Margen, contorno o borde • Entero • Ondulado: borde sinuoso • Lobulado • Mellado: con muescas irregulares • Filamentosa: forma de largos hilos • Festoneado
Otras características **Brillo:** vivo, opaco, metálico, iridiscente. **Olor:** ausente, pronunciado. **Consistencia:** (usar ansa recta para ensayar): cremosa, seca, mucoide.

Fuente: Vega et al. (2017).

Referencias bibliográficas

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Johnson, T. R. y Case, C. L. (2019). Laboratory experiments in microbiolgy. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Twelf edit, Vol. 53). NY: Pearson.

Leboffe, M. J. y Pierce, B. E. (2016). *Microbiology: laboratory theory & application, brief.* (Third edit). Morton publishing Company.

Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo.

Vega, A. E., Favier, G. I., Escudero, M. E., Estrada, C. L., Cáceres, C. S. y Arismendi-Sosa, A. C. (2017). *Serie didáctica: material didáctico para estudiantes, guías de trabajos prácticos: microbiología.* En Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia Universidad de San Luis. San Luis.

Práctica 5.

Pruebas bioquímicas

5.1. Objetivo general

Conocer las diferentes pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de géneros y especies de microorganismos.

5.2. Objetivos específicos

- Conocer la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de los microorganismos.
- Reconocer las pruebas bioquímicas específicas para la identificación de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Identificar la clasificación de las pruebas bioquímicas (pruebas con lectura inmediata, pruebas rápidas y pruebas lentas).

5.3. Introducción

Las pruebas bioquímicas permiten identificar las características metabólicas de las bacterias en estudio. Los resultados podrán leerse en un corto periodo de tiempo o podrán requerir un periodo mayor de incubación, así, las diferentes pruebas pueden clasificarse en tres grupos, lectura inmediata que se utilizan en los primeros niveles de identificación fenotípica, pruebas rápidas que se leen en menos de 6 horas y pruebas lentas que se leen en un periodo de 18 a 48 horas tras la incubación. Muchas de las pruebas pueden realizarse con tiras, discos, reactivos y otros elementos que se pueden obtener comercialmente o prepararse en el laboratorio (Porres y Ruiz, 2018).

Los microorganismos deben identificarse por una amplia variedad de razones, que incluyen:

1. Determinación de patógenos responsables de enfermedades infecciosas.
2. Selección y aislamiento de cepas de microorganismos fermentativos necesarios para la producción industrial de alcoholes, solventes, vitaminas, ácidos orgánicos, antibióticos y enzimas.
3. Aislamiento y desarrollo de cepas microbianas adecuadas, necesarias para la fabricación y mejora de la calidad y el sabor en ciertos alimentos.
4. Comparación de actividades bioquímicas con fines taxonómicos.

Para realizar estas tareas, se parte del hecho de que todos los microorganismos tienen sus propias características bioquímicas de identificación. Estas denominadas huellas dactilares

bioquímicas, son controladas por la actividad enzimática de las células y son responsables de la bioenergética, la biosíntesis y la biodegradación.

La suma de todas estas reacciones químicas, se define como metabolismo celular y las transformaciones bioquímicas, que ocurren tanto dentro como fuera de la célula están gobernadas por catalizadores biológicos llamados enzimas (Cappuccino y Welsh, 2019).

- **Exoenzimas**: son secretadas por la célula y actúan fuera de ella sobre el sustrato, disminuyendo el tamaño de las moléculas complejas en el medioambiente, hasta lograr un tamaño que pueda difundir al interior de la célula, donde sirvan de sustrato a las endoenzimas (Olivas y Alarcon, 2004).
- **Endoenzimas:** funcionan dentro de la célula y son principalmente responsables de la síntesis de nuevos compuestos protoplasmáticos y la producción de energía celular a partir de materiales asimilados. La capacidad de las células para actuar sobre sustratos nutricionales, que permean las membranas celulares, indica la presencia de muchas endoenzimas capaces de transformar los sustratos químicamente específicos en materiales esenciales (Cappuccino y Welsh, 2019).

5.4. Pruebas bioquímicas para Gram positivas

Prueba de catalasa: durante la respiración aeróbica, los microorganismos producen peróxido de hidrógeno y/o un superóxido extremadamente tóxico. La acumulación de estas sustancias podría provocar la muerte del organismo, a menos que puedan degradarse enzimáticamente. Estas sustancias se producen cuando los aerobios, anaerobios facultativos y microaerófilos utilizan la vía respiratoria aeróbica, en la que el oxígeno es el aceptor final de electrones, durante la degradación de los carbohidratos para la producción de energía (Cappuccino y Welsh, 2019). Los organismos capaces de producir catalasa degradan rápidamente el peróxido de hidrógeno como se muestra en la siguiente reacción:

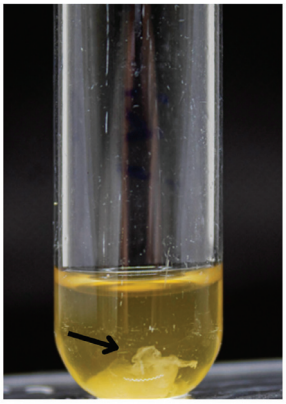
$$2\,H_2O\;CATALASA \rightarrow \;\; 2\,H_2O \;+ O_2$$

Si la catalasa está presente la reacción química será indicada por burbujas de oxígeno gaseoso libre, este es un resultado positivo, la ausencia de formación de burbujas es una prueba de catalasa negativa (Cappuccino y Welsh, 2019). Es de gran utilidad para diferenciar *Streptococcus* (negativa) y *Staphylococcus* (positiva).

Prueba de coagulasa: algunas bacterias producen la enzima coagulasa, capaz de coagular el plasma, puede presentarse como enzima extracelular o unida a la pared. Esta prueba se utiliza para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies del género *Staphylococcus* **(Figura 5.1)** (Porres y Ruiz, 2018).

Si se presenta coagulación por la acción de la enzima es un resultado positivo para *S. aureus,* y si no la hay es *S. epidermidis.*

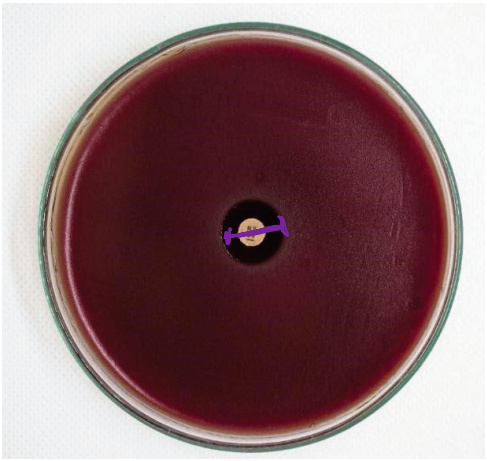
Figura 5.1. *Coagulasa. La flecha indica un resultado positivo para Staphylococcus aureus.*



Fuente: Autores (2023).

Resistencia a la novobiocina: para esta prueba se usa un sensidisco con este antibiótico que permite diferenciar *S. saprophyticus* que es resistente, de *S. epidermidis* que es sensible (Prieto, 2017) **(Figura 5.2)**.

Figura 5.2. *Novobiocina. La presencia del halo indica sensibilidad de Staphylococcus epidermidis al antibiótico.*

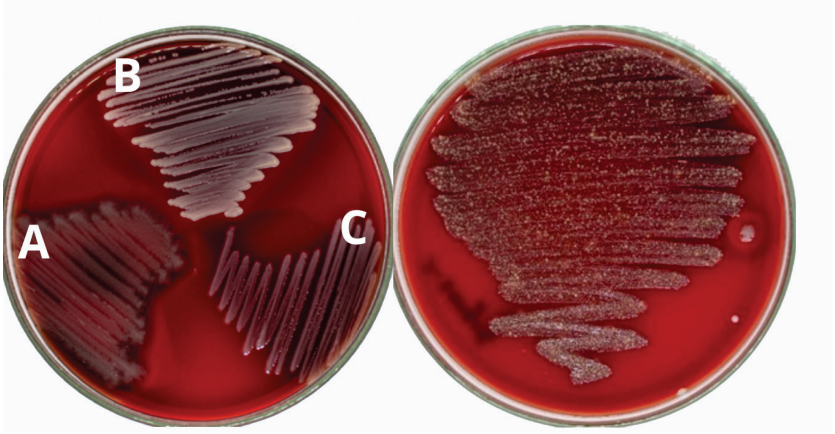


Fuente: Autores (2023).

Agar sangre: este medio de cultivo al ser suplementado con sangre ovina o humana, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la visualización de reacciones de hemólisis, ya que se agrega la sangre a una temperatura de 50°C que toleran los glóbulos rojos y, por lo tanto, la bacteria al crecer los lisa (Laboratorios Britania S.A., 2023). Las hemolisinas son enzimas que lisan los hematíes, las bacterias que las producen, presentan un halo alrededor de las colonias **(Figura 5.3)**.

- **Hemólisis alfa**: (lisis parcial). Se observa un halo de color verdoso alrededor de la colonia. Es debido a la oxidación de la hemoglobina a metahemoglobina por el peróxido de hidrógeno generado por los microorganismos.
- **Hemólisis beta**: (lisis total). Se observa un halo claro, translucido alrededor de la colonia.
- **Hemólisis gamma**: (ausencia de lisis). El medio de cultivo no presenta modificaciones de color ni de aspecto alrededor de la colonia.

Figura 5.3. *Agar sangre, Flora Nasofaríngea. En las zonas marcadas se presentan las hemolisis* ***A:*** *Gamma,* ***B:*** *Alfa y* ***C:*** *Beta.*



Fuente: Autores (2023).

Agar chocolate: es un medio altamente nutritivo y enriquecido, ya que se le agrega sangre ovina o humana, permite el crecimiento de microorganismos nutricionalmente exigentes y la visualización de la utilización del "*Hem*", pues se agrega la sangre a una temperatura de 80°C que destruye la membrana y la hemoglobina del glóbulo rojo. Quedando solo el grupo HEM que conforma la hemoglobina, en el cual se pueden desarrollar especies de *Streptococcus*, *Haemophilus sp* y *Neisseria.* La positividad se verá como un color amarillo – verdoso debajo de las colonias **(Figura 5.4)**.

Figura 5.4. *Agar chocolate Flora Nasofaríngea. Se observa utilización del HEM.*

Fuente: Autores (2023).

Agar Baird Parker: medio selectivo y diferencial que permite el crecimiento de *Staphylococcus,* pues el telurito de potasio y el cloruro de litio inhiben el desarrollo de la flora acompañante presente en la muestra. La yema de huevo permite demostrar la actividad lecitinasica (actividad de la enzima lipasa) de los microorganismos y la proteólisis. Los *Staphylococcus* coagulasa positiva reducen el telurito a teluro y originan colonias de color grisáceo-negro y tienen actividad lipolítica, por eso actúan sobre la yema de huevo produciendo un halo claro alrededor de la colonia **(Figura 5.5)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

- **Bacterias que reducen el telurito de potasio:** colonias de color grisáceo-negro.
- **Bacterias con actividad lipolítica:** halo claro en el medio de cultivo alrededor de la colonia. Puede existir también un halo opaco alrededor de la colonia con un halo externo.
- **Bacterias sin actividad lipolítica:** ausencia de halo.
- **Bacterias sin actividad proteolítica:** halo de precipitación.

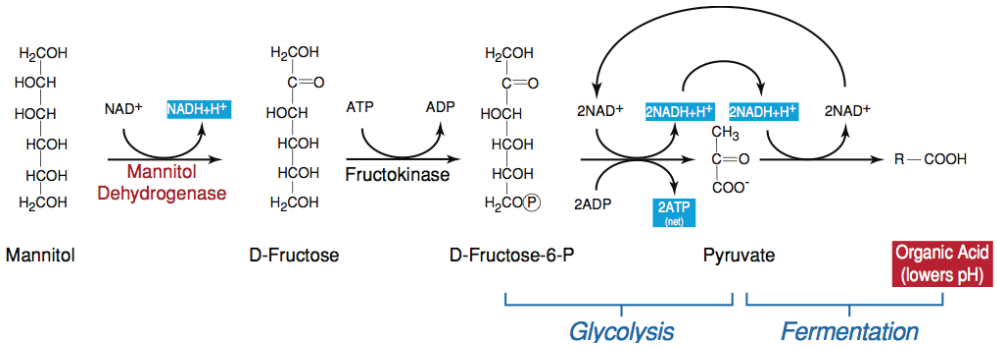
Figura 5.5. *Agar Baird Parker. Colonias Staphylococcus aureus que reducen el telurito de potasio y presentan actividad lipolítica.*

Fuente: Autores (2023).

Agar Salado Manitol (ASM): medio selectivo por la alta concentración salina, y diferencial, debido a la capacidad de fermentación del manitol. Los *Staphylococcus* crecen en altas concentraciones de sal y pueden o no fermentar el manitol. Los *Staphylococcus* coagulasa positiva fermentan el manitol y se visualizan como colonias amarillas que cambian el color del medio de rojo a amarillo, por otra parte, los *Staphylococcus* que no fermentan el manitol, se visualizan como colonias rojas rodeadas de una zona del mismo color **(Figuras 5.6 y 5.7)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Este medio es recomendado para el aislamiento de *Staphylococcus* patogénicos a partir de muestras clínicas, alimentos y otros materiales de importancia sanitaria y para la identificación de *Enterococcus,* ya que ellos soportan las altas concentraciones de sal, pero no fermentan el manitol.

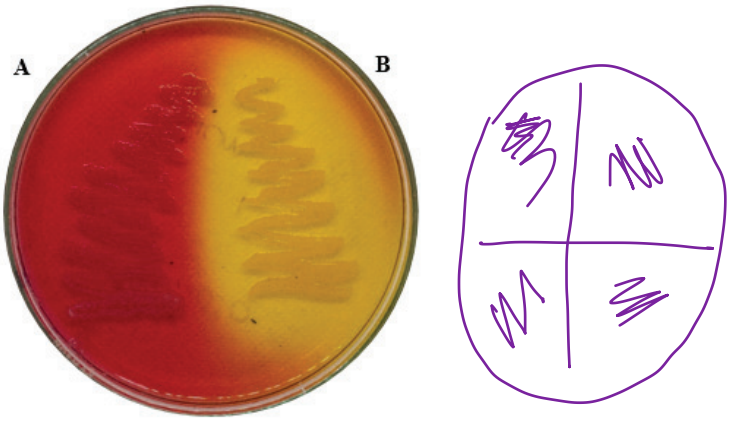
Figura 5.6. *Reacción de la fermentación del manitol.*



Fuente: Leboffe y Pierce (2011).

En la **Figura 5.6** se muestra la reacción de fermentación del manitol hasta piruvato, aquí se describen las enzimas que intervienen en el proceso. Esta reacción ocurre en altas concentraciones de cloruro de sodio (7,5%), y la presencia del indicador rojo de fenol, el cual es rojo a pH 7.4 y vira a amarillo a un pH de 6.8.

Figura 5.7. *Agar Salado Manitol.* ***A:*** *Staphylococcus spp no fermenta manitol.* ***B:*** *Staphylococcus aureus fermentando manitol.*

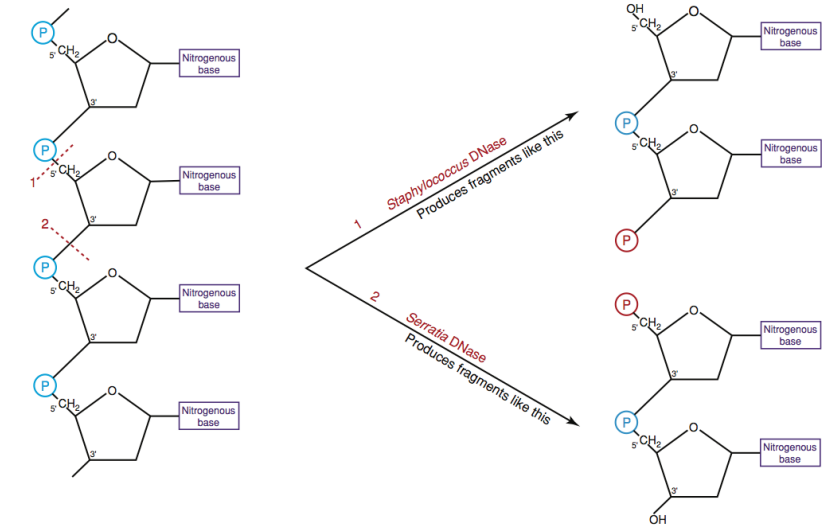


Fuente: Autores (2023).

Agar DNA: medio de cultivo utilizado para la detección de enzimas desoxirribonucleasas que algunas bacterias presentan e hidrolizan el ADN, produciendo una mezcla de mono y polinucleótidos. Es útil para la diferenciación entre especies de *Staphylococcus*, dando un resultado positivo para *Staphylococcus aureus* **(Figuras 5.8 y 5.9)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

- **Resultado positivo:** presenta halo claro, transparente alrededor del crecimiento bacteriano.
- **Resultado negativo:** el medio se observa opaco.

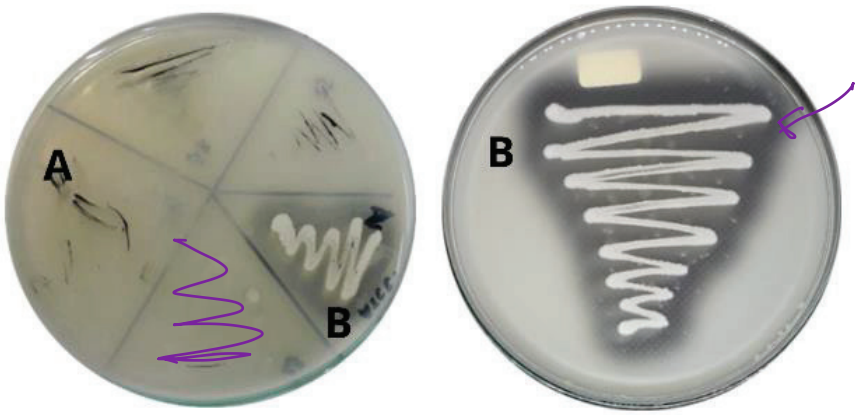
Figura 5.8. *Reacción de la hidrólisis del ADN.*



Fuente: Leboffe y Pierce (2011).

En la **Figura 5.8** se muestra dos patrones de hidrólisis del ADN, específicamente de los géneros *Staphylococcus* y *Serratia*. Para *Staphylococcus*, la ADNasa hidroliza el ADN en el enlace entre el carbono 5' y el fosfato, produciendo fragmentos con un fosfato 3' libre.

Figura 5.9. *Agar DNA después de adicionar el ácido clorhídrico, resultado negativo (a) y positivo b).*



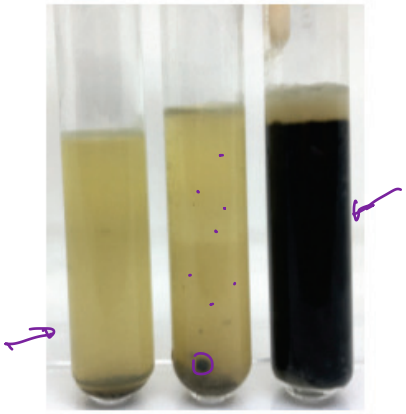
Fuente: Autores (2023).

Agar Sulfito Polimixina y Sulfadiazina (SPS): medio utilizado para el cultivo y recuento de endosporas de Clostridios Sulfito Reductores (CSR) en alimentos y otros materiales de importancia sanitaria. El sulfito de sodio y el citrato de hierro y amonio constituyen la fuente y el sistema

indicador de la reducción de sulfito por los clostridios sulforreductores. Por reducción del sulfito se genera SH_2, el cual reacciona con los iones de sulfhídrilos (Fe^3) y se forma un precipitado color negro **(Figura 5.10)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

- **Los microorganismos productores de SH2** se observan como colonias de color negro.

Figura 5.10. *Sulfito Polimixina y Sulfadiazina (SPS).* ***A:*** *No hay presencia de endosporas de clostridium sulfito reductores.* ***B:*** *Presencia de una colonia.* ***C:*** *Clostridium sulfito reductores positivo.*



Fuente: Autores (2023).

Agar Cistina Lactosa Deficiente de Electrolitos (CLED): es un medio deficiente en electrolitos, se basa en la utilización que los microorganismos puedan hacer de la lactosa, las cepas que la fermentan acidifican el medio y producen un cambio de color del verde al amarillo, mientras que las que no lo hacen, dan colonias incoloras que cambia el medio al color azul. La ausencia de electrolitos impide el desarrollo de *Proteus* (Laboratorios Britania S.A., 2023).

- **Microorganismos fermentadores de lactosa**: presentan colonias amarillas.
- **Microorganismos no fermentadores de lactosa**: presentan colonias del color del medio, azuladas.

Bacillus cereus agar: medio utilizado para el aislamiento de *Bacillus cereus*, al ser un microorganismo de importancia alimentaria por estar asociado a toxoinfecciones por consumo de algunos alimentos como el arroz. El piruvato de sodio y yema de huevo que contiene el medio de cultivo favorecen el aislamiento y la esporulación de esta bacteria (Laboratorios Britania S.A., 2023).

- ***Bacillus cereus***: colonias filamentosas, color turquesa rodeado por un precipitado de hidrólisis de yema de huevo. A las 48 horas de incubación presenta un centro grisáceo.
- ***Bacillus subtilis***: crecimiento satisfactorio, colonias de color amarillo, ausencia de precipitado.

Listeria Palcam agar: medio selectivo y diferencial debido a la hidrólisis de la esculina utilizado para el aislamiento de *Listeria* a partir de alimentos y muestras clínicas. Todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina, como lo demuestra el oscurecimiento del medio. En ocasiones puede crecer organismos diferentes a *Listeria*, tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*.

Listeria monocytogenes: presenta colonias amarillas a verdes rodeadas de un halo de color marrón oscuro a negro en el medio.

- ***Staphylococcus aureus***: puede presentar colonias amarillentas rodeadas de un halo amarillo.

En la **Tabla 5.1** encontrará de forma resumida las pruebas bioquímicas y los microorganismos Gram positivos más comunes estudiados en los laboratorios de microbiología.

Tabla. 5.1. *Pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas.*

MO	PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA BACTERIAS GRAM POSITIVAS																							
	1	2	3	4		5 (utilización del Hem) Act. Lecitinasica Red. Telurito	6		7			8		9	10	11	12	
							Act. Lecitinasica	Red. Telurito										
S. aureus	+	+	S	C	H. BETA	C	+	+	C	FERMANTA MANITOL	C	+			FERMENTA LACTOSA			
S. epidermidis	+	-	S	C	H. GAMMA	C	-	+	C	NO FERMENTA MANITOL	C	-						
S. saprophyticus	+	-	R	C	H. GAMMA	C	NO CRECE				C							
S. pyogenes	-	-		C	H. BETA	C	NO CRECE				C							
S. agalactiae	-	-		C	H. BETA	C	NO CRECE				C							
S. viridans	-	-		C	H.ALFA	C	USO DEL HEM	NO CRECE			C							
S. pneumoniae	-	-		C	H.ALFA	C	USO DEL HEM	NO CRECE			C							
Streptococcus bovis	-	-		C		C	NO CRECE				C							
Enterococcus	-		C		C		C	NO FERMENTA MANITOL	C						FERMENTA LACTOSA			
Clostridium sp.	C																	
B. cereus	+																	
B. subtilis	+																	
Listeria	+																	

Nota: prueba y/o medios de cultivo **1.** Catalasa, **2.** Coagulasa, **3.** Resistencia a la novobiocina, **4.** Agar sangre, **5.** Agar chocolate, **6.** Agar Baird Parker, **7.** Agar salado manitol, **8.** Agar DNA, **9.** SPS, **10.** Cled, **11.** Agar bacillus, **12.** Listeria palcam agar, C. Crece.

5.4.1. Equipos

Incubadora.

5.4.2. Insumos y materiales

Portaobjetos y cubreobjetos, mechero, asa de inoculación, gradilla, refrigerador, medios de cultivo, cepa.

5.4.3. Procedimiento

Rotular todas las cajas de Petri y/o tubos de ensayo con el nombre del medio de cultivo, responsables, fecha.

Prueba de catalasa

1. Colocar en un portaobjetos una muestra de colonia fresca.
2. Agregar asépticamente una o dos gotas de peróxido de hidrógeno al 3% directamente sobre las bacterias.
3. Mezclar suavemente con un palillo estéril y observar los resultados de manera inmediata.

Prueba de coagulasa

Preincubación: muestra tomada de un medio selectivo como Baird Parker, ASM.

- **En tubo de ensayo**

1. Agregar en un tubo 0,5 ml de plasma estéril reconstituido según las indicaciones del fabricante.
2. Sembrar una colonia de *Staphylococcus* que ha dado catalasa positiva.
3. Incubar a 37°C durante 2 horas. A partir de ese momento observar para ver la formación del coágulo.
4. Si da negativo se deja incubando y leer a las 24 horas para evaluar la negatividad total.
5. Pero si ha dado positiva a las 2 horas y se deja las siguiente 24 horas se confirma la positividad y si da negativo indica la presencia de otra enzima que es la fibrinolisina.

Resistencia a la novobiocina

1. Sembrar de manera masiva en un medio de agar Müller Hilton más sangre del 5 al 10%, colonias frescas recién aisladas del microorganismo en estudio.
2. Aplicar el disco de novobiocina en el centro del medio de cultivo.
3. Identificar si existe halo de inhibición.

Agar sangre

1. Sembrar por inoculación directa del material en estudio, estriar sobre la superficie del medio de cultivo.
2. Observar las características de la colonia y presencia o ausencia de hemolisis.

Agar chocolate

1. Eliminar la humedad que pueda existir en la superficie del medio de cultivo.

2. Sembrar de manera directa en el medio de cultivo.
3. Observar las características de la colonia y la utilización del hem.

Agar Baird Parker

1. La siembra se realiza de manera directa inoculando el material en estudio sobre la superficie del medio de cultivo.
2. Observar las características de la colonia en cuanto al color grisáceo y la formación de halos de proteólisis y glicolisis.

Agar salado manitol

1. Sembrar de manera directa en la superficie del medio de cultivo.
2. Observar las características de la colonia.

Agar DNA

1. Realizar una estría gruesa con abundante material para facilitar la observación de los halos.
2. Para la interpretación de resultados, cubrir la placa con ácido clorhídrico (HCL) y observar durante los primeros cinco minutos.

Agar Sulfito Polimixina y Sulfadiazina (SPS)

1. Previo a la inoculación es recomendable realizarle a la muestra un tratamiento térmico a 80°C durante 10 minutos con el objetivo de destruir las formas vegetativas.
2. Sembrar en tubos de ensayo estériles, inocular un 1 ml de la muestra que ha sido tratada directa o de la dilución. Verter un volumen del medio de cultivo licuado y enfriado a 40-45°C. Homogenizar mediante movimientos suaves de rotación y dejar solidificar.
3. Agregar una capa de medio de cultivo suficientemente amplia.
4. Observar las características de las colonias y presencia de H_2S.

Cled medio

1. Inocular una alícuota de orina en la superficie del medio.
2. Observar las características de la colonia.

Bacillus Cereus agar

1. Sembrar de manera directa sobre la superficie del medio de cultivo.
2. Observar las características de la colonia.

Listeria Palcam agar

1. Extender la muestra directamente o a partir de un caldo de enriquecimiento en la superficie del medio.
2. Observar las características de la colonia.

CONSEJOS PARA LA PRÁCTICA:

- Para la prueba de la catalasa no se debe utilizar asa metálica, ya que daña la reacción, se recomienda un palillo estéril, adicionalmente, no se debe realizar a partir de que contenga sangre.

- Los tiempos de incubación y las condiciones de aerobiosis y microaerobiosis dependerá del microorganismo en estudio, generalmente de 24 a 48 horas entre 35°C y 37°C.

5.4.4 Resultados

Llenar la siguiente tabla de acuerdo con lo observado en la práctica de laboratorio. En este ejercicio se puede entregar un microorganismo sin identificar, para que cada grupo de trabajo, al final determine cuál microorganismo es.

Tabla 5.2. *Resultados pruebas bioquímicas para Gram.*

Microorganismo o grupo de trabajo	Catalasa	Coagulasa	Agar sangre	Agar chocolate	Baird Parker	Salado manitol	Agar DNA	SPS	Cled	Agar bacillus	Listeria Palcam agar

Fuente: Autores (2023).

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo sobre pruebas bioquímicas Gram positivas. https://www.youtube.com/watch?v=hrC6qPnXt7c

5.4.5. *Cuestionario*

1. ¿Cuál es la importancia de realizar a partir de los cultivos, la coloración de Gram, y relacionarla con los resultados obtenidos de la prueba de catalasa?
2. Realice el algoritmo para la clasificación de las cepas del género *Staphylococcus*
3. ¿Qué otras pruebas se pueden realizar para diferenciar *Listeria sp* a parte del cultivo?

Referencias bibliográficas

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Laboratorios Britania S.A. (2023). *Britania.* https://www.britanialab.com/home.

Leboffe, M.J. y Pierce, B.E. (2011). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory.* 4th Edition, Morton Publishing Company, Englewood, 75.

Olivas, E. y Alarcon, L. R. (2004). *Manual de prácticas de microbiología básica y de alimentos*. Universidad Autónoma de Ciudad de Juárez.

Porres, N. y Ruiz, E. (2018). *Microbiología clínica*. España. Editorial: Paraninfo.

Prieto, J. (2017). Antibióticos de uso diagnóstico. *Sociedad Española de Quimioterapia*. https://seq.es/curiosidades-en-la-historia-de-los-antimicrobianos/antibioticos-de-uso-diagnostico/

5.5 Pruebas bioquímicas para bacterias Gram negativas

Las proteobacterias incluyen la mayoría de las bacterias Gram negativas quimioheterotróficas, representan más del 40% de todos los géneros procariotas identificados y engloban una proporción importante de las bacterias Gram negativas tradicionales; muestran una diversidad metabólica extrema y son de gran importancia biológica, ya que incluyen la mayoría de los Gram-negativos conocidos de la medicina, veterinaria, interés industrial, agrícola y sobre todo son representantes ecológicamente importantes, porque juegan un papel clave en los ciclos del carbono, el azufre y el nitrógeno en nuestro planeta (Kersters et al., 2006).

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos facultativos y anaerobios, la mayoría son fermentadores activos de glucosa y otros carbohidratos, tienen fimbrias que les ayudan a adherirse a superficies o membranas mucosas; es un grupo bacteriano importante, comúnmente llamado entérico, debido al hecho de que habitan en el tracto intestinal de humanos y otros animales. Las pruebas bioquímicas son fundamentales en el trabajo de laboratorio clínico, microbiología de alimentos, suelo y agua, debido a su importancia existen muchas técnicas para aislar e identificar las enterobacterias (Tortora et al., 2019).

Algunos de los organismos cultivados que podemos encontrar en el laboratorio pertenecientes a este grupo de bacterias y que son utilizados para realizar las pruebas bioquímicas explicadas a continuación son: *Escherichia coli, Klebsiella sp, Proteus sp, Enterobacter sp, Salmonella sp, Shigella sp y Pseudomona sp.*

Prueba con lectura inmediata

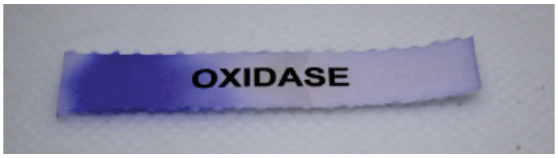
- **Oxidasa**

El objetivo de esta prueba es verificar la presencia de la enzima citocromo c, una de las oxidasas que participan en el proceso oxidativo de la respiración celular. El metabolismo de la respiración celular de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas presenta, como paso final del proceso, el sistema de transporte de electrones, para que tenga lugar la transferencia de electrones al oxígeno es necesaria la participación de un grupo especial de enzimas transportadoras de electrones; estas enzimas, como citocromo oxidasas, se encuentran en todas las bacterias que utilizan el metabolismo respiratorio, la prueba de oxidasa detecta específicamente una de estas enzimas, citocromo c oxidasa, que no se encuentra en todas las bacterias capaces de utilizar el metabolismo respiratorio.

El reactivo utilizado en la prueba es siempre un agente reductor artificial que actúa como aceptor final de los electrones transferidos por la enzima citocromo oxidasa c, estos reactivos tienen la característica de cambiar de color al pasar del estado reducido al estado oxidado, de tal manera que al recibir los electrones se oxidan, provocando una reacción de color claramente visible **(Figura 5.11)** (da Silva et al., 2018).

- Resultado positivo: presencia de oxidasa, color púrpura/violeta.
- Resultado negativo: ausencia de oxidasa, rosado claro o ningún cambio de color.

Figura 5.11. *Prueba de oxidasa. El color púrpura que se observa en la figura evidencia que el resultado de esta prueba fue positivo.*



Fuente: Autores (2023).

Pruebas lentas

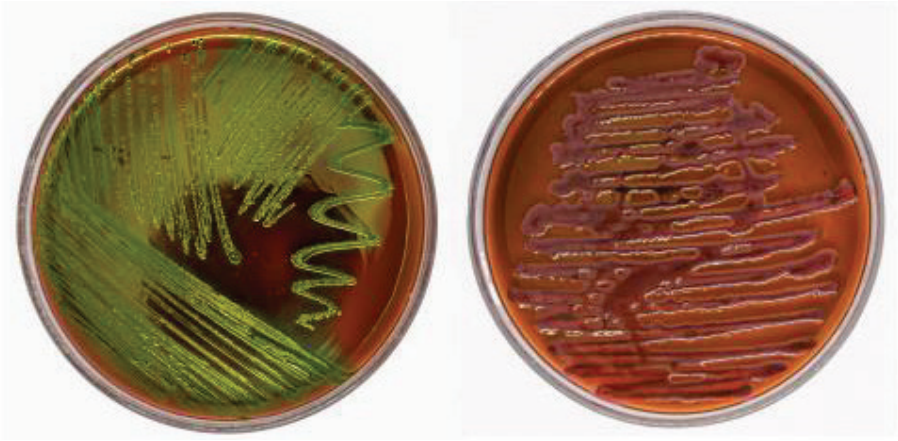
- **Agar eosina azul de metileno (EMB)**

Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido crecimiento, cuenta con escasas exigencias nutricionales y permite el desarrollo de todas las especies de la familia Enterobateriaceae. Es nutritivo por la presencia de peptona, la diferenciación entre organismos capaces de utilizar la glucosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por el indicador de pH y el agente bacteriostático; eosina azul de metileno que ejerce un efecto inhibitorio sobre una amplia variedad de bacterias Gram positivas **(Figura 5.12)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Fermentadores de glucosa: colonias moradas.
- Fermentadoras de glucosa con brillo metálico presencia de *Escherichia coli*.
- No fermentadores de glucosa: colonias rosadas o incoloras.
- Colonias de *Escherichia coli* fermentadora: brillo metálico.

Figura 5.12. *Agar EMB.* ***A:*** *E. coli. Se observa un brillo verde metálico característico de este organismo.* ***B:*** *Klebsiella. Se observa colonias grandes de color negro azulado.*



Fuente: Autores (2023).

- **Base de agar ENDO**

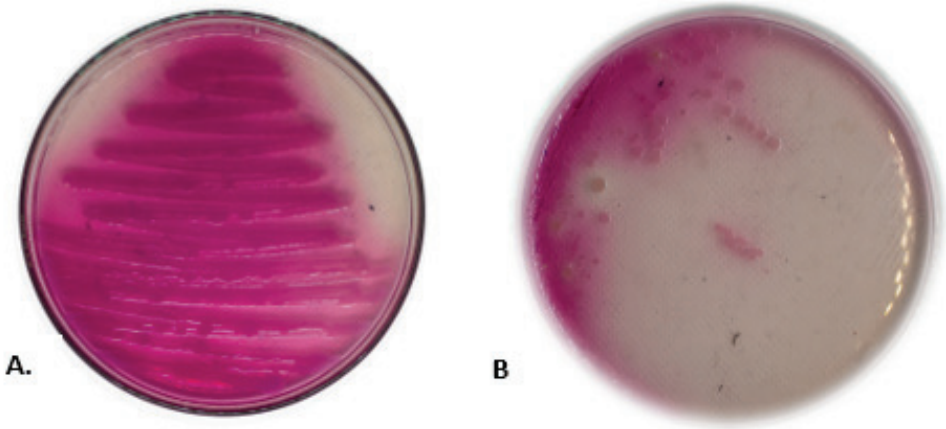
Es un medio de cultivo diferencial y moderadamente selectivo que es utilizado para la detección de coliformes y otros microorganismos entéricos en las diferentes muestras; este medio utiliza fucsina básica para diferenciar entre bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa; la lactosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía, además del fosfato dipotásico que actúa como un sistema tampón **(Figura 5.13)** (Condalab, 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Fermentadores rápidos de lactosa: colonias moradas con un brillo metálico.

- Fermentadores lentos de lactosa: colonias moradas.
- No fermentadores de lactosa: colonias incoloras.

Figura 5.13. *Base de Agar ENDO.* ***A:*** *E. coli. Presenta colonias moradas con brillo metálico.* ***B:*** *Muestra fecal. Se evidencia el crecimiento de organismos.*



Fuente: Autores (2023).

- **Agar MacConkey**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de diferentes muestras. Dentro de su composición posee peptonas que aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, lactasa que es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta que son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva; el medio tiene un indicador de pH rojo fenol que le brinda el color rojizo púrpura **(Figura 5.14)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Fermentadores de lactosa: colonias rosadas, el medio se vuelve más rosado.
- No fermentadores de lactosa: colonias incoloras, el medio vira a amarillo.

Figura 5.14. *Agar MacConkey.* ***A:*** *E. coli. Se observan colonias rosadas.* ***B:*** *Klebsiella. Colonias mucoides de color rosado.*

Fuente: Autores (2023).

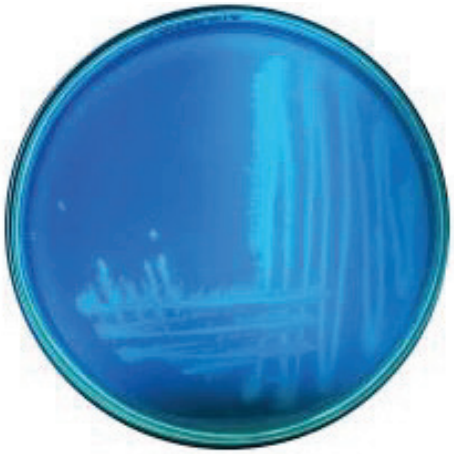
- Agar cetrimidae

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género; el medio contiene peptona de gelatina, que aporta los nutrientes para el desarrollo microbiano; cloruro de magnesio y sulfato de potasio, que promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *Pseudomona aeruginosa*; la cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor y libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas* **(Figura 5.15)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Producción de piocianina: color verde-azulado.
- Producción de pioverdina: color verde.
- Producción de piomelanina: color rosa claro, rojizo o marrón oscuro.
- Producción de fluoresceína: color amarillo-verdoso brillante (la observación debe ser realizada bajo luz ultravioleta).

Figura 5.15. *Agar cetrimide. Pseudomona chlororaphis. Colonias con fluorescencia bajo luz UV de 3 a 15W.*



Fuente: Autores (2023).

- Caldo asparagina

Se recomienda para el Número Más Probable (NMP) e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*. El principio del medio se basa en la hidrólisis de asparagina a ácido aspártico, contiene una base estrictamente mineral, con asparagina como única fuente de nitrógeno y con glicerol como fuente de carbono, las sales de potasio actúan como sistema tampón y el sulfato de magnesio aporta los iones requeridos (Condalab, 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Resultado positivo: presencia de turbidez, gas y fluorescencia (la observación debe ser realizada bajo luz ultravioleta de 3 a 15 W).

Figura 5.16. *Caldo asparagina. Pseudomona sp. Se observa turbidez y fluorescencia bajo luz UV.*

Fuente: Autores (2023).

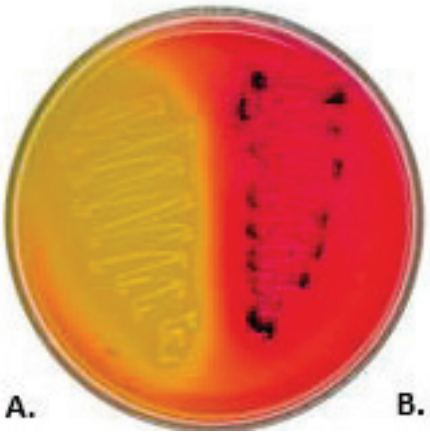
- Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD)

Medio utilizado para la identificación *de Salmonella* y la diferenciación entre *Salmonella* y *Shigella,* debido a que no fermentan la xilosa. En el medio se da la degradación de los tres carbohidratos fermentables: xilosa, lactosa y sacarosa, con la producción de ácido que se manifiesta en el cambio de color de rojo a amarillo; el tiosulfato reacciona con el citrato de amonio férrico y se forman los iones sulfidrilos en condiciones alcalinas, la lisina se incluye para permitir que el grupo de *Salmonella* se diferencie de los no patógenos, ya que, en su ausencia, fermentaría rápidamente la xilosa, haciéndola indistinguible de las especies no patógenas; después de que la *Salmonella* utiliza la xilosa presente, la lisina es degradada a través de la enzima lisina descarboxilasa con un cambio a pH alcalino, similar a la reacción de *Shigella*; el rojo fenol es el indicador de pH; el extracto de levadura es una fuente de vitaminas, el desoxicolato de sodio es el agente selectivo y, por lo tanto, es inhibidor de microorganismos Gram positivos **(Figura 5.17)** (Condalab, 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Fermentadores de xilosa: colonias y medio amarillo.
- No fermentadoras de xilosa: colonias rojas.
- Productores de ácido sulfhídrico H2S: colonias negras.
- Presencia de *Salmonella*: colonias rojas con pigmentos negros de sulfhídrilos.

Figura 5.17. *Agar xilosa lisina desoxicolato.* ***A:*** *E. coli. Organismo fermentador de xilosa con colonias amarillas.* ***B:*** *Salmonella infantis. Organismo no fementador de xilosa y productor de* H_2S *con colonias rojas y centros negros.*



Fuente: Autores (2023).

Medios diferenciales

- **Agar Salmonella Shigella (SS)**

Es un medio de cultivo utilizado para el aislamiento de *Salmonella sp* y de algunas especies de *Shigella sp*. A partir de heces y otros materiales en los cuales se sospeche su presencia; las sales biliares y el verde brillante inhiben el desarrollo de una amplia variedad de bacterias Gram positivas, de la mayoría de los coliformes y el desarrollo invasor de *Proteus sp*. La lactosa es el hidrato de carbono fermentable, el tiosulfato de sodio y el cloruro férrico permiten la formación de sulfuro

de hidrógeno que se evidencia por la formación de sulfuro de hierro (Laboratorios Britania S.A., 2023). El indicador de pH es el rojo fenol o rojo neutro **(Figura 5.18)**.

Se puede observar de la siguiente manera:

- No fermentadores de lactosa: colonias amarillas.
- Fermentadores de lactosa: colonias rosadas.
- Productores de SH2: colonias con centro negro.
- Resultados Shigella y Salmonella: colonias no fermentadoras de lactosa que se ven de color amarillo, viraje del medio a amarillo.
- *Salmonella,* no fermentadoras de lactosa con presencia de sulfhidrilo.

Figura 5.18. *Agar SS.* ***A:*** *E. coli.* ***B:*** *Salmonella infantis.*

Fuente: Autores (2023).

- **Azúcar hierro agar (TSI)**

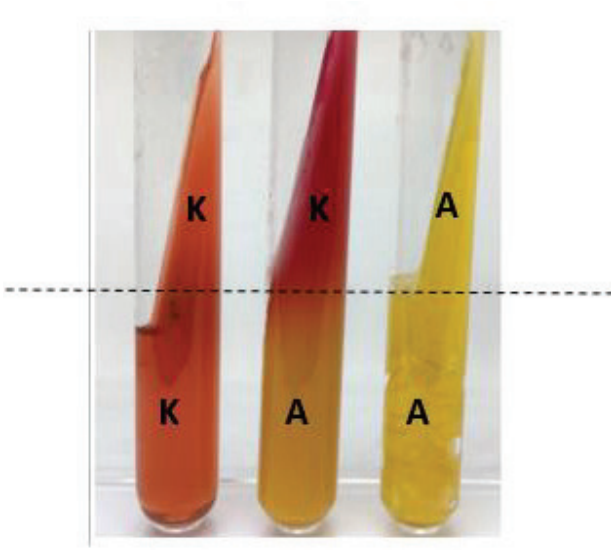
Medio empleado para la diferenciación de enterobacterias, con base en la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico; el tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio es la fuente de iones Fe3+, los cuales se combinan con el ácido y producen sulfuro de hierro de color negro; el rojo de fenol es el indicador de pH (Laboratorios Britania S.A., 2023). Al realizarse la fermentación anaeróbica de la glucosa se produce ácido y gas. El ácido genera un cambio en el indicador de pH y el gas (CO_2) por el desplazamiento del medio **(Figura 5.19)**.

Se puede observar de la siguiente manera:

- Medio básico (**K**): color rojo.
- Medio ácido (**A**): color amarillo.
- Producción de H_2S: color negro.
- Presencia de burbujas o ruptura del medio: productor de gas (CO_2).
- Fermentador de glucosa: superficie roja y fondo amarillo (anaerobiosis).

- Fermentación de lactosa: superficie amarilla y fondo rojo (aerobiosis).
- Fermentador de lactosa o sacarosa: superficie y fondo amarillo (facultativa).
- No es fermentador: superficie y fondo rojo.

Figura 5.19. *Agar TSI. Fotografía tomada en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad del Tolima. GEBIUT. Microorganismo no fermentador de glucosa y lactosa* ***(A)****, microorganismo fermentador anaerobio* ***(B)****, microorganismos fermentador facultativo, fermenta en aerobiosis lactosa y en anaerobios glucosa* ***(C)****.*



Fuente: Autores (2023).

- **Sulfuro Indol Motilidad (SIM)**

Es un medio semisólido destinado a verificar la movilidad, producción de indol y de sulfuro de hidrógeno por los microorganismos; la triptona y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano, el triptófano puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol escatol e indol acético mediante la acción de la enzima triptofanasa y con la adición del reactivo de Kovacs. A partir del tiosulfato de sodio los microorganismos pueden generar ácido sulfhídrico, que reacciona con el hierro presente formando un compuesto de color negro y la motilidad se evidencia por el enturbiamiento del medio o el crecimiento que difunde más allá de la línea de siembra del microorganismo en estudio, que determina la presencia de flagelo **(Figuras 5.20 y 5.21)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Esta prueba sirve para diferenciar entre *Salmonella* y *Shigella*, ya que esta última es negativa en motilidad. Así mismo, observar el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica*, las cuales tiene motilidad a 25°C y no a 37°C, además del crecimiento en sombrilla para *Listeria monocytogenes.*

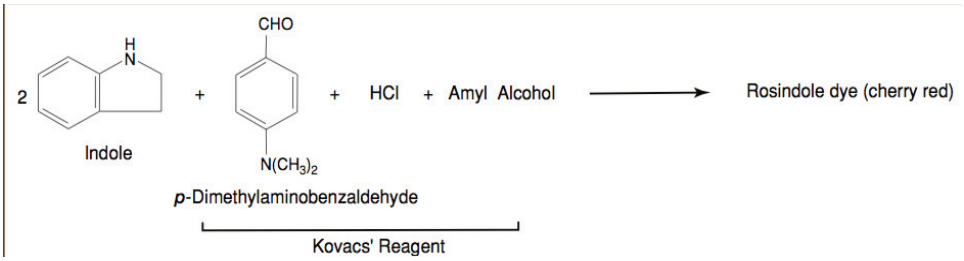
$$3\,S_2O_3 + 4H + 4e \;\; Tiosulfato\; reductasa \rightarrow \;\; 2SO_3 + 2H_2S$$

$$H_2S + FeSO_4 \;\; \rightarrow \;\; H_2SO_4 + FeS_{(S)}$$

Se puede observar de la siguiente manera:

- Producción de sulfhídrico (H2S): positivo color negro y negativo ausencia de color.
- Producción de indol: positivo anillo rojo o vinotinto y negativo ausencia de anillo.
- Motilidad: positivo crecimiento fuera de la línea de inoculación y negativo crecimiento restringido a la línea de inoculación.

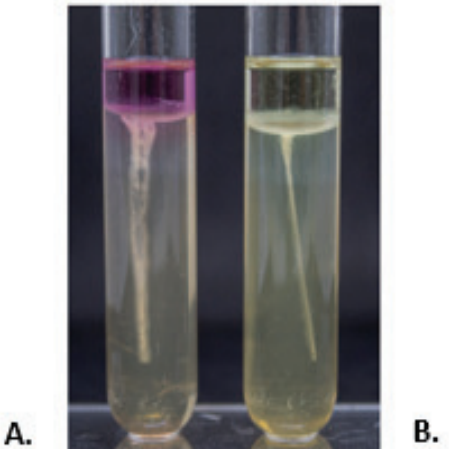
Figura 5.20. *Reacción de indol con el reactivo de Kovacs.*



Fuente: Modificado de Leboffe y Pierce (2011).

En la **Figura 5.20** se muestra la producción de indol a partir de un medio que contiene triptófano. Las bacterias que poseen la enzima triptofanasa pueden desdoblar el triptófano a piruvato, amoníaco e indol, este último puede detectarse al adicionar el reactivo de Kovacs. El reactivo de Kovacs contiene dimetilaminobenzaldehído (DMABA) y HCl disueltos en alcohol amílico. Cuando se agregan unas gotas de reactivo de Kovacs al tubo con el medio SIM, se forma un anillo que vira a color rojo cereza antes de dos minutos.

Figura 5.21. *Medio SIM. Microorganismo con motilidad e indol positivo* ***(A)****, microorganismo motilidad e indol negativo* ***(B)****.* ***A:*** *E. coli.* ***B:*** *Proteus.*



Fuente: Autores (2023).

- **Christensen medio (caldo) urea**

Utilizado para diferenciar microorganismos con base en la actividad ureásica; la tripteina y la glucosa aportan los nutrientes para el desarrollo de los organismos, el cloruro

de sodio mantiene el balance osmótico, las bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa y liberan amoníaco y dióxido de carbono, el rojo de fenol es el indicador de pH **(Figura 5.23)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

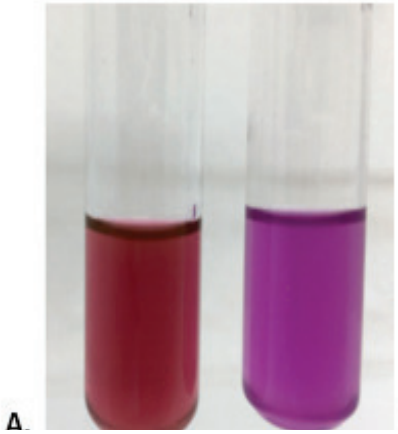
Figura 5.22. *Hidrólisis de la urea.*

Fuente: Modificado de Leboffe y Pierce (2011).

Se puede observar de la siguiente manera **(Figura 5.22)**:

- Resultado positivo: vira de color a un rosado-fucsia-morado intenso.
- Resultado negativo: no hay cambio de color.

Figura 5.23. *Medio urea. Resultado Negativo **A)**, el medio no vira de color: Resultado Positivo **B)**, el medio toma un color morado más intenso, ejemplos de Proteus sp y Klebsiella sp.*



Fuente: Autores (2023).

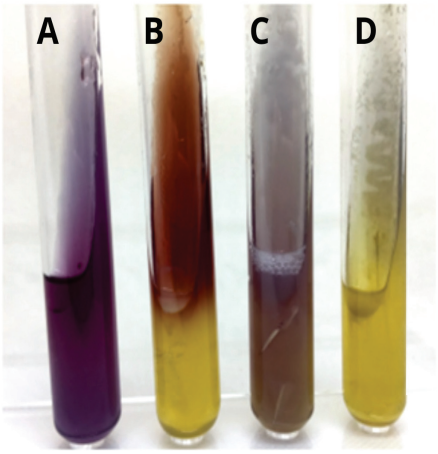
- **Agar lisina hierro (LIA)**

Medio utilizado para diferenciar microorganismos, basado en la decarboxilacion y desaminación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas decarboxilasa y deaminasa; el citrato de hierro, amonio y el tiosulfato son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico, los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje de color púrpura al amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad de la decarboxilasa y se metaboliza la lisina a cadaverina, elevando el pH del medio y tornándolo púrpura o violeta (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

Los microorganismos utilizan el aminoácido de una sola forma, es decir, aeróbicamente (desaminación) y se observa en la parte superior del tubo un color ligeramente más rojo, en la forma anaeróbica (descarboxilación) todo el tubo toma un color más púrpura; pero al observar la fermentación del carbohidrato ella puede ser aerobia, anaerobia o facultativa y, por lo tanto, podría verse la parte inferior del tubo de color amarillo por la glucosa fermentada. También podría expresar la presencia de sulfidrilos **(Figura 5.24)**.

Figura 5.24. *Agar LIA. Descarboxilación positiva **A)** y **C)**, Desaminación positiva, parte superior vino-tinto e inferior fermentación de la glucosa **B)**, Descarboxilación negativa **(D)**.*



Fuente: Autores (2023).

- **Agar simmons citrato**

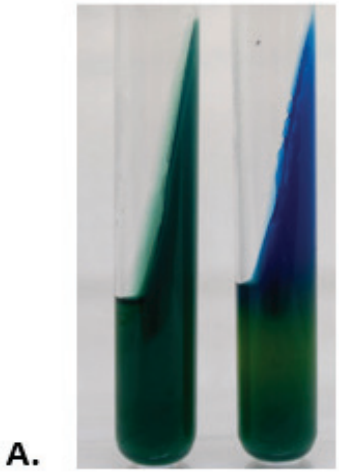
Medio utilizado para la diferenciación de enterobacterias con base en la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía. El fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono, ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfato forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico y el azul de bromotimol es el indicador de pH **(Figura 5.26)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

El color del medio es verde y al expresarse la enzima citrato permeasa vira el color azul rey, en este medio puede observarse la presencia de sulfidrilo; por otro lado, debe tenerse cuidado, ya que existen algunas bacterias citrato positivas de crecimiento lento y en este caso deben dejarse hasta por 72 horas **(Figura 5.25)**.

Se puede observar de la siguiente manera:

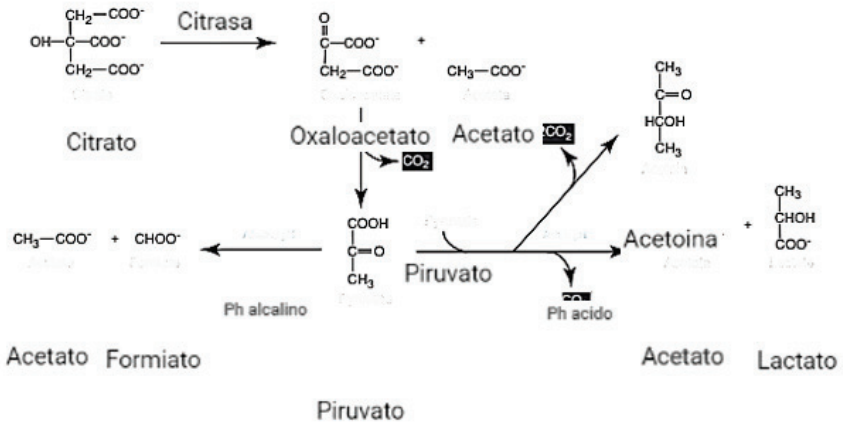
- Resultado positivo: utilización del citrato, se evidencia crecimiento y el medio vira a color azul rey.
- Resultado negativo: no se utiliza el citrato, no hay cambio en el color del medio, aunque puede haber crecimiento.

Figura 5.25. *Simmons citrato.* ***A:*** *Resultado Negativo, no hay cambio de color en el medio sin embargo se observa crecimiento* ***B:*** *Resultado Positivo, una parte del medio se tornó azul rey.*



Fuente: Autores (2023).

Figura 5.26. *Química del citrato.*



Fuente: Modificado de Leboffe y Pierce (2011).

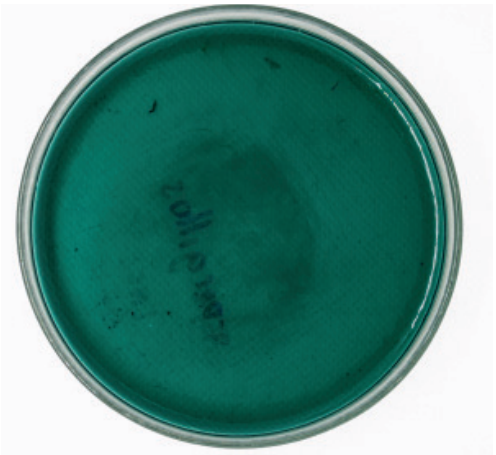
- **Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS)**

El extracto de levadura, la peptona de carne y la tripteina aportan los nutrientes para el desarrollo microbiano; la bilis de buey, el citrato de sodio y el pH alcalino inhiben el desarrollo de la flora acompañante, favoreciendo el crecimiento de *Vibrio sp;* la sacarosa es el hidrato de carbono fermentable y el azul de bromotimol y de timol son los indicadores de pH que en un ambiente alcalino le otorgan al medio el color verde azulado **(Figura 5.27)** (Laboratorios Britania S.A., 2023).

Se puede observar de la siguiente manera:

- Microorganismos capaces de soportar un pH a 9.0: colonias amarillas.
- Otras enterobacterias: colonias con tamaño reducido del color verde.

Figura 5.27. *Agar TCBS. Medio inoculado con muestra fecal, no se observó crecimiento después de 24 horas.*



Fuente: Autores (2023).

5.5.1. Insumos y materiales

Guantes, tapabocas, marcador, tubos de ensayo, asa de inoculación curvas y rectas, mechero, gradilla, papel filtro.

5.5.2. Equipos

Incubadora.

Material biológico: *Escherichia coli, Klebsiella sp, Proteus sp, Enterobacter sp, Salmonella sp, Pseudomona sp.*

5.5.3. Procedimiento

Antes de realizar cualquier procedimiento, marque el tubo de ensayo o caja de Petri con la siguiente información: grupo, nombre del microorganismo, fecha y muestra y medio de cultivo.

Prueba con lectura inmediata:

- **Oxidasa**

1. Coloque papel filtro en una caja de Petri.
2. Con un palillo estéril, frote suavemente sobre el papel filtro una muestra del organismo de prueba.
3. Añada una o dos gotas de reactivo oxalato de p-aminodimetilanilina sobre el microorganismo.
4. Observe en busca de un color púrpura dentro de los 30 segundos posterior al contacto del organismo con el reactivo, si esto sucede su prueba es positiva.

Pruebas lentas:

Medios selectivos

- **Eosina azul de metileno (EMB), agar Macconkey, *Salmonella Shigella* agar (SS), Base de agar Endo, agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD).**

1. Marque la caja de acuerdo con el microorganismo que se va a sembrar.
2. Con un asa haga la siembra (estría, semicuantitativa, agotamiento, etc.) en la sección correspondiente de la placa.
3. Incube la placa a 37 ° C durante 24h-48h.
4. Observar las colonias, cambio de color por la reacción que se haya presentado.

Medios diferenciales

- **Agar triple azúcar hierro (TSI), Agar Simmons citrato, Agar Lisina Hierro (LIA)**

1. Inocular con un asa recta el microorganismo mediante una siembra mixta.
2. Incubar durante 24-48h a 37° C.

- **Christensen medio caldo urea**

1. Se siembra en el caldo utilizando un asa redonda para inocular cada tubo con el organismo a utilizar.
2. Incubar de 24- 48h a 37°C.

- **Sulfuro Indol Motilidad (SIM)**

1. Siembre por punción hasta 3⁄4 del medio. Recuerde que debe tener cuidado de sacar el asa por el mismo orificio de siembra.
2. Incubar de 24- 48h a 37 °C.

- **Caldo asparagina y agar cetrimide.**

1. En un tubo de ensayo que contenga el medio ya preparado, inocular por mezcla y homogeneizar con el microorganismo de estudio.
2. Incubar a 35 °C durante 24h a 48h.
3. Luego de la incubación se siembra por agotamiento en agar cetrimide.
4. Incubar de 24- 48h a 35.

CONSEJOS PARA LA PRÁCTICA: la utilización del asa metálica en la prueba de oxidasa crea interferencia en el resultado.

Tabla 5.3. *Pruebas bioquímicas Enterobacteria.*

		MICROORGANISMOS														
		Klebsiella spp					*Proteus spp*			*Enterobacter spp*					*Salmonella spp*	
Pruebas Bioquímicas *E. Coli*		***K. oxytoca***	***K. ozaenae***	***K. planticola***	***K. pneumoniae***	***K. rhinoscleromatis***	***P. mirabilis***	***P. penneri***	***P. vulgaris***	***E.aerogenes***	***E. agglomerans***	***E. cloacae***	***E. gergoviae***	***E. sakazakii***		
TSI	Fermentación de carbohidratos	A(K)/A	A/A	K(A)/A	A/A	A/A	K/A	K/A	K/A	K/A	A/A	K(A)/A	A/A	K(A)/A	A/A	K/A
	H2S	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	Gas	+	+	var	+	+	-	+	var	+	+	-/+	+	+	+	+
Citrato Simmons		-	+	-/+	+	+	-	+/-	-	-/+	+	var	+	+	+	+
Urea		-		-	+	+	-	+	+	+	-	-/+	+/-	+	-	-
Producción Indol		+	+	-	-/+	-	-	-	-	+	-	-/+	-	-	-	-
Motilidad		+	-	-	-	-	-	+	+/-	-	+	+/-	+	+	-	+
Lisina descarboxilasa +		+	+	var	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-

Fuente: Autores (2023).

5.5.4. Resultados

Tabla 5.4. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas principales de bacterias Gram negativas*

Grupo o Microorganismo	MEDIO	Oxidasa	BRILA		Asparagina		SIM		UREA	TSI			SC		LIA		EMB o ENDO	MACCONKE	XLD		CETRIMIDE	SS		TCBS
	Parámetro		Gas	Tbz	Fluoresc	Tbz	Mov	H2S	Indol	hidrólisis	Ferm. Az	Gas	H2S	Ut. Citrato	H2S	Desa	Decarb	H2S	Glucosa	Lactosa	Ferm. Xilosa	H2S	Tipo de producción	Lactosa	H2S	Crecimiento

Fuente: Autores (2023).

5.5.5. Cuestionario

1. ¿Cuál es la diferencia entre un medio selectivo y un medio diferencial?, ¿es importante escoger de manera correcta el medio en el que se va a cultivar para tener un crecimiento exitoso? ¿por qué?
2. ¿Qué es un coliforme y cómo la reconocería en un agar Endo?
3. ¿Cuáles son los ingredientes que permiten que el medio EMB sea diferencial y selectivo?
4. Defina: Motilidad, Descarboxilación, Desaminación, Hidrólisis.
5. ¿Para qué sirve el reactivo de Kovacs y cuál es su composición?
6. ¿Qué es y para qué sirve un sistema tampón o buffer en la prueba de la urea?

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo sobrepruebas bioquímicas Gram negativas. https://www.youtube.com/watch?v=oSY_TmmGryQ

Referencias bibliográficas

Condalab. (2023). *Condalab. Inspired by knowledge*. https://www.condalab.com/int/es/

da Silva, N., Taniwaki, M., Junqueira, V. C. A., Silveira, N., Okazaki, M. M. y Romeiro Gomes, R. A. (2018). *Microbiological examination methods of food and water a Laboratory Manual* (2nd ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315165011

Kersters, K., Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P. y Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria* (3rd ed.). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1

Laboratorios Britania S.A. (2023). *Britania.* https://www.britanialab.com/home.

Leboffe, M.J. y Pierce, B.E. (2011). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory: Catalase Test*. 4th Edition, Morton Publishing Company, Englewood, 75.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Práctica 6.

Métodos físicos y químicos para el control del crecimiento bacteriano

6.1 Objetivo general

Conocer los métodos básicos para inhibir el crecimiento microbiano y sus mecanismos de acción.

6.2. Objetivos específicos

- Evaluar los efectos de los factores físicos (temperatura, presión osmótica y radiación ultravioleta) sobre las cepas microbianas.
- Determinar los efectos de los agentes químicos (desinfectantes y antisépticos), en las poblaciones microbianas.
- Comprobar y conocer los métodos de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana.

6.3 Introducción

El control de los microorganismos es de gran importancia en las áreas domésticas, industriales y médicas. Los mecanismos más comunes para regular el crecimiento bacteriano involucran agentes químicos y físicos que afectan de manera adversa las estructuras bacterianas y su función; produciendo un efecto microbicida o microbiostático. Un microbicida elimina los microorganismos; un microbiostático inhibe las capacidades reproductivas de las células, sin matar necesariamente el microorganismo (Kampf, 2018).

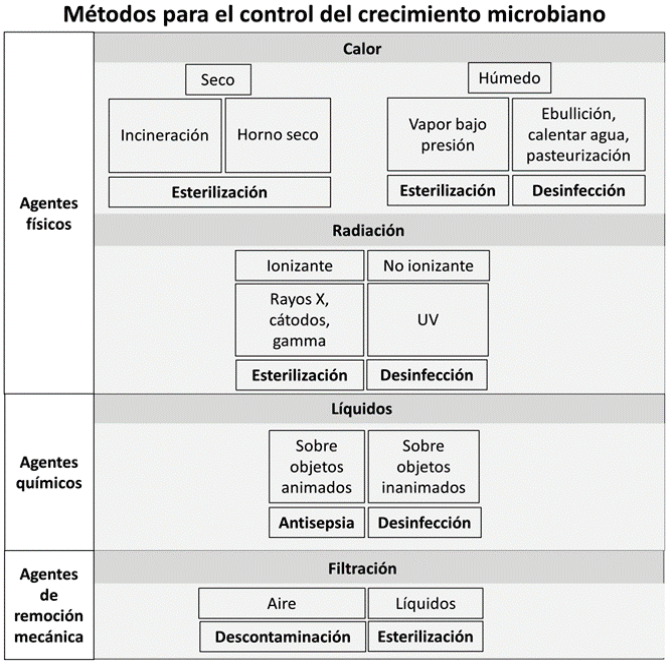
Los métodos para el control de crecimiento microbiano se pueden definir de la siguiente manera:

- **Esterilización:** eliminación de todas las formas de vida microscópicas, incluyendo esporas. Se usa en objetos y áreas.
- **Esterilización comercial (apertización):** aplicación de calor para destruir o inhibir totalmente las esporas, microorganismos y sus toxinas, con el fin de estabilizar biológicamente los alimentos envasados.
- **Desinfección:** destrucción o inhibición de la forma vegetativa de microorganismos en objetos inanimados.
- **Antisepsia:** destrucción o inhibición de la forma vegetativa de microorganismos en tejidos vivos.
- **Desgerminación:** eliminación de microbios en un área determinada.
- **Sanitización:** tratamiento que reduce el conteo microbiano a niveles aptos para la salud pública.
- **Descontaminación:** remoción mecánica de material orgánico.

Cada uno de estos métodos requiere la acción de un agente químico, físico o mecánico para el control del crecimiento bacteriano, como se describe en la **Figura 6.1.**

Los agentes físicos y químicos varían ampliamente, así mismo, son diversos los efectos que estos tienen sobre la composición molecular de las estructuras bacterianas, por ejemplo, el alcohol puede eliminar totalmente a bacterias Gram positivas, pero es posible que en las Gram negativas solo sirva para detener el crecimiento temporalmente **(Tabla 6.1)**.

Figura 6.1. *Métodos de control del crecimiento bacteriano.*



Fuente: modificado de Cowan y Bunn (2015).

Tabla 6.1. *Acción molecular de algunos agentes químicos sobre las estructuras y funciones bacterianas.*

Parte afectada	Agentes químicos usados	Efectos
Pared celular	Detergentes Alcohol	Inhibición de la síntesis. Descomposición de la pared celular.
Membrana citoplasmática	Detergentes	Lisis de la membrana (degradación de lípidos), alteración de la presión osmótica y permeabilidad selectiva.
Síntesis celular	Radiación UV	Interrupción de la síntesis ribosomal, desnaturación de proteínas con función metabólica. Alteran la información genética por la formación de dímeros.

Fuente: modificado de Cowan y Bunn (2015).

Métodos físicos para el control del crecimiento bacteriano

Entre los numerosos agentes físicos que existen para el control de los microorganismos, la temperatura es uno de los más efectivos. Existen otros agentes como la luz UV, el ultrasonido (sonicación) y la filtración, estos son usados con mayor frecuencia en superficies y materiales termolábiles. Aunque estos agentes son efectivos, su uso es principalmente para el control del crecimiento de poblaciones pequeñas.

- **Temperatura**

Existen diversas maneras de aplicar temperatura para controlar el crecimiento microbiano, ya sea mediante calor seco, húmedo o la refrigeración. Dependiendo de la población expuesta a estas condiciones, los efectos pueden ser microbicidas o microbiostáticos; estas diferencias pueden ser expresadas a través del **Punto de Muerte Térmica (PMT)**, referencia que tiene en cuenta la menor temperatura, a la cual la mayoría de microorganismos muere en un periodo de 10 minutos (Akkermans y Noriega, 2017). También, se debe considerar la medida del **Tiempo de Muerte Térmica (TMT)**, es decir, el periodo mínimo de tiempo para que todas las bacterias mueran a una temperatura dada. Ambos conceptos son importantes para estandarizar la aplicación de calor o frío, según sea la necesidad (Brown y Smith, 2017).

Algunos métodos que involucran la temperatura para controlar los microorganismos incluyen:

1. Autoclavado (calor húmedo a alta presión).
2. Tindalización.
3. Pasteurización.
4. VAT: también llamada pasteurización lenta a bajas temperaturas.
5. HTST: pasteurización a temperaturas altas en corto tiempo.
6. UHT: proceso desarrollado a ultra altas temperaturas.
7. Ebullición.
8. Calor seco: desecación, flameado e incineración.

Basándose en los requerimientos térmicos de cada organismo, se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Psicrófilos: desarrollo óptimo entre -5°C y 15°C.
2. Mesófilos: crecimiento entre 25°C y 45°C.
3. Psicrótrofos: son organismos mesófilos, que pueden desarrollarse a temperaturas entre 4°C a 7°C.
4. Termodúricos: son organismos mesófilos que pueden crecer hasta temperaturas de 65°C.
5. Termófilos: crecimiento entre 45°C y 70°C.
6. Hipertermófilos: se desarrollan sobre los 70°C.

La temperatura afecta factores metabólicos de las células. En este sentido, por encima de la temperatura máxima de tolerancia, los lípidos y ribosomas se ven afectados. Así mismo, las proteínas pierden sus estructuras primarias y secundarias, ya que, al desnaturalizarse pierden su función. A temperaturas bajas la actividad enzimática se reduce; por lo tanto, no se presenta división celular, es decir, los organismos pasan a un estado de latencia (Bridier, 2019).

Radiación

En este caso se exponen las superficies a la luz con diferentes longitudes de onda (rayos X, rayos gamma, rayos ultravioleta). Tanto los rayos X como los gamma transfieren energía a los átomos de las moléculas celulares, de esta manera, alteran su estructura química y, por ende, su función metabólica. La luz UV afecta los enlaces entre las bases nitrogenadas del ADN y, finalmente, interfiere con la replicación y transcripción de las proteínas (Hörtnagl et al., 2011).

La radiación ultravioleta de 260 nm tiene el mayor porcentaje de absorción por parte del ADN, razón por la cual se usa comúnmente como germicida. A esta longitud de onda causa la formación de dímeros de pirimidinas. Dicha alteración se origina con un enlace covalente entre dos moléculas de timinas o citocinas adyacentes en el ADN, lo que causa que este se deforme, de tal manera que la ADN polimerasa no puede replicar las hebras del material genético al pasar por este punto. La efectividad de la luz UV para eliminar microorganismos depende de factores como una correcta descontaminación, del tiempo de exposición y de la vida útil de la lámpara (Pommerville, 2012).

Filtración

Generalmente se utiliza para esterilizar materiales termolábiles, como por ejemplo, los suplementos para la preparación de medios de cultivo, también enzimas y antibióticos en solución. En la actualidad existen filtros con diámetro de poro de hasta 0,01 µm, capaces de retener virus e incluso algunas proteínas de gran tamaño (Tortora et al., 2019).

Métodos químicos para el control de crecimiento microbiano

Los agentes químicos pueden ser utilizados para controlar el crecimiento microbiano en tejidos vivos o en objetos inanimados. Muy pocos agentes químicos logran la esterilización en tejidos o materiales inertes, la mayoría solo logran eliminar las formas vegetativas o reducir la población de los patógenos, por lo que es importante conocer los mecanismos de acción para realizar la elección correcta frente a cada situación y aprovechar la acción sinérgica entre dos o más compuestos (Kampf, 2018). Se clasifican según el tipo de organismo frente al cual actúan (bacteria, hongos, virus, esporas) y según la acción en microbicidas o microbiostáticos.

Antisépticos

Son sustancias químicas usadas en tejidos vivos que matan o inhiben el desarrollo de las formas vegetativas de los microbios. La interacción entre estos agentes tóxicos y partes constitutivas de los microorganismos, como enzimas o la pared celular inhiben la capacidad de supervivencia de las células microbianas. Ejemplos de antisépticos son:

Alcohol: el etanol es un alcohol simple, volátil, inflamable, incoloro y de olor característico. Es efectivo solo a partir de concentraciones superiores al 60%. Su mecanismo de acción se basa en la desnaturación de las proteínas estructurales de las membranas celulares. Como desventajas se tiene una baja toxicidad contra endoesporas y algunos virus desnudos; también presenta alta volatilidad y pierde su efectividad rápidamente. Una ventaja es que su toxicidad para la piel humana es relativamente baja.

Yodo o isodine: es una mezcla química estable de polivinilpirrolidona (PVP) y yodo elemental que contiene de 9.0 a 12.0% de yodo disponible. La PVP es el yodóforo encargado de transportar el yodo elemental y de limitar los efectos secundarios que este pudiese ocasionar (irritación), pero al mismo tiempo se encarga de que haya suficiente yodo disponible para que la mezcla no pierda eficacia. Su mecanismo de acción no es selectivo y tiene un patrón de adsorción alto, con afinidad por las proteínas, peptidoglucanos y enzimas en el citoplasma (Tsuda et al., 2020).

Jabones antibacteriales: los jabones antimicrobianos pueden basarse en diferentes tipos de agentes biocidas, tales como el triclosan, DDAC (amonio cuaternario), digluconato de clorhexidina, entre otros; la mayoría de los productos contienen un único biocida, aunque se pueden encontrar combinaciones, como es el caso de aquellos productos que mezclan DDAC con y alkilaminas o hipoclorito de sodio, para inhibir el crecimiento de bacterias resistentes al amonio cuaternario como *E. coli* y *P. aeruginosa*.

El mecanismo de acción general de estos componentes se basa en el uso de agente químicos que alteran la estabilidad de las proteínas presentes en las membranas celulares o cubiertas víricas. La concentración y el tiempo de exposición al producto son factores determinantes en su efectividad (Pérez-Garza et al., 2017).

Desinfectantes: son sustancias químicas usadas en superficies no vivas que matan o inhiben el desarrollo de las formas vegetativas de los microorganismos. Al momento de seleccionar un desinfectante apropiado se deben considerar factores prácticos como el tiempo de exposición, la concentración para eliminar microorganismos, la temperatura y el pH óptimo, además, se debe considerar el material del objeto de desinfección y su grado de contaminación.

Hipoclorito de sodio: el principio activo liberado por el hipoclorito de sodio en soluciones acuosas es el cloro activo. El ion hipoclorito está en equilibrio con el ácido hipocloroso y el cloro, este balance depende del valor del pH:

- El cloro activo está disponible solo por debajo de pH 4.
- El ácido hipocloroso está disponible sobre valores neutros del pH.
- El ión hipoclorito está disponible por encima de pH 10.

La eficacia desinfectante de la solución acuosa de hipoclorito de sodio depende de la concentración de cloro activo, disminuye con un aumento del pH y viceversa. La actividad se ve fuertemente reducida por la presencia de carga orgánica.

Comúnmente se utiliza en diferentes productos y concentraciones, por ejemplo, en algunos se usa en geles antibacteriales, antiséptico para salas de operación, antisépticos (0.01-0.05%), desinfectante de superficies y desinfectante de instrumental quirúrgico (0.0125-0.05%).

Algunas de las concentraciones de hipoclorito de sodio usado en diferentes entornos son las siguientes:

- Agua 1-2 ppm
- Superficies 500-615 ppm
- Frutas y hortalizas 100-150 ppm
- Superficies porosas o lisas 4000-5000 ppm
- Centro de salud pública (zonas críticas) 5000-7000 ppm

El hipoclorito de sodio actúa de manera similar al alcohol, alterando la composición de las proteínas estructurales de la membrana celular y reduciendo la viabilidad de las células (Köhler et al., 2018).

Otro grupo importante de agentes químicos son los agentes antimicrobianos que incluyen los antibióticos y quimioterapéuticos. Los antibióticos son aquellos sintetizados por microorganismos y los quimioterapéuticos son aquellos obtenidos mediante síntesis química. Ambos destruyen o inhiben el desarrollo de los microorganismos.

- **Agentes quimioterapéuticos**

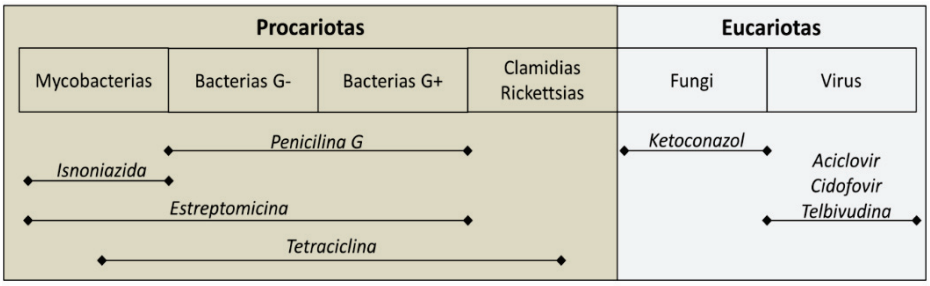
Destruyen o inhiben el desarrollo de microorganismos. Por ejemplo, mientras algunos pueden ser efectivos contra bacterias Gram positivas (espectro reducido), otros actuarán mejor al controlar microbios Gram negativos, también existen aquellos que tienen efecto contra ambos tipos de organismos (espectro intermedio o amplio). Es importante conocer el mecanismo de acción de cada uno, para elegir el indicado al momento de controlar una infección (Malik y Brötz-Oesterhelt, 2017).

Al momento de reducir la proliferación de algunos microorganismos infecciosos que tienden a desarrollar resistencia, es necesario realizar pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Esta prueba se realiza *in vitro,* donde se expone un patógeno determinado a diferentes fármacos antimicrobianos para observar su efecto sobre el crecimiento (susceptible o resistente). Para medir la interacción antibiótico- microorganismo se utiliza la técnica de *Kirby-Bauer,* la cual es una prueba de difusión en agar que provee datos útiles para cuantificar la susceptibilidad antimicrobiana. Esta prueba se realiza en agar Müeller-Hinton, en el cual se siembra de forma masiva la cepa bacteriana a evaluar, seguidamente, sobre la superficie del cultivo se ubican los sensidiscos que contienen una concentración específica. Luego de la incubación, se observar la ausencia o presencia del halo de inhibición, si se presenta, debe medirse para comparar con los estándares establecidos para cada medicamento y definir si son sensibles o resistentes. Este procedimiento se conoce como antibiograma (Cowan y Bunn, 2015).

Para elegir el antibiótico a utilizar es importante conocer el sitio diana de acción de cada uno. El metabolismo de una célula activa está marcado por la producción de nuevos componentes para la pared celular, ADN, ARN, proteínas y membrana citoplasmática (Granato et al., 2018). En este sentido, los medicamentos antimicrobianos están divididos según la categoría de sitios diana que tiene cada uno **(Figura 6.2)**:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular: penicilinas, cefalosporinas, carparabenos, bacitracina, vancomicina, fosfomicina trometamina.
- Inhibición de la estructura y función de los ácidos nucleicos (ADN y ARN): fluoroquinolonas, trovafloxacina y rifamicina.
- Inhibición de la síntesis de proteínas: aminoglucósidos, tetraciclinas, glicilciclinas, macrolidos, clindamicina, entre otros.
- Interferencias con la estructura y función de la membrana citoplasmática: polimixinas.
- Inhibición de la síntesis de ácido fólico: sulfonamidas.

Figura 6.2. *Espectro de la actividad de los antibióticos.*



Fuente: Autores (2023).

6.4. Equipos

Incubadora, refrigerador, mechero, lámpara UV.

6.5. Insumos y materiales

Asas microbiológicas rectas y redondas, hisopos esterilizados, regla milimétrica, marcador permanente, cámara fotográfica, vinipel, tarjeta de cartón 4x5 cm, pinzas, pipeta pasteur, discos para antibiograma, antimicrobianos.

6.5.1. Medios y organismos

Agar nutritivo, agar Mueller-Hinton, cepas bacterianas: *Staphylococcus sp, E. coli, Pseudomonas sp, Bacillus sp.*

- **Temperatura**

En este experimento será analizado el efecto de tres temperaturas diferentes sobre cuatro cepas bacterianas distintas. Lo que se busca con esta práctica es determinar cuáles son los rangos térmicos óptimos para el desarrollo de cada uno de los microorganismos empleados. Se utilizarán observaciones básicas para describir la capacidad adaptativa de las bacterias a cada ensayo **(Figura 6.3)**.

Primera parte

1. Marcar la cubierta de cada una de las cajas de Petri con el tipo de agar a utilizar, indicando la temperatura experimental a la que serán expuestas: 4°C, 37°C y 50°C.
2. Marcar la parte inferior, de tal manera que se diferencie la zona donde se cultivará cada una de las cuatro cepas seleccionadas.
3. Con un asa microbiológica inocule cada uno de los medios de cultivo, realizando una línea recta dentro las zonas demarcadas para cada organismo a estudiar.
4. Incube cada una de las placas de Petri con agar durante 24 a 48 horas, teniendo en cuenta la temperatura asignada a cada ensayo.

Segunda parte

1. Observe el crecimiento de las colonias en cada uno de los medios de cultivo expuestos a diferentes temperaturas.
2. Registre sus resultados en las tablas del reporte de laboratorio.

- **Radiación UV**

Para este ensayo es importante que siga las indicaciones dadas por el docente sobre las medidas de seguridad (evitar ver directamente la luz y utilizar protección ocular adecuada) y los intervalos de tiempo para cada caso. Lo que se busca demostrar con este experimento es la susceptibilidad de los microorganismos seleccionados frente a la luz UV durante dos periodos de tiempo diferentes **(Figura 6.3)**.

Primera parte

1. Marque la cubierta de las placas de Petri con el tiempo de exposición correspondiente: 15’ y 30’. Luego, usando un asa, realice la siembra en línea recta de cada microorganismo en el agar nutritivo.
2. Siguiendo las indicaciones de seguridad del laborista encargado, cubra la mitad de las placas de Petri con la tarjeta de cartón de 4x5 y ubíquelas debajo de la lámpara de luz UV de 30W.

3. Después de exponer cada medio de cultivo a la luz UV durante los periodos asignados, retírelos de la fuente lumínica, remueva la tarjeta de cartón e incubarlas a 37°C durante 24 a 48 horas.

Segunda parte

1. Observe el crecimiento de las colonias en los dos medios de cultivo expuestos a la luz UV.
2. Registre sus resultados en las tablas del reporte de laboratorio.

Antibiograma

En este experimento se evaluarán distintas bacterias, cada grupo de estudiantes inoculará en el medio de cultivo con una cepa bacteriana distinta y evaluará la susceptibilidad que presenta, frente al menos cinco antibióticos **(Figura 6.3)**.

Primera parte

1. Seleccionar el microorganismo con el que se va a trabajar, cualquiera del ceparios, se sugieren: *Staphylococcus sp., E. coli., Pseudomonas sp, Bacillus sp. Klebsiella sp.*
2. Marcar la placa Petri con el nombre de la cepa correspondiente.
3. Utilizando un hisopo estéril, realizar siembra masiva en el agar *Mueller-Hinton*.
4. Dejar pasar de 3 a 5 minutos para que la superficie del agar se seque antes de aplicar los discos con antibióticos.
5. Ubique los sensidiscos sobre el medio de la siguiente manera: flamee la punta de las pinzas antes de tomar los discos, posteriormente, ubíquelos de forma equidistante que queden en un espacio de 1,5 cm entre ellos y el borde de la caja. Aplique una presión ligera sobre cada disco, luego de haberlo ubicado en el sitio definitivo.
6. Incube la placa de Petri durante 16 a 18 horas y a 37°C.

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo sobre antibiograma. https://youtu.be/NQz6OH65Opo

Segunda parte

1. Después del periodo de incubación mida el diámetro de los halos de inhibición alrededor con una regla. Si no hay presencia de halo, registre el resultado como cero.
2. Registre las medidas de las zonas en la tabla de reporte de laboratorio.
3. Para determinar a cuáles agentes quimioterapéuticos el organismo es Sensible (S), Resistente (R) o Intermedio (I), consulte la tabla estandarizada del método *Kirby-Bauer*.

Antimicrobianos

En este experimento se evaluará la efectividad relativa de cinco agentes químicos sobre distintas bacterianas. En una placa de Petri con agar *Mueller-Hinton*, y sembrada de forma masiva, se realizarán perforaciones para adicionar los antimicrobianos a evaluar. Es importante aclarar que a diferencia de los discos usados para la prueba de Kirby-Bauer, en este caso no se conoce la concentración precisa de los principios activos presentes en los productos a usar. Se realizará la

medición correspondiente al diámetro de cada halo de inhibición, para evaluar la efectividad de cada sustancia en el control microbiano.

Primera parte

1. Marque la parte superior de las cajas de Petri con el nombre de la cepa. En la parte inferior y de manera equidistante señale cinco puntos, que serán la referencia para la realización de las perforaciones. Marque cada punto como AL (alcohol), IS (isodine), JB (jabón antibacterial), HS (hipoclorito de sodio) y PO (peróxido de hidrógeno) **(Figura 6.3)**.
2. Realizar siembra masiva en el medio Muller Hinton, con la cepa bacteriana asignada.
3. Esterilice el extremo de un asa redonda e introdúzcalo a no menos de 1.5 cm del borde del agar, gírelo cuidadosamente de manera que al retirarla quede en el medio una perforación. Repita este procedimiento para cada uno de los puntos dibujados en el primer paso.
4. Con una pipeta Pasteur, deposite en cada perforación cantidades similares de cada uno de los antimicrobianos seleccionados.
5. Incube las placas de Petri durante 48 horas a 37°C.

Segunda parte

1. Determine la zona de inhibición correspondiente a cada agente químico midiendo el diámetro del halo alrededor de cada perforación.
2. Evalué la efectividad de antisépticos y desinfectantes, teniendo en cuenta el diámetro de los halos de inhibición. Registre sus resultados en las tablas de reportes de resultado de laboratorio.

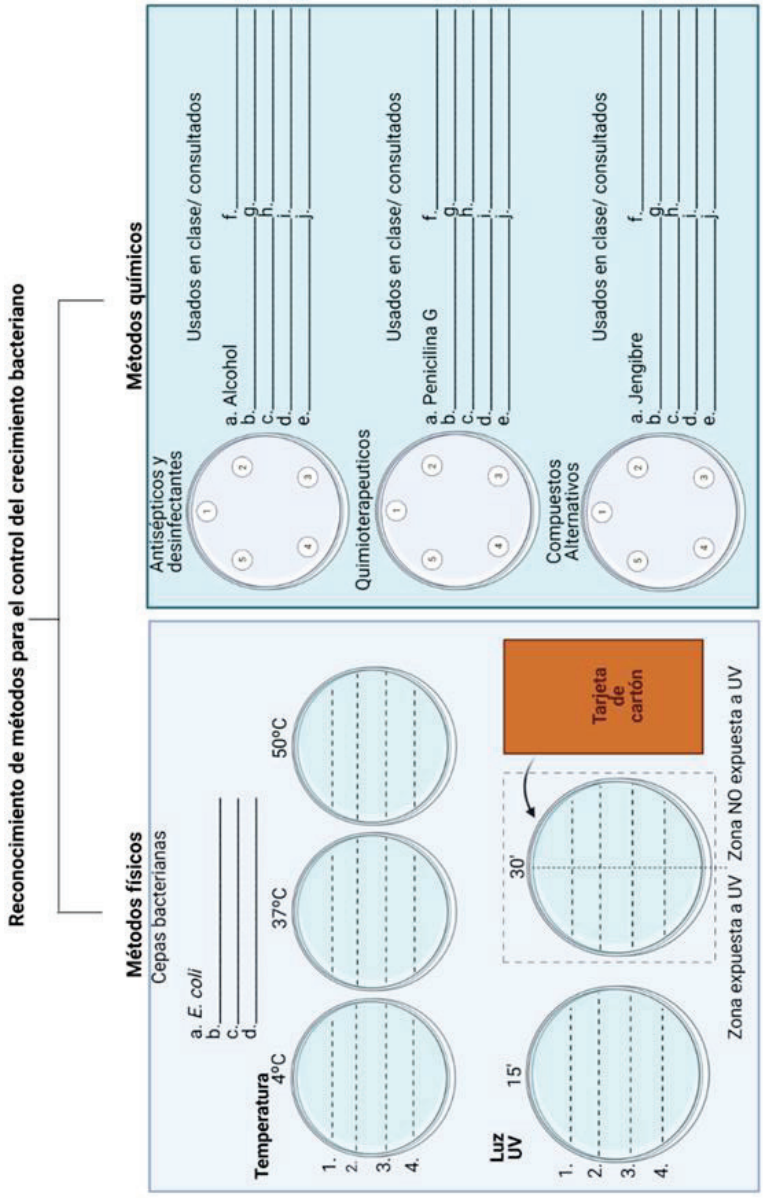


Figura 6.3. *Metodología para evaluar agentes físicos y químicos en el control del crecimiento bacteriano.*

Fuente: Autores (2023).

6.6. Resultados

Temperatura y exposición UV

Registre sus resultados según el criterio: 0 = sin crecimiento, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = abundante.

Tabla 6.2. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de temperatura y exposición UV.*

Cepa utilizada	Temperatura			Exposición UV	
	4°C	37°C	50°C	15’	30’
1.					
2.					
3.					
4.					

Fuente: Autores (2023).

Haga un listado de mayor a menor donde indique las cepas que tuvieron de mayor a menor crecimiento en las pruebas de temperatura y exposición UV.

Tabla 6.3. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de temperatura y exposición UV.*

Temperatura	Exposición UV
1.	**1.**
2.	**2.**
3.	**3.**
4.	**4.**

Fuente: Autores (2023).

- **Antibiograma**

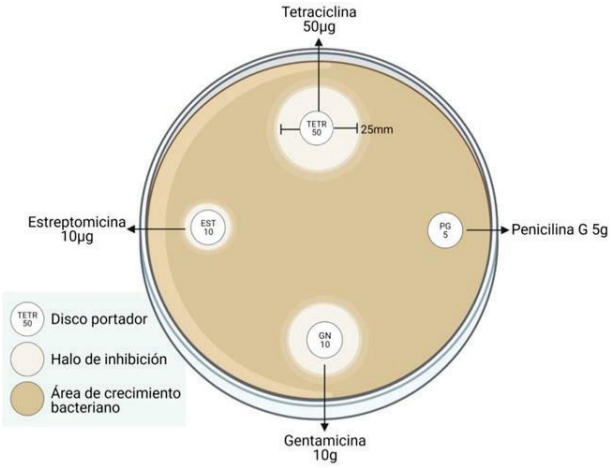
Registre el diámetro de las zonas de inhibición correspondiente a cada disco **(Figura 6.4.)** y discrimine la susceptibilidad de cada uno entre: Resistente (R), Intermedio (I) o Sensible (S). Como se mencionó anteriormente, para conocer las categorías interpretativas debe consultar en fuentes externas los valores correspondientes al diámetro específico de cada antibiótico frente a las cepas evaluadas.

Tabla 6.4. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de antibiograma.*

Antibiótico	Sigla	Concentración del disco	Categorías interpretativas y diámetros de zonas			Resultados obtenidos	
			Sensible	Intermedio	Resis-tente	Diámetro (mm)	Suscepti-bilidad
1.							
2.							
3.							
4.							
5.							

Fuente: Autores (2023).

Figura 6.4. *Observación y presentación de los halos inhibitorios.*



Fuente: modificado de Cowan y Bunn (2015).

Cada disco de antibiograma tiene inscrita la sigla, que es la forma internacional de abreviarlo y un número que corresponde a la concentración y unidades respectivas.

- Para realizar la medición de los halos de inhibición utilice la regla milimetrada y registre el diámetro total de la circunferencia.
- Recuerde que es necesario manejar correctamente las prácticas asépticas durante cada paso de la medición para evitar la contaminación de los medios.
- Utilice estas indicaciones para el experimento con antimicrobianos.

Tabla 6.5. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas.*

Antimicrobiano	**Cepa utilizada:**
	Diámetro del halo (mm)
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	

Fuente: Autores (2023).

Registre el diámetro de las zonas de inhibición correspondiente a cada disco.

6.7 Cuestionario

1. Comente el efecto microbiostático de las bajas temperaturas y el efecto bactericida de las altas.
2. Mencione las ventajas y desventajas de la tindalización y el autoclavado.
3. Discuta el efecto detrimental de cada uno de los agentes de control en el siguiente orden: citoplasma, pared celular, ácidos nucleicos, membrana celular.
4. Explique ¿por qué la leche se pasteuriza y no se esteriliza?
5. Justifique ¿por qué las bacterias formadoras de endosporas son más resistentes a las altas temperaturas?
6. Explique el mecanismo de acción de la luz UV sobre las bacterias.
7. De acuerdo con los resultados de sus pruebas de laboratorio, explique ¿por qué algunas bacterias son más susceptibles a determinados antibióticos?.

Referencias bibliográficas

Akkermans, S. y Noriega, E. (2017). Introducing a novel interaction model structure for the combined effect of temperature and pH on the microbial growth rate. *International Journal of Food Microbiology*, *240*, 86–96. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.011.

Bridier, A. (ed). (2019). *Foodborne bacterial pathogens*. Springer.

Brown, A. E. y Smith, H. R. (2017). *Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology* (Fourteenth, Vol. 7). New York: Mc Graw Hill Education.

Cowan, M. K. y Bunn, J. (2015). *Microbiology fundamentals: a clinical approach* (Second Edition). New York: Mc Graw Hill Education.

Granato, P. A., Morton, V. y Morello, J. A. (2018). *Laboratory manual and workbook in microbiology: applications to patient care*. Mc Graw Hill Education.

Hörtnagl, P., Pérez, M. T. y Sommaruga, R. (2011). Contrasting effects of ultraviolet radiation on the growth efficiency of freshwater bacteria. *Aquatic Ecology*, *45*(1), 125–136. https://doi.org/10.1007/s10452-010-9341-9

Kampf, G. (2018). *Antiseptic stewardship*. Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98785-9

Köhler, A., Rodloff, A., Labahn, M., Reinhardt, M., Truyen, U. y Speck, S. (2018). Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Journal of Hospital Infection*, *100*(3), 40–46. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.07.017.

Malik, I. T. y Brötz-Oesterhelt, H. (2017). Conformational control of the bacterial Clp protease by natural product antibiotics. *Natural Product Reports*, *34*(7), 815–831. https://doi.org/10.1039/c6np00125d

Pérez-Garza, J., García, S. y Heredia, N. (2017). Removal of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* after hand washing with antimicrobial and nonantimicrobial soap and persistence of these bacteria in rinsates. *Journal of Food Protection*, *80*(10), 1670–1675. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-088

Pommerville, J. (2012). *Alcamo's fundamentals of microbiology* (2nd Edition). Jones & Bartlett Learning.

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Tsuda, S., Soutome, S., Hayashida, S., Funahara, M., Yanamoto, S. y Umeda, M. (2020). Topical povidone iodine inhibits bacterial growth in the oral cavity of patients on mechanical ventilation: A randomized controlled study. *BMC Oral Health*, *20*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/s12903-020-1043-7

Práctica 7.

Cuantificación microbiana

7.1. Objetivo general

Conocer las metodologías de recuento utilizadas para la cuantificación microbiana en diferentes muestras.

7.2. Objetivo específico

Obtener nuevos conocimientos que permitan desarrollar habilidades para realizar una cuantificación microbiana de manera correcta.

7.3. Introducción

En microbiología existen diferentes métodos que son utilizados para cuantificar poblaciones microbianas; dependiendo del tipo de muestra que se obtenga y de los análisis que se quieren llevar a cabo es necesario conocer la cantidad de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) presentes.

Las técnicas más empleadas para la determinación de poblaciones bacterianas presentes en el agua, alimentos o suelo son:

El **recuento en placa** es una de las metodologías que se usa con mayor frecuencia, nos permiten identificar el número de células viables que se pueden encontrar en una muestra líquida. Conocer la densidad celular es un saber muy importante; ya que la cantidad de células bacterianas en la leche, el agua potable e incluso el océano afecta directamente las actividades humanas (Chess, 2012). En este método, la muestra será diluida en serie y, de esta manera, se producirán varias muestras con densidades celulares decrecientes. Cada dilución está representada por un factor de dilución, término que corresponde a la cantidad de la muestra original todavía presente en la muestra actual; por ejemplo, si 10 ml de una muestra se diluye en 90 ml de diluyente, el factor de dilución es 10^{-1}, ya que la muestra ahora es 1/10 de su concentración original (Chess, 2012). Para conseguir este factor de dilución se mide una cantidad de muestra (gr o ml) y el resultante se multiplica por 9, este nuevo resultado serán los mililitros de diluyente que se debe añadir a la muestra para lograr la dilución decimal (Rojas-Triviño, 2011). El uso de factores de dilución, junto con una medición cuidadosa, permite la determinación precisa de la densidad celular en una muestra. Luego de realizadas las diluciones se procede a una siembra en profundidad o en superficie.

- En el **recuento en placa por siembra en profundidad**, el medio de cultivo fundido a 50ºC se vierte sobre una placa de Petri que contiene una alícuota de 1ml, posteriormente, son homogeneizados el medio y la muestra. Es un método generalmente utilizado para el recuento de microorganismos anaerobios facultativos, microaerófilos y mesófilos (Ramírez et al., 2017).
- En el **recuento en placa por siembra en superficie**, 0,1 ml de la dilución es depositada

sobre la superficie del medio de cultivo, posteriormente, utilizando un asa de hockey se extiende la muestra, de esta forma crecen las colonias sobre el medio. Generalmente se utiliza esta técnica para el recuento de bacterias aerobias (Ramírez et al., 2017).

- El método del **Número Más Probable (NMP)** es un sistema de tubos múltiples que consta de tres series de tres tubos. A partir de los tubos positivos, ya sea por turbidez, gas, cambio de pH u otro indicador, se obtiene un código, donde por comparación con tablas estandarizadas (Tabla de McGrady). Se obtiene el número probable de los microorganismos presentes en la muestra. Este método se utiliza con mucha frecuencia para conocer el NMP de coliformes, pero es útil también para otros grupos de microorganismos como anaerobios, *Pseudomonas*, nitrificantes y amonificantes (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001).

- El método más generalizado para el recuento de células totales es el que se hace directo al microscopio con ayuda de una cámara de recuento (**Cámara de Neubauer**). Las cámaras de recuento son placas de vidrio con una rejilla graduada en el centro que está ubicada a una profundidad de 100 micras (µm) con respecto de la superficie de la placa, y la rejilla posee una serie de cuadrantes cada uno con un área de 1/400 mm^2. Para llevar a cabo el recuento se adiciona con una micropipeta una alícuota de la mezcla de microorganismos (estos pueden provenir de diluciones según la densidad de la muestra), se cubre con una laminilla o cubreobjetos, se observa con el objetivo 40x y se cuentan las células en los diferentes cuadrantes. Se debe tener cuidado de no contar una misma célula dos veces **(Figura 7.1)** (Sanabria-Gómez y Acevedo, 2001).

  El número promedio por cuadrante será equivalente al número obtenido por:

N° de células = # células contadas * dilución * 1/factor de volumen

Factor de volumen = superficie * profundidad

Factor de dilución para leucocitos: 1/20

Factor de dilución para glóbulos rojos: 1/200

Por ejemplo, para los leucocitos la dilución es de 1/20, teniendo en cuenta que el número de valor de referencia es de 5000 a 10000/mm^3, para obtener solo los glóbulos blancos se realiza con una solución ácida, para destruir los glóbulos rojos (Líquido de Turk: ácido acético glacial al 3% más una gota de azul de metileno); la superficie en este caso es de 4mm, por lo que se hace en los 4 cuadros grandes, entonces al resolver la fórmula será:

Factor de volumen = 4mm *0.1mm = 0.4 mm3

1/factor de volumen = 1/0.4 = 2.5

Dilución 20*2.5 = 50 que será el factor siempre

N° de células = # células contadas * dilución * 1/factor de volumen

N° de células totales = N * 50

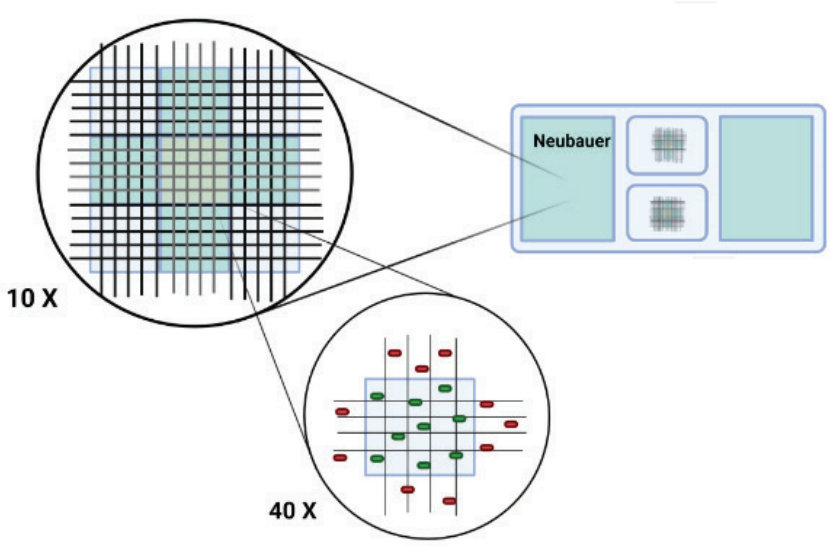
Entonces si conté 200 leucocitos el recuento total será:

N° de células totales = N * 50

= 200*50

= 10.000 mm3

Figura 7.1. *Cámara de Neubauer.* ***A.*** *Campo 10x, observación del retículo completo.* ***B.*** *Campo 40x, ampliación de una cuadrícula del retículo completo (Área de conteo).*



Fuente: Autores (2023).

El cuadrado grande central (que se puede ver en su totalidad con el objetivo 10X **(Ver Figura 7.2)**, está dividido en 25 cuadrados medianos (con el objetivo 40X se pueden ver los cuadrados medianos completamente), cada uno de ellos con 16 cuadrados pequeños en su interior. El recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio.

- La **turbidimetría** mide la reducción de la transmisión de luz debido a las partículas suspendidas y cuantifica la luz residual transmitida; en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso seco, independiente del tamaño celular del microorganismo (Martínez-Saldaña, 2012).

En microbiología, los estándares de McFarland son usados como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones bacterianas hasta que el número de bacterias llegue al rango establecido, por ejemplo, para pruebas de susceptibilidad (MDM Científica, 2015).

La escala de McFarland se basa en la capacidad de precipitación del cloruro de bario en presencia de ácido sulfúrico; la mezcla de ambos componentes forma un precipitado de sulfato de bario, el cual causa una turbidez en la solución. El objetivo es poder elaborar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón (Tabla de McFarland) y valorar su concentración (Rojas-Triviño, 2011).

Tabla 7.1. *Fórmula para la preparación de escala de McFarland.*

Nº	BaCl2 0,048M ml	H2SO4 0,36 M ml	Vf ml	Nº Células
0,5	0,05	9,95	10	$1,5 \times 10^8$
1	0,1	9,9	10	3×10^8
2	0,2	9,8	10	6×10^8
3	0,3	9,7	10	9×10^8
4	0,4	9,6	10	12×10^8
5	0,5	9,5	10	15×10^8
6	0,6	9,4	10	18×10^8
7	0,7	9,3	10	21×10^8
8	0,8	9,2	10	24×10^8
9	0,9	9,1	10	27×10^8
10	1	9	10	30×10^8

Fuente: Autores (2023).

- La determinación del **peso húmedo** se da a partir de una muestra en suspensión que es pesada luego de la separación de las células por filtración o centrifugación; por otro lado, la cantidad total de biomasa que puede estar presente en una muestra se mide en términos de **peso seco** por unidad de volumen, ya sea como Sólidos en Suspensiones Totales (SST) o Sólidos en Suspensiones Volátiles (SSV) (Martínez-Saldaña, 2012).

7.4. Equipos

Espectrofotómetro, incubadora, centrifugadora.

7.5. Insumos y materiales

Pipetas estériles, cajas de petri, tubos de ensayo, Erlenmeyer, marcador, gradilla, muestra de alimento, agua o suelo.

7.6. Medios y microorganismos

- Hongos y levaduras: *Candida sp.*
- Medio para NMP: agua de charco y agua de filtro.
- Medio para recuento en placa: alimentos.

7.7. Procedimiento

7.7.1. Diluciones seriadas para recuento en placa (Figura 7.2)

1. Inicialmente realice los cálculos de dilución indicados por el personal del laboratorio o el profesor.
2. Mida en peso o volumen 10 g o ml de la muestra y realice la dilución en 90 ml del diluyente, lleve a agitación por 15 min.
3. Con una pipeta estéril tome 1ml de la muestra, y transfiera al primer tubo que contiene 0,9 ml del diluyente. Agitar. Todos los tubos deben ir marcados con el tipo de muestra, medio y dilución.

4. Con otra pipeta transfiera 1ml de la dilución anterior al siguiente tubo con 9ml de diluyente y así sucesivamente para todas las diluciones a realizar.

5. Con estas diluciones se puede realizar siembra en profundidad o por superficie.

7.7.2. .Siembra en profundidad (Figura 7.2)

1. En la caja de Petri estéril agregar el 1ml de la dilución requerida para el conteo en placa, no olvide que todas las cajas deben ir debidamente marcadas.

2. Añadir a cada caja de Petri el medio de cultivo fundido a utilizar y mézclelo con el inóculo suavemente; cuando esté solidificado incube con las cajas invertidas.

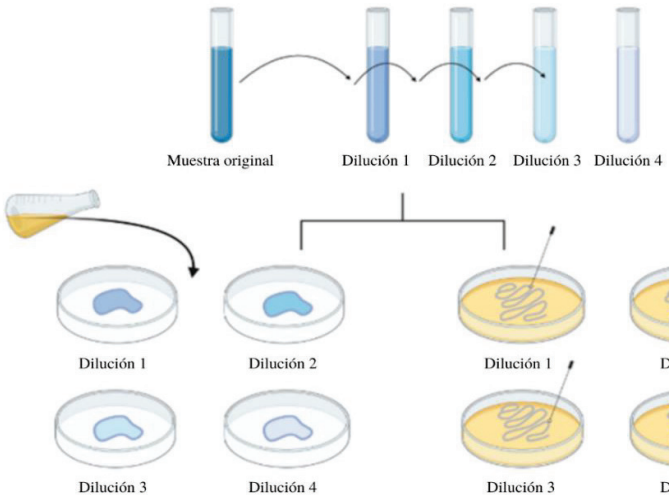
3. El recuento se debe realizar en las cajas de Petri que contengan entre 30 y 300 colonias (UFC).

7.7.3. Siembra en superficie

1. Transferir 0.1 ml de la dilución requerida sobre el medio de cultivo a utilizar (marcado adecuadamente), luego con ayuda de un asa de drigalsky o rastrillo bacteriológico extienda la muestra hasta que se absorba completamente en el medio. Incubar con las cajas invertidas.

2. El recuento se debe realizar en las cajas de Petri que contengan entre 30 y 300 colonias (UFC).

Figura 7.2. *Recuento en placa. Esquema experimental de los métodos de siembra.* ***1.*** *En profundidad.* ***2.*** *En superficie.*



1. **Siembra en profundidad:** La muestra se añade a la caja de petri vacía y posterior a esto el medio de cultivo fundido

2. **Siembra en superficie:** La muestra se esparce sobre la superficie del medio de cultivo

Fuente: Autores (2023).

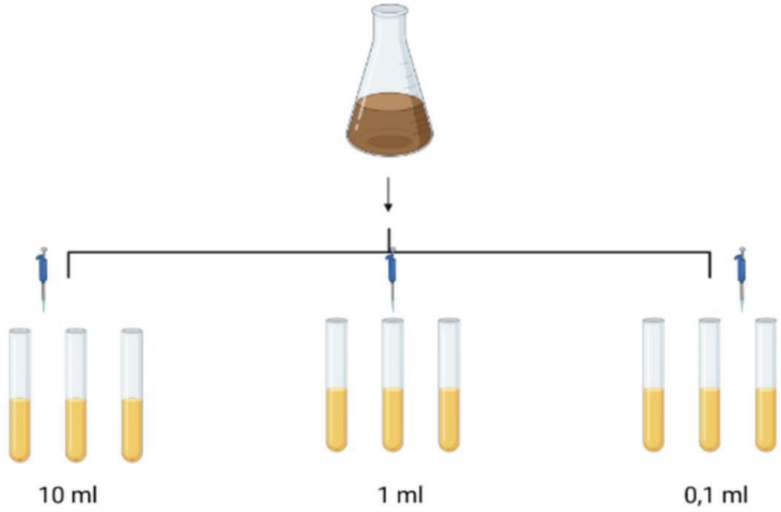
7.7.4. Número más probable (Figura 7.3)

1. A un erlenmeyer que contiene 90 ml del medio requerido de acuerdo con la muestra, se le adiciona 10 g de la muestra en estudio (suelo, agua).

2. Se preparan 9 tubos conteniendo 9 ml del medio de interés acorde a las recomendaciones de la casa comercial.

3. La siembra de las diluciones se hará de acuerdo con la muestra, revisar el *capítulo 11* para aguas y alimentos. En el caso de muestras de suelo se inoculará 1 ml de las diluciones de interés, las cuales se realizarán por triplicado.
4. Incube a la temperatura y tiempo de crecimiento de los microorganismos a estudiar.
5. Pasado el tiempo de incubación, proceda a leer los resultados.

Figura 7.3. *Técnica del Número Más Probable (NMP). Primera fase para la determinación y análisis microbiológico de diferentes muestras.*



NMP: Después de realizar todas las diluciones correspondientes, incube a la temperatura y tiempo indicado.

Fuente: Autores (2023).

7.7.5. Cámara de Neubauer

1. Tomar con micropipeta la muestra a estudiar.
2. Coloque el cubreobjetos y entre él y la cámara, deposite 50 µl de muestra.
3. Coloque la Cámara de Neubauer en la platina y haga el recuento correspondiente de acuerdo con la explicación dada en la introducción.
4. Haga el cálculo de la concentración.

7.7.6. Turbidimetría

1. Determine la turbidez de cada patrón de MacFarland mediante el uso del espectrofotómetro, luego proceda a calcular la población de bacterias en la muestra problema.
2. Vierta cada muestra problema en las celdas adecuadas para el espectrofotómetro y determine la Densidad Óptica (D.O.).

3. Grafique las lecturas obtenidas de la siguiente forma: En el eje Y los valores de D.O. y en el eje X el número aproximado de bacterias para cada patrón.

4. Calcule la población bacteriana en ufc/ml.

7.8. Resultados

7.8.1 Número Más Probable (NMP)

Tome foto o grafique las muestras observadas después de incubar, establezca la cantidad de positivos para obtener el número más probable con la ayuda de la Tabla de McGrady y realice el cálculo para conocer la carga microbiana de la muestra.

7.8.2. Recuento en placa

Realice una tabla donde describa el método de siembra utilizado, la dilución, los microorganismos encontrados y la cantidad de microorganismos contados. Haga los cálculos necesarios.

7.8.3. Cámara de Neubauer

- Grafique lo observado al microscopio, identifique el tipo de microorganismo que observó y realice los cálculos necesarios.

7.9. Cuestionario

1. ¿Cuáles son las ventajas y las desventajas del uso de cámaras recuento para cuantificar microorganismos?

2. ¿Cuántos leucocitos tienen los siguientes pacientes, si conté?

a). 50 células.

b). 350 células.

c). 35 células.

3. ¿Cuándo se utiliza un recuento en placa por superficie y cuándo un recuento en placa por profundidad?

Referencias bibliográficas

Chess, B. (2012). *Laboratory applications in microbiology* (Second Edition). Mc Graw Hill.

Martínez Saldaña, Y. E. (2012). *Determinación de Biomasa*. Universidad Nacional de Trujillo.

MDM Científica. (2015). Inserto Patrón McFarland. *MDM Científica Medios de Diagnóstico Microbiológico*, *285*(315), 2. www.mdmcientifica.com%0Amdmcientifica.com/productos/index.php?controller=attachment&i

Ramírez, J. A., Parra, J. A. y Alvarez, A. (2017). Análisis de técnicas de recuento de Microorganismos. *Mente Joven*, *6*, 01–08. https://doi.org/10.18041/2323-0312/mente_joven.0.2017.3665

Rojas-Triviño, A. (2011). *Conceptos y práctica de microbiología general.* Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, Palmira, Colombia, 161.

Sanabria-Gómez, S. J. y Acevedo, D. M. (2001). *Manual de laboratorio microbiología*. Universidad Del Valle, 40–42. http://www.etpcba.com.ar/documentosdconsulta/alimentos-procesos%20y%20qu%C3%8Dmica/manual-de-microbiolog%C3%ADa.pdf

8. Práctica

Observación y reconocimiento de hongos

8.1. Objetivo general

Estudiar las características de los hongos y sus principales métodos para aislamiento y observación.

8.2. Objetivos específicos

- Identificar las características macroscópicas de las colonias y microscópicas de las estructuras reproductivas de los hongos ambientales más comunes.
- Aprender algunas técnicas de montaje, cultivo y tinción para la observación de los hongos.

8.3. Introducción

La vida en la tierra sería muy diferente sin la presencia de los hongos, un grupo muy diverso que incluye organismos macroscópicos como las setas y microscópicos como los mohos y las levaduras; a la fecha se tienen registros de aproximadamente 148.000 especies (Species Fungorum, 2020), aunque se estima que el 90% permanecen sin ser descritas y que el número total puede estar entre 2.2 y 3.8 millones de especies (Cheek et al., 2020). La mayoría son unicelulares o coloniales y existen unos pocos pluricelulares como las setas. Pueden presentar formas celulares como levaduras o hifas; las especies que presentan las dos formas son clasificadas como dimórficas.

Los hongos son organismos eucariotas que comparten como característica general; la presencia de una pared celular compuesta por quitina, y la producción de exoenzimas, estas últimas pueden descomponer polisacáridos o proteínas en cada uno de sus componentes monoméricos, es decir, azucares, péptidos y aminoácidos, siendo responsables de la descomposición de la mayoría de los detritos vegetales y animales, desempeñando así un papel importante en la mineralización y reciclaje del material orgánico presente en diferentes ambientes (Tortora et al., 2019). Para el crecimiento de los hongos se requieren condiciones óptimas de oxígeno, diversos rangos de temperatura y pH, como los mostrados en la **Tabla 8.1.**

Tabla 8.1. *Condiciones ambientales promedio requeridas por los hongos.*

Oxígeno	Temperatura	pH
La mayoría de los hongos son aerobios, aunque existen excepciones, como las levaduras facultativas y hongos del filo neocalligasticamicota.	La mayoría de los hongos ambientales crece a 23°C; los patógenos se desarrollan óptimamente a 37°C y aquellos que son dimórficos se desarrollan tanto a 37°C como a 23°C.	Pueden adaptarse a ambientes ácidos y alcalinos, con un rango de pH entre 2.1 y 8.5.

Fuente: Autores (2023).

Los hongos pueden agruparse de acuerdo a sus características morfológicas en:

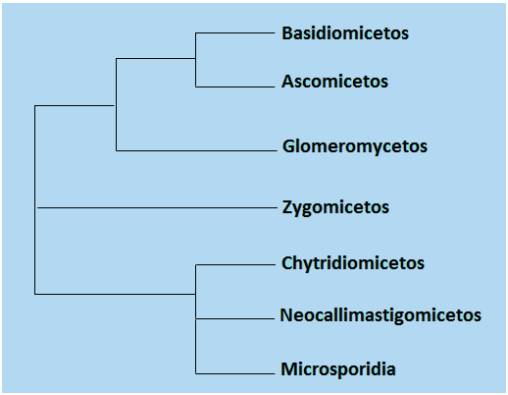
- Hongos macroscópicos o setas.
- Mohos u hongos filamentosos.
- Levaduras

Los hongos pueden presentar diferentes tipos de esporas:

- **Esporas sexuales:** los hongos producen esporas sexuales al unir dos gametos unicelulares distintos genéticamente para producir una célula diploide. Cuando inician el proceso de germinación dan origen a nuevas hifas y micelios. En este caso se pueden mencionar zigosporas, ascosporas y basidiosporas.
- **Esporas asexuales**: se producen mediante división mitótica y diferenciación de hifas especializadas que se extienden sobre la colonia. Dentro de este grupo se encuentran las esporangiosporas y las conidias (fialosporas, blastoconidias, artrosporas y clamidiosporas).

A partir de alineamientos entre secuencias genéticas que codifican para las subunidades 18S, 5.8S, y 28S del ribosoma eucariota; ha sido posible delimitar los siguientes siete filos de hongos: Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Zygomycota, Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia **(Figura 8.1)** (Rodríguez et al., 2016; Watkinson et al., 2016).

Figura 8.1. *Árbol filogenético que muestra la diversidad y las relaciones dentro del reino fungi a partir de métodos de secuenciamiento molecular***.**



Fuente: Adaptado de Watkinson et al. (2016, p. 9).

- **Basidiomicetos**

Los basidiomicetos incluyen setas, hongos gelatinosos, levaduras, y mohos (Watkinson et al., 2016). Estos grupos tienen papeles importantes a nivel ecológico, algunos son simbióticos, otros saprófitos, otros parásitos y también, están aquellos que forman asociaciones micorrizicas. Por otra parte, pueden causar enfermedades en animales e incluso en humanos; un ejemplo de ello es *Cryptococcus neoformans*, el cual tiende a generar cuadros clínicos en pacientes inmunosuprimidos, afectando así, tejidos nerviosos y respiratorios.

Dentro de los basidiomicetos se encuentran especies que pueden ser venenosas, medicinales o comestibles, lo que ha hecho que su producción industrial sea un renglón importante de la economía (Royse et al., 2017). Estos organismos pueden funcionar como biocontroladores de fitopatógenos virales, bacterianos y hasta helmínticos (Sivanandhan et al., 2017).

Algunas de las especies y géneros más comunes son: *Trametes versicolor, Schizophyllum commune, Coprinellus disseminatus, Pleurotus, Auricularia, Molybdites, Mycena, Macrolepiota, Oudemansiella y Geastrum,* entre otros.

- **Ascomicetos**

Presenta la mayor diversidad, compuesto por setas, hongos unicelulares como las levaduras y mohos. Se pueden reproducir sexualmente mediante ascosporas o asexualmente por la formación de conidioesporas (Gmoser et al., 2017).

Algunos de los géneros más representativos dentro de este filo están:

Penicillium: este género está presente en el ambiente, colonizando diferentes sustratos, desde frutas en descomposición hasta pintura en ambientes húmedos. En el medio de cultivo la morfología de las colonias puede ser plana, filamentosa, algodonosa y en algunos casos presentar gotas de exudado. De manera general presentan hifas hialinas septadas, conidióforos con ramas secundarias que se llaman métulas; estas últimas tienen paredes lisas y portan de 3 a 6 fiálides; de estas surgen largas cadenas de esporas o conidios en forma de pincel.

Algunas de las especies más comunes pertenecientes a este género son: *Penicillium chrysogenum; P. citrinum y P. notatum,* entre otros.

Aspergillus: habitan como saprófitos en el suelo y vegetales, alimentos enlatados, entre

otros. En el medio de cultivo las colonias presentan un crecimiento rápido y tienden a llenar todo el recipiente, la coloración varía ampliamente desde verde grisácea hasta negras o amarillas, con una textura granulosa o polvorienta. Microscópicamente presentan un micelio septado, hialino, con ramificaciones. Los conidios son pequeños, ovalados o redondeados y se disponen en una sola serie.

Algunas de las especies más comunes dentro de este género son: *Aspergillus fumigatus; A. niger; A. flavus* y *A. oryzae,* entre otros.

Neurospora: es un moho que comúnmente crece en el pan; el ciclo asexual involucra conidios multinucleados y microconidos uninucleados. En los heterotalos de las especies de Neurospora se encuentran las ascas y ascogonios, donde sus esporas (ascosporas) presentan pliegues característicos para el género. Respecto a la morfología de las colonias se pueden presentar dos casos, en el primero pueden observarse abundantes hifas aéreas en la periferia y poco crecimiento al centro, el segundo tipo de crecimiento tiene un patrón opuesto al anterior, su coloración tiende a ser amarillo-naranja. A nivel microscópico presenta hifas que se acercan bastante entre sí, estas presentan septos. *Neurospora crassa* es una de las especies más comunes.

Fusarium: este grupo es muy diverso y de amplia distribución global, la mayoría son oportunistas, saprófitos de restos vegetales y fitopatógenos; en el medio de cultivo las colonias se caracterizan por un micelio algodonoso de coloración blanco, amarillo o rosado al principio que con la presencia de las estructuras reproductivas se torna color ocre. Microscópicamente se caracterizan por presentar clamidiosporas ovaladas o en forma de globo, intercaladas o terminales con paredes lisas a corrugadas dispuestas en cadenas o racimos. Los macroconidos de los Fusarium representan una fuente de propagación importante, después de mucho tiempo después pueden germinar e infectar las raíces de las plantas. *Fusarium oxysporum* es una de las especies más comunes.

Trichoderma: son hongos que han sido muy utilizados en la agricultura, como controladores biológicos, gracias a que sus exoenzimas actúan como biopesticidas, generalmente están presentes en el suelo y en materia en descomposición. En el medio de cultivo las colonias presentan un crecimiento que cubre todo el recipiente, su textura es algodonosa de color blanco al principio, posteriormente se torna de color verde azulado. Un carácter importante es que algunas especies tornan de color amarillo-marrón, la parte inferior de los medios de cultivo. Presentan conidióforos con ramas laterales pareadas donde se pueden observar estructuras como fiálides, conidias con forma globosa u ovoidal. A nivel agrícola, *Trichoderma harzianum* es comúnmente utilizado para controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos presentes en cultivos de hortalizas y frutas.

Glomeromicetos

Según algunos autores, 90% de todas las plantas forman asociaciones micorrizicas, los más extendidos son los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) producidas por cerca de 200 especies dentro del filo Glomeromycota (Dalpé et al., 2016). Los géneros más abundantes incluyen *Glomus, Acaulospora* y *Gigaspora*.

La transferencia de nutrientes entre el hongo y la planta huésped ocurre a través de estructuras microscópicas e intrincadamente ramificadas llamadas arbúsculos, que se desarrollan dentro de las células de las raíces vivas. La simbiosis micorrízica es obligatoria para los hongos, por lo tanto, no pueden cultivarse aislados de sus huéspedes, las características celulares que ayudan a identificar estos hongos incluyen el desarrollo de hifas no septadas y esporas grandes (de hasta 800 µm de diámetro). Las esporas se forman individualmente o en grupos, en algunas especies, los grupos de esporas están rodeados por una corteza de hifas que forman un cuerpo frutal llamado esporocarpio; cada espora contiene cientos o miles de núcleos. La reproducción sexual no ocurre dentro de estos hongos, pero dentro de las esporas individuales coexisten poblaciones mixtas de núcleos genéticamente distintos (Dalpé et al., 2016).

Zigomicetos

Producen hifas septadas o cenocíticas, pueden formar zigosporas sexuales o esporangióforos sésiles asexuales. Existe una amplia diversidad en ambientes edáficos y boscosos. Morfológicamente se caracterizan por presentar hifas cenocíticas hialinas, algunas especies presentan rizoides y esporangios con múltiples esporas (esporangiosporas). Para la reproducción asexual también desarrollan esporas vegetativas dentro de las hifas. Las esporas sexuales (zigosporas) resultan de la unión de gametangios opuestos y morfológicamente similares que surgen de un solo micelio en las especies homotálicas o de micelios diferentes, pero sexualmente compatibles en las especies heterotálicas (Rakhimova et al., 2019).

Dentro de los géneros más representativos de este filo están:

Mucor: se encuentran dentro del orden de los Mucorales, es el grupo más grande de hongos formadores de zigosporas, comúnmente son utilizados en estudios genéticos, patogénicos y en la producción de alimentos fermentados. En el medio de cultivo se puede resaltar que las cepas de Mucor crecen, por lo regular, a temperatura por debajo de los 37 °C, las colonias tienden a cubrir totalmente el medio, al principio son blancas y se tornan grises o amarillas con la aparición de los esporangios ramificados que contienen las esporas asexuales; presentan hifas cenocíticas, hialinas y anchas con septos poco frecuentes. La presencia de rizoides es un carácter determinante en los mucorales (Morin et al., 2017).

Rhizopus: es un género que alberga hongos saprofíticos que generalmente están presentes en el suelo, heces de animales y vegetación en descomposición. Son relevantes en la agricultura y en la salud pública, porque pueden actuar como patógenos, por otra parte, sus enzimas son utilizadas en la industria para la fermentación de alimentos. Las colonias llegan a cubrir todo el medio de cultivo, su coloración es blanca y posteriormente gris oscura, con el desarrollo de las estructuras reproductivas presentan textura algodonosa y seca. Se caracterizan por tener un micelio macrosifonado, hialino y sin septos en las primeras generaciones, luego aparecen los septos y delimitan las estructuras reproductivas. Los esporangióforos son largos y no se ramifican como en el caso de Mucor, estos culminan en esporangios de gran tamaño. Otra característica diferencial, es que las hifas tienen forma de raíz y son llamadas rizoides (Gryganskyi et al., 2018).

Quitridiomicetos

Son hongos zoospóricos aeróbicos, saprófitos y patógenos en hábitats de agua dulce, salobre y marinos; también son abundantes en el suelo. La gama de huéspedes del grupo incluye otros hongos, algas, plantas y anfibios. Las especies patógenas incluyen *Synchytrium endobioticum*, que causa verrugas en las papas, y *Batrachochytrium dendrobatidis*, que causa la quitridiomicosis de anfibios. Produce zoosporas uniflageladas. No forman colonias de hifas ramificadas como los hongos no flagelados, sino que producen talos (Davis et al., 2016); estos están anclados a materiales sólidos por rizoides finamente ramificados. Los talos de algunas especies parásitas se desarrollan dentro de las células de sus hospedadores, otras en la superficie del hospedador, y múltiples talos de quitridios con la morfología más compleja pueden conectarse en cadenas, mediante un sistema de rizoides para parecerse a las colonias de hongos no flagelados (Watkinson et al., 2016).

Neocallimastigomicetos

Las 20 especies de este filo son hongos anaeróbicos que crecen en el tracto digestivo de algunos herbívoros, son fibrolíticos y carecen de mitocondrias. Estos hongos producen zoosporas uniflageladas, pero en algunas especies también se describen esporas multiflageladas (Watkinson et al., 2016).

Microsporidia

Las especies descritas parasitan animales, en particular insectos, crustáceos y peces, y algunas causan infecciones oportunistas en los seres humanos. Los microsporidios son parásitos obligados que crecen y se reproducen solo dentro de las células huésped; carecen de mitocondrias funcionales, por lo que sus necesidades energéticas están ligadas a los huéspedes (Han y Weiss, 2018).

Las clasificaciones más actualizadas son una versión integral de los métodos tradicionales y los modernos donde se tienen en cuenta las formas de reproducción sexuada o asexuada, morfología y los diferentes análisis con biología molecular, este último aspecto ha puesto en entredicho la permanencia de algunas especies dentro de los grupos tradicionales. En la **Tabla 8.2** se presenta una clasificación de los siete grupos de hongos, teniendo en cuenta características como hábitos de crecimiento, tipos de hifas y de esporas, entre otras.

Tabla 8.2. *Características microscópicas, macroscópicas y especies comunes de los siete filos de hongos.*

Características	Grupo						
	Zigomicetos	**Ascomicetos**	**Basidiomicetos**	**Glomeromicetos**	**Quitridiomicetos**	**Microsporidia**	**Neocallimastigogomicetos**
Micelio	No septado	Septado	Septado	No septado	Producen talos multinucleados	No producen micelio	No producen micelio
Esporas asexuales	Contenidas en esporangios; esporangióforos (sésiles)	Formadas en la punta del conidióforo; conidia (sésil)	Igual que en ascomicetos	Individuales o agrupadas, a veces rodeadas por un esporocarpo	Zoosporas haploides liberadas por los talos	Presentan zooesporas sencillas o agrupadas en esporoblastos.	Zoosporas uni o multiflageladas
Esporas sexuales	Zigosporas (motiles), en especies terrestres; ooesporas, en especies acuáticas	Ascoesporas, contenidos en un saco llamado asca.	Basidioesporas, ubicadas en la superficie exterior de células en forma de masa llamadas basidioma	No presentan reproducción sexual; las esporas individuales contienen núcleos mixtos diferenciados genéticamente.	La reproducción sexual se puede dar por fusión de las zooesporas para producir esporangios y mediante meiosis producen esporas recombinantes	No presentan reproducción sexual, mediante técnicas moleculares se sabe que existe recombinación.	Reproducción sexual por fusión de esporas flageladas para producir esporangios, seguidamente por meiosis producen esporas recombinadas.
Especies comunes	*Mucor indicus* *Mucor hiemalis Rhizopus microsporus* *Rh. rhizopodiformis*	*Aspergillus flavus* *Aspergillus fumigatus* *Fusarium cerealis* *Penicillium chrysogenum*	*Agaricus bisporus* *Lentinula edodes* *Psilocybe emilanceata* *Psilocibe cubensis*	*Glomus aggregatum* *G. Brazilianum* *G. microcarpus*	*Batrachochytrium dendrobatidis* *B. salamandrivorans*	*Enterocytozoon bieneusi* *Septata intestinalis*	*Anaeromyces spp. Neocallimastix spp.* *Orpinomyces spp. Piromyces spp.*

Fuente: Adaptado de Cappuccino y Welsh, (2019, p. 240).

8.3.1. Los hongos: su relevancia médica y económica

La mayoría de las personas presentan una buena resistencia frente a las infecciones fúngicas, siendo susceptibles solo a un grupo relativamente pequeño de 300 especies de hongos con potencial patogénico. Los centros de control y prevención de enfermedades clasifican las micosis en tres grupos:

- Infecciones comunitarias, asociadas a ambientes no hospitalarios y provocadas por patógenos ambientales que afectan a una población en general.
- Infecciones fúngicas nosocomiales ocasionadas por hongos presentes en las instalaciones de los hospitales.
- Infecciones oportunistas, que afecta a pacientes inmunosuprimidos.

La relevancia de las infecciones provocadas por estos organismos varía según la vía de acceso al cuerpo y la cantidad de tejido comprometido **(Tabla 8.3)**, esto hace que un porcentaje importante de la población que presenta reducción en su respuesta inmune, como por ejemplo personas con diabetes, cáncer o SIDA puedan presentar casos de micosis de especial cuidado. Los hongos también pueden provocar casos de alergias, originados como reacción frente a las sustancias presentes en sus paredes celulares; algunas especies como *Aspergillus flavus* tienen la capacidad de sintetizar aflatoxina, sustancia que puede inducir cáncer de hígado.

Tabla 8.3. *Infecciones fúngicas de mayor relevancia para los humanos.*

Categoría	Micosis	Agentes etiológicos
Superficiales	Pitiriasis versicolor	Especies de *Malassezia*
	Tiña negra	*Hortaea werneckii*
	Piedra blanca	Especies de *Trichosporon*
	Piedra negra	*Piedraia hortae*
Cutáneas	Dermatofitosis	Especies de *Microsporum, Trichophyton* y *Epidermophyton floccosum*
	Candidosis de piel, mucosa o uñas	*Candida albicans* y otras especies de *Candida*
Subcutáneas	Esporotricosis	*Sporothrix schenckii*
	Cromoblastomicosis	*Phialophora verrucosa, Fonsecaea pedrosoi,* y otras
	Micetoma	*Pseudollesceria boydii, Madurella mycetomatis,* y otras
	Feohifomicosis	*Exophiala, Bipolaris, Exserohilum* y otros mohos dematiáceos
Endémicas (primarias, sistémicas)	Coccidioidomicosis	*Coccidioides posadasii* y *Coccidioides immitis*
	Histoplasmosis	*Histoplasma capsulatum*
	Blastomicosis	*Blastomyces dermatitidis*
	Paracoccidioidomicosis	*Paracoccidioides brasilensis*
Oportunistas	Candidosis sistemica	*Candida albicans* y otras especies de *Candida*
	Criptococosis	*Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*
	Aspergilosis	*Aspergillus fumigatus* y otras especies de *Aspergillus*
	Hialohifomicosis	Especies de *Fusarium, Paecilomyces, Trichosporon* y otros mohos hialinos
	Faehifomicosis	*Cladophialophora bantiana;* especies de *Alternaria, Cladosporium, Bipolaris,* *Exserohilum* y otros mohos dematiáceos
	Mucormicosis (cigomicosis)	Especies de *Rhizopus, Lichtheimia, Cunninghamella,* y otros cigomicetos
	Pneumocystis pneumonia	*Pneumocystis jiroveci*
	Penicilliosis	*Penicillium marneffei*

Fuente: Adaptado de Tortora et al. (2019.p, 340).

De manera general, la micosis empieza cuando las células de los hongos penetran superficies corporales, donde son rechazadas por el sistema inmune, los hongos más propensos a generar enfermedades son aquellos que crecen a 37°C y logran sobrepasar las barreras inmunitarias. La tendencia general es que estas afecciones se originan por hongos que habitan en el pelo, piel y uñas o que hacen parte del microbioma humano. Usualmente, los métodos confirmatorios para los casos de infección por hongos son el cultivo del microorganismo, el examen microscópico, la detección de ADN y serología.

8.4. Equipos

Estereoscopio, microscopio, cámara fotográfica, lupa.

8.5. Insumos y materiales

Vinipel, pinzas, porta y cubreobjetos, asas micológicas, mechero, marcador permanente, cinta adhesiva transparente, bisturí estéril, azul de metileno (tinción de levaduras), azul de lactofenol (tinción de mohos), palillos estériles de madera, papel absorbente, glicerol al 10%, cajas con medio de cultivo (OGY, PDA), tijeras, frasco lavador, jeringa para sacarosa.

8.5.1. Medios y organismos

Material biológico solicitado por el docente.

8.6. Estudio de mohos

Es importante disponer con antelación del material biológico necesario; para esto, cada grupo de estudiantes debe traer elementos que presenten un moho notorio. Alimentos sin refrigeración como el pan, o frutas como las naranjas tienden a ser colonizados rápidamente por diferentes tipos de mohos.

8.6.1. Montaje directo para mohos y levaduras

En este ejercicio se realiza el aislamiento de las estructuras reproductivas de los mohos usando preferiblemente una lupa o el estereoscopio.

1. Colocar una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos.
2. Con el extremo de un palillo de madera estéril y procurando no dañar las estructuras del hongo, tomar una parte. Es importante que una vez se haya hecho la primera extracción, el palillo no toque ninguna otra superficie.
3. Colocar la muestra sobre la gota y, posteriormente, un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.
4. Observar con el microscopio a un aumento de 4x.
5. Identificar las estructuras tanto hifas como esporas.

8.6.2. Impronta

Este montaje permite observar de manera más clara las estructuras reproductivas de los mohos, en la cinta adhesiva las estructuras se adhieren fácilmente haciendo más rápida la observación **(Figura 8.4)**.

1. Utilizando un extremo de la cinta transparente, y haciendo uso del estereoscopio, rozar suavemente la parte adhesiva de la cinta con la superficie del hongo.
2. En un portaobjetos agregar una gota de azul de lactofenol, luego ubicar la parte de la cinta

expuesta al hongo sobre el colorante, presionar suavemente, si se desea se puede cubrir con un cubreobjetos y eliminar el exceso de colorante con papel absorbente.

3. Al igual que en el ejercicio anterior, observar y registrar las características de las hifas reproductivas y vegetativas o esporas observadas.

8.6.3. Aislamiento por punción inversa

El propósito de este ejercicio es el moho en medios de cultivo para observar posteriormente las características de la colonia como lo son: el color, textura y tamaño **(Figuras 8.2 y 8.4)**.

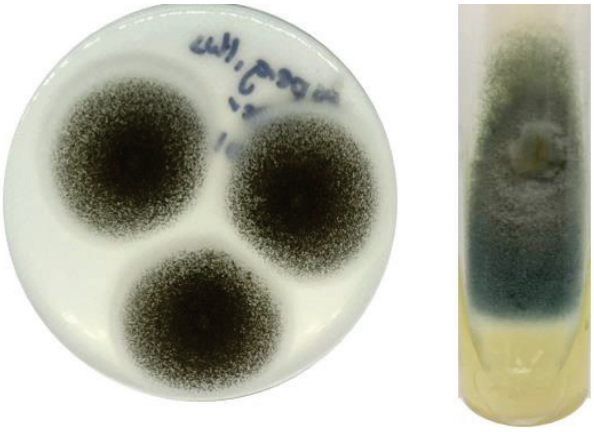
- **Primera parte**

1. Con un palillo de madera estéril de madera tomar la muestra del hongo, y en la caja de Petri abierta y posición boca abajo sembrar por punción en tres puntos equidistante, cerrar la caja, siempre teniendo cuidado de mantener la misma posición invertida para evitar que las esporas se diseminen, incinerar el extremo del palillo de madera.
2. Incubar entre 25 a 28°C.

- **Segunda parte**

1. A los ochos días, observar tanto el anverso como por el reverso, y describir las características del micelio como color, textura, crecimiento y pureza de la colonia.
2. Realizar la medición de las colonias en cada uno de los medios y registrar los resultados en las tablas de reporte del laboratorio **(Tabla 8.4.)**.

Figura 8.2. *Desarrollo de mohos cultivados por punción inversa.*



Fuente: Autores (2023).

8.6.4. Microcultivo

Con este método se espera tener una mejor observación de las estructuras miceliales, ya que el moho al crecer queda adherido al portaobjetos y al cubreobjetos **(Figura 8.3)**.

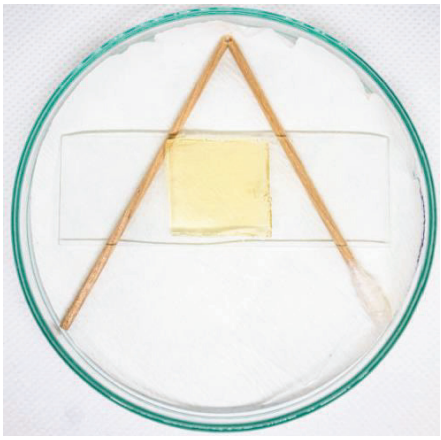
Primera parte

1. Con un bisturí estéril, cortar cuadros de 1 cm de PDA, luego colocarlos sobre el portaobjetos que está en la caja de Petri.
2. Con el extremo de un palillo estéril tomar el inóculo del hongo seleccionado y realizar la siembra en la parte media de cada uno de los lados del cuadro de PDA y colocar encima de él.
3. Después de sembrar, humedecer el papel filtro con agua con glicerol al 10% previamente esterilizada.
4. Incubar entre 25 y 28°C de 5 a 8 días.

Segunda parte

1. Transcurrido el periodo de incubación, tomar con unas pizas estériles el cubreobjetos y ubicarlo sobre un portaobjetos nuevo, que contenga una gota de azul de lactofenol.
2. Observar las características estructurales.

Figura 8.3. *Montaje de los elementos utilizados para el microcultivo de mohos.*



Fuente: Autores (2023).

8.7 Procedimiento

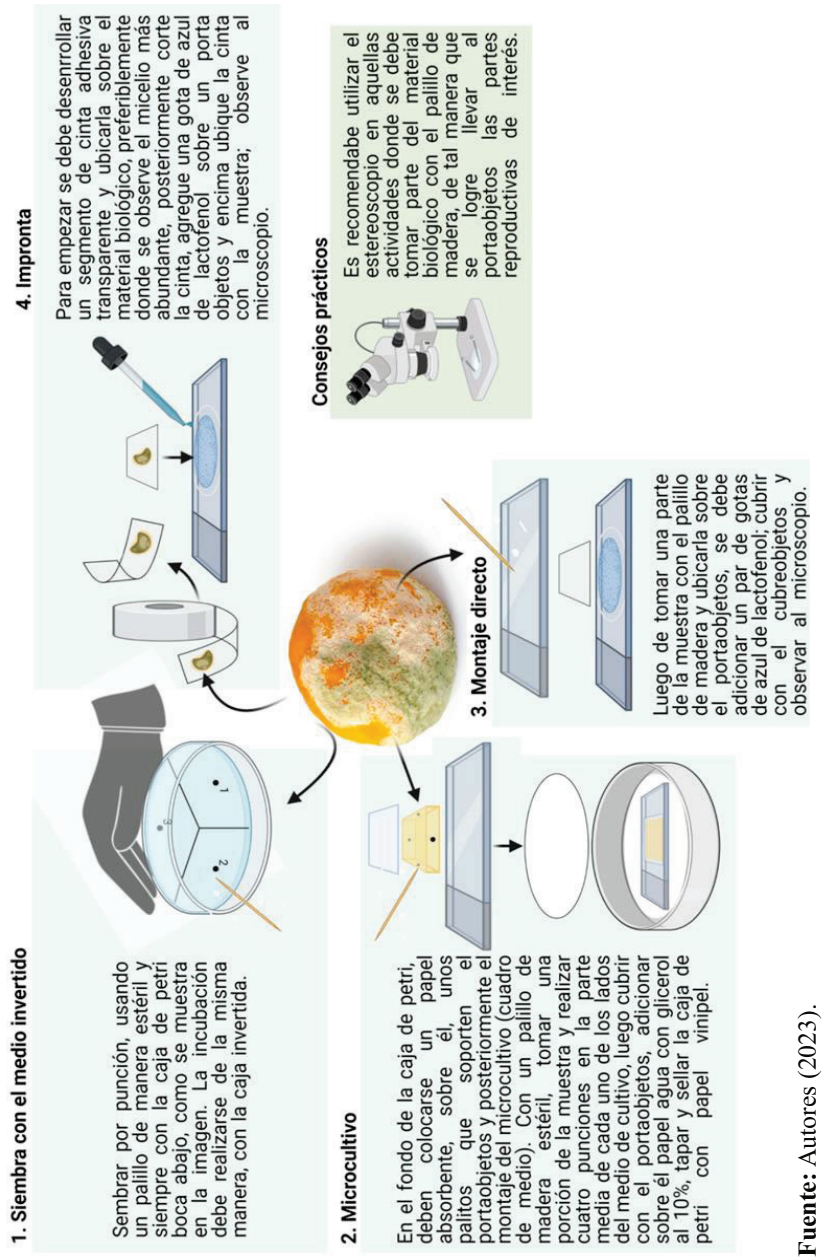


Figura 8.4. *Metodología a seguir para el montaje, tinción, observación e identificación de mohos.* ***1.*** *Siembra con el medio invertido.* ***2.*** *Microcultivo.* ***3.*** *Montaje directo.* ***4.*** *Impronta.*

Fuente: Autores (2023).

Para ampliar esta información coloque su celular en modo foto frente al código QR, y lo llevará directamente a un video explicativo sobre hongos. https://youtu.be/QC3fZQV66hM

8.8. Resultados

8.8.1. Montaje directo, impronta y siembra invertida

Describir de manera concisa las características correspondientes a su muestra.

Tabla 8.4. *Reporte de resultados obtenidos en las pruebas de hongos de montaje directo, impronta y siembra invertida.*

Sustrato	**Características**			
	Colonias anverso y reverso forma, color y textura	Hifas (graficar)	Esporas (graficar)	Diámetro de las colonias (cm)
				PDA **OGY**
				1. **1.**
				2. **2.**
				3. **3.**
Posible especie o género:				

Sustrato	**Características**			
	Colonias anverso y reverso forma, color y textura	Hifas (graficar)	Esporas (graficar)	Diámetro de las colonias (cm)
				PDA **OGY**
				1. **1.**
				2. **2.**
				3. **3.**
Posible especie o género:				

Fuente: Autores (2023).

8.9. Cuestionario

1. Mencione algunos aspectos positivos y negativos de los mohos.
2. ¿Por qué se utilizan los medio PDA y OGY para el cultivo de mohos? Mencione otro medio usado para el cultivo de mohos y levaduras.
3. ¿Cuál es la ventaja del microcultivo en comparación con las metodologías de siembra directa o la impronta?
4. ¿Por qué se clasifican las levaduras como hongos y en qué se diferencian de los mohos y las setas?
5. ¿Cuál es la importancia industrial y sanitaria de las levaduras, lo mohos y las setas?
6. ¿Por qué los hongos son clasificados como eucariotas?

Referencias bibliográficas

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Cheek, M., Nic, L. E., Kirk, P., Lindon, H., Carretero, J., Looney, B. y Niskanen, T. (2020). New scientific discoveries: Plants and fungi. *Plants, People, Planet*, *2*(5), 371–388. https://doi.org/10.1002/ppp3.10148

Dalpé, Y., Seguín, S. y Chagnon, P. L. (2016). Glomeromycetes from the Magdalen Islands archipelago: analyzing diversity and meta- community structure in a sand dune ecosystem. *Canadian Science Publishing*, *21*(1), 75–87. https://doi.org/https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0110

Davis, W. J., Antonetti, J., Letcher, P. M. y Martha, J. (2016). Phylogenetic diversity of Chytridiomycetes in a temporary forest pond surveyed using culture-based methods. *Southeastern Naturalist*, *15*(3), 534–548. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1656/058.015.0319

Gmoser, R., Ferreira, J. A., Lennartsson, P. R. y Taherzadeh, M. J. (2017). Filamentous ascomycetes fungi as a source of natural pigments. *Fungal Biology and Biotechnology*, *4*(1), 1–25. https://doi.org/10.1186/s40694-017-0033-2

Gryganskyi, A. P., Golan, J., Dolatabadi, S., Mondo, S., Robb, S., Idnurm, A. y Stajich, J. E. (2018). Phylogenetic and phylogenomic definition of Rhizopus species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *8*(6), 2007–2018. https://doi.org/10.1534/g3.118.200235

Han, B. y Weiss, L. M. (2018). Microsporidia: obligate intracellular pathogens within the fungal kingdom. In *The fungal kingdom* (pp. 97–113). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016

Morin, S. S., Nodet, P., Coton, E. y Jany, J. L. (2017). Mucor: A Janus-faced fungal genus with human health impact and industrial applications. *Fungal Biology Reviews*, *31*(1), 12–32. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2016.11.002

Rakhimova, Y. V., Kyzmetova, L. A., Assylbek, A. M. y Yermekova, B. D. (2019). Diversity of Zygomycetes associated with the rhizosphere of woody plants from Ile-Alatau national park (Kazakhstan). *Current Research in Environmental and Applied Mycology*, *9*(1), 53–65. https://doi.org/10.5943/cream/9/1/6

Rodríguez, A., Xoconostle, B. y Valdés, M. (2016). Ecología molecular de los hongos ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana*, *27*(3), 267–278.

Royse, D. J., Baars, J. y Tan, Q. (2017). Current overview of mushroom production in the world. *Edible and Medicinal Mushrooms*, *2010*, 5–13. https://doi.org/10.1002/9781119149446.ch2

Sivanandhan, S., Khusro, A., Paulraj, M. G., Ignacimuthu, S. y Al-Dhabi, N. A. (2017). Biocontrol properties of basidiomycetes: An overview. *Journal of Fungi*, *3*(1). https://doi.org/10.3390/jof3010002

Species Fungorum. (2020). Retrieved December 16, 2020, from http://www.speciesfungorum.org/

Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2019). *Microbiology: an introduction* (Thirteenth; S. Beauparlant, Ed.). Boston, E.E.U.U.: Pearson.

Watkinson, S., Boddy, L. y Money, N. (2016). *The fungi* (Third edit). London, United Kingdom.

Práctica 9.

Bacteriófagos

9.1. Objetivo general

Conocer las características representativas de los virus, así como los métodos de aislamiento de los bacteriófagos.

9.2. Objetivos específicos

- Aislar bacteriófagos de distintas muestras ambientales.
- Aprender los fundamentos de los métodos de siembra y reconocimiento de bacteriófagos.

9.3. Introducción

Los virus son entidades intracelulares compuestas por un tipo de ácido nucleico, ya sea ARN o ADN, el cual está rodeado por una cubierta llamada cápside, carecen de las capacidades biosintéticas propias necesarias para la vida celular independiente; esta ausencia de maquinaria metabólica elemental hace que los virus sean definidos como parásitos, de tal manera que no pueden ser cultivados por fuera de un huésped vivo. La preferencia que tienen los virus al infectar determinados tipos de células, depende del potencial que estas presenten para suplir sus necesidades metabólicas (Darós, 2019).

La amplia distribución de los virus en la naturaleza ha permitido registrarlos en un gran número de huéspedes eucariotas y procariotas, observándose virus en arqueas, bacterias (bacteriófagos), vegetales y animales (Peretó, 2020). En raros casos se observa que crucen la barrera de las especies, cuando esto sucede se dice que "expanden su rango de huéspedes" (Cappuccino y Welsh, 2019).

Los virus se diferencian en viriones, viroides, provirus, seudovirus, priones y bacteriófagos. Un **virión** es una partícula viral completa con capacidad infectante. Los **viroides** son similares a los virus, están constituidos por ácidos nucleicos, generalmente son parásitos estrictos de plantas y su genoma no codifica proteínas, carecen de envoltura y cápside (Darós, 2019). Cuando el genoma de un virus se integra al de la célula huésped, se dice que constituye un genoma **proviral** (Myhre y Sifris, 2020). Los **pseudoviriones** contienen fragmentos de ADN de la célula huésped, sin contener ninguno de los componentes del ácido nucleico del virus infeccioso al que están relacionados, el material genético modificado de los pseudovirus evita que estas partículas produzcan proteínas de la superficie viral por sí mismas (Cuffari, 2020). Los **bacteriófagos** se caracterizan porque principalmente infectan bacterias, los más estudiados generalmente poseen simetría binaria con una cabeza icosaedrica que contiene el ADN; poseen fibras en el extremo de la cola y espículas, que usan para adherirse a la pared bacteriana de la célula que parasitarán (Shaffer, 2019). Los **priones**

son hebras de proteínas autorreplicantes, no forman cápside, generalmente causan infecciones lentas del sistema nervioso central en el hombre y en el ganado. Algunos son muy resistentes a la acción de agentes químicos y físicos (Robertson, 2018).

9.3.1. Estructura viral

La parte central del virus es el genoma, en términos generales el ARN es monocatenario, salvo en algunos grupos de reovirus que el ARN es de doble hebra, con excepción de algunos parvovirus. Como se mencionó anteriormente, el genoma se encuentra dentro de una cubierta proteica llamada cápside, que es el resultado de la acumulación de subunidades más pequeñas conocidas como capsómeros; estos últimos pueden ser esféricos o prismáticos, cualidades que son consideradas al momento de clasificar los virus (Dimmock et al., 2017).

Los virus envueltos presentan una capa adicional a la cápside que se llama envoltura; la cual es una bicapa lipoproteica derivada de la membrana nuclear o de la membrana citoplasmática de la célula parasitada por el virus, sus funciones consisten en la protección de la nucleocápside, la adherencia a los receptores celulares y la antigenicidad. Cuando no existe una membrana de envoltura se dice que los virus son desnudos (Johnson y Case, 2018).

La sensibilidad de los virus a los cambios ambientales depende directamente de las células que parasitan o en el caso de los virus que tienen envoltura, la resistencia está asociada a la capa que los recubre. Los agentes fisicoquímicos afectan más a los virus en comparación con las bacterias y los hongos (Johnson y Case, 2018).

9.3.2. Replicación vírica

Es el proceso en el cual el virus penetra una célula que pone su maquinaria enzimática a disposición de las necesidades víricas, las cuales están enfocadas en la producción de muchas copias de sí mismo.

Los bacteriófagos han sido usados como modelos en la virología, ya una gran parte de la información que se tiene sobre los mecanismos de infección y replicación viral en animales, se ha basado en la comprensión de las infecciones de las bacterias por parte de estos. Este grupo de virus se caracterizan porque principalmente infectan células bacterianas y su replicación puede provocar la muerte o lisis celular, en este caso se habla de un ciclo lítico y en el ciclo lisogénico se aumenta la virulencia de la célula huésped, pero no hay lisis celular. Los bacteriófagos se caracterizan por presentar una amplia variedad de tamaños, formas y estructuras complejas; un ejemplo de esta diversidad es el grupo de los virus pares T (T2, T4 y T6).

9.3.3. El ciclo lítico

La replicación de los fagos radica en su habilidad para infectar una célula hospedera apropiada, este proceso ocurre en los siguientes pasos:

1. A través de proteínas específicas el virus se une a receptores de la célula huésped. En esta etapa se pone en evidencia la preferencia de las partículas virales por ciertos tipos de células, este proceso selectivo se llama tropismo.
2. El virus pasa al interior de la célula mediante penetración directa (solo pasa el genoma), por endocitosis de los virus desnudos adheridos a la célula o por fusión cuando la envoltura viral se funde con la membrana citoplasmática.
3. Se transcribe el ARNm para la síntesis de las proteínas tempranas, que tienen como función detener el metabolismo celular y facilitar la multiplicación viral. Posteriormente, se producen las proteínas encargadas de la síntesis y el procesamiento del ácido nucleico, por último, las proteínas tardías que forman la estructura y se unen al genoma.

4. Se ensamblan las diferentes partes estructurales del virus, lo cual, según el tipo de virus pueden ocurrir en el núcleo o en el citoplasma.

5. La pared celular se lisa liberando las partículas de fagos, que ahora son capaces de infectar nuevas células susceptibles, reiniciando así el proceso (Johnson y Case, 2018).

9.3.4. Bacteriófagos Lambda (λ): ciclo lisogénico

Algunos virus no causan lisis celular ni la muerte de la célula huésped cuando se multiplican. Los fagos lisogénicos se originan de un ciclo lítico, pero tienen la capacidad de incorporar su ADN junto con el de su hospedador para iniciar un ciclo lisogénico donde permanecen latentes. Las etapas de este período son las siguientes:

1. El fago penetra en una célula bacteriana.

2. El ADN lineal del bacteriófago toma forma circular.

3. El circulo se puede recombinar y volverse parte del ADN circular de la bacteria (se da inicio al ciclo lisogénico). La mayoría de los genes de este último están represados por un par de proteínas producidas por él mismo, que se encargan de detener la expresión de todos los genes asociados al bacteriófago; de esta manera, la síntesis y liberación de nuevas partículas virales es interrumpida. Cada vez que la bacteria replica su ADN, también lo hace el material genético del fago.

4. El estado latente del bacteriófago permanece así hasta que algún evento externo provoca la escisión de los genomas e inicia el ciclo lítico, de lo contrario la célula huésped no muere.

Como es de suponerse, esta alteración del material genético tiene efectos secundarios sobre la célula que alberga el fago. El primero es que luego de la infección por una partícula viral específica, el hospedador no puede volver a ser infectado por otra similar. El segundo efecto de la lisogénia es que la célula receptora puede presentar nuevas características. Una tercera consecuencia es la posibilidad de que algunos genes bacterianos queden incluidos dentro de un fago que al cambiar de huésped puede integrar dicha porción del genoma en otra bacteria, este es el caso de algunos bacteriófagos λ que retienen en su genoma el gen *gal* de huéspedes galactosa positivos y los transfiere a receptores gal negativos que se convierten en portadores del gen.

9.4. Equipos

Incubadora, stomacher o agitación manual, centrífuga, bomba de vacío o jeringa.

9.5. Insumos y materiales

- Agua peptonada, filtros estériles para jeringa de 0.2 µm, recipientes estériles, cloruro de calcio $CaCl_2$ (10 mM), CHCl3 (Cloroformo), agar tripticasa soya (TSA), pipetas estériles.
- Cultivo bacteriano: *E. coli.*

9.6. Procedimiento

Para el aislamiento de fagos se utilizan muestras ambientales (ejemplo: materia fecal bovina, aguas residuales, cama de pollos, suelo, entre otros) de preferencia que sean obtenidas de zonas diferentes, registrando fecha y lugar de colecta de cada una. La abundancia de los fagos en ambientes naturales es reducida, por lo tanto, debe realizarse un enriquecimiento previo, el cual aumentará la cantidad de bacteriófagos *in situ,* al agregar cepas bacterianas. Para verificar la presencia y capacidad infectiva de los fagos se utiliza la técnica *spot test* o prueba puntual, en la cual se adiciona una cantidad específica de una solución enriquecida sobre un medio que previamente ha sido cultivado con una cepa bacteriana **(Figura 9.1)** (Darós, 2019).

Primera parte (enriquecimiento)

1. Tomar 10 g de una muestra ambiental, mezclar con 90 ml de agua peptonada y homogeneizar (manual o en stomacher™) durante 2 minutos.
2. Para eliminar el material particulado, centrifugar la mezcla a 8000 rpm durante 15 minutos.
3. Filtrar los sobrenadantes utilizando un filtro estéril de 0.45 µm (bomba de vacío o con filtro de jeringa).
4. Pasar los filtrados a frascos estériles y adicionar cloruro de calcio ($CaCl_2$ 10 mM), sulfato de magnesio MgSO4 y 0.3 mL de cultivo de *E. coli* (en BHI a 0.5 en escala McFarland o 15 h de crecimiento).
5. Incubar las muestras durante 16 horas a 37°C.
6. Agregar 4% (v/v) de cloroformo ($CHCl_3$), mezclar y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 8000 rpm durante 15 minutos y separar la fase acuosa que es el material donde están los fagos.

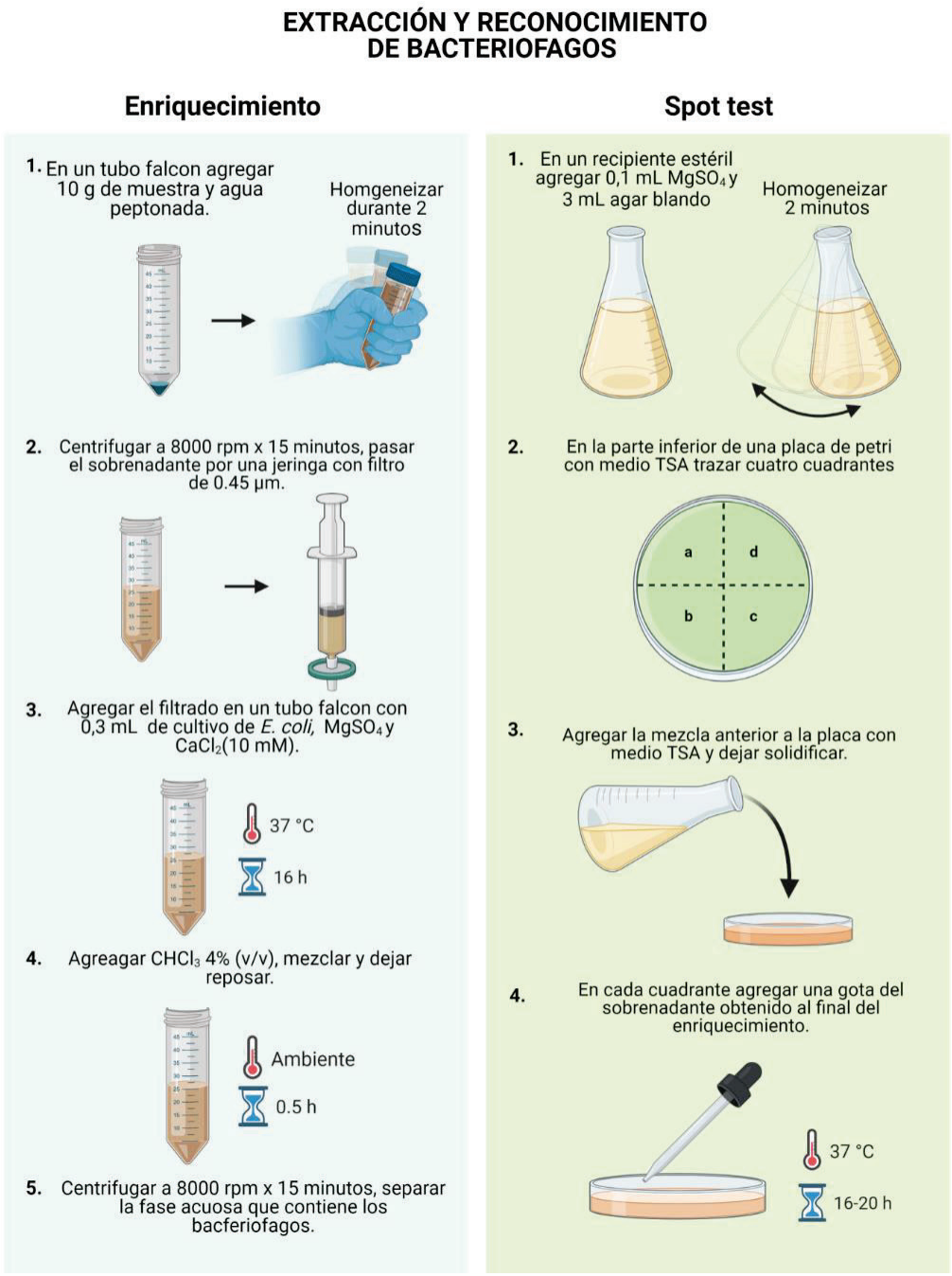
Segunda parte (prueba de capacidad infectiva *spot test* o prueba puntual)

1. Tomar una caja de Petri con medio TSA, marcarlo por la parte inferior de una placa de Petri, dibujar cuatro cuadrantes y marcarlos así: a, b, c y d.
2. Tomar 0,1 mL de cultivo de *E. coli* (crecido en BHI durante 15 h a 0,5 escala de McFarland).
3. Mezclar con 3 mL de agar blando (triptona 10g, cloruro de sodio 2.5 g, agar bacteriológico 6g, agua destilada 1000 mL) y homogeneizar.
4. Agregar la mezcla anterior a la caja de Petri previamente marcada del punto 1 con medio TSA y dejar solidificar.
5. En cada cuadrante agregar una gota de la solución acuosa obtenida en el enriquecimiento.
6. Incubar durante 16-20 horas a 37°C.

Tercera parte

1. Observar los resultados obtenidos y anotar en las tablas de registro.

Figura 9.1 *Metodología para el aislamiento y reconocimiento de fagos.*

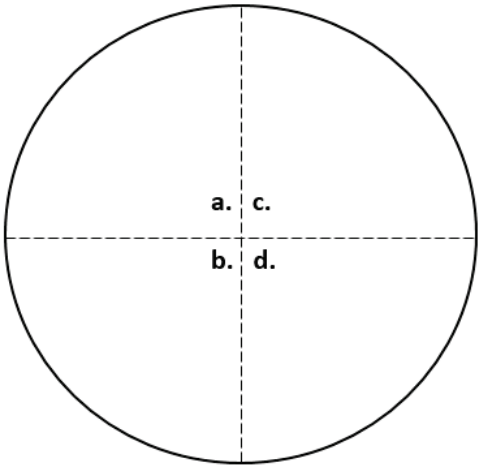


Fuente: Autores (2023).

9.7. Resultados

1. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, luego de la incubación en el punto cuatro,

grafique en cada uno de los cuadrantes sus observaciones; recordando que un resultado positivo para la presencia de fagos es la aparición de un halo con coloración diferente en el sitio donde se agrega la gota de sobrenadante.



2. Realice una descripción detallada de los resultados observados en cada uno de los cuadrantes, teniendo en cuenta características como el tamaño, color, forma y la relación con factores que, desde su compresión del experimento, pudieron reflejar el resultado final.

a.	c.
b.	d.

9.8. Cuestionario

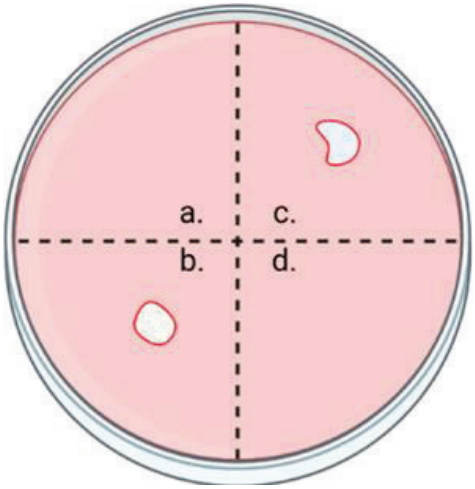
1. ¿Cuáles son las evidencias que indican si el aislamiento de fago fue exitoso? Mencione una opción que permita aumentar la cantidad de bacteriófagos en sus muestras, y confirmar la presencia o ausencia.

2. ¿Por qué es necesario realizar enriquecimientos a las muestras ambientales?

3. Mencione cuatro entornos de los cuales se podrían aislar bacteriófagos de *E. coli*, ¿por qué cree que se encuentran en esos entornos?
4. Explique ¿por qué se pueden retener fagos en los filtros utilizados para separar fragmentos de células bacterianas, si su tamaño es menor que el diámetro de los poros?
5. Teniendo en cuenta la capacidad infectiva de los bacteriófagos, ¿es posible usarlos como controladores de bacterias patógenas? Si es posible, mencione al menos dos casos donde usen este método.
6. Describa el procedimiento para aislar fagos presentes en especies de *Bacillus*

La **Figura 9.2.** muestra un experimento donde se utilizaron soluciones con fagos extraídos de heces bovinas de tres potreros diferentes, cuadrantes a, b y c. ¿Qué puede concluir de los resultados obtenidos? En el cuadrante "d" se utilizó una solución de control sin presencia de fagos.

Figura 9.2. *Experimento donde se utilizaron soluciones con fagos***.**



Fuente: Autores (2023).

Tabla 9.1. *Reporte de resultados del experimento con fagos.*

Potrero a.
Potrero b.
Potrero c.

Fuente: Autores (2023).

Referencias bibliográficas

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

Cuffari, B. (2020). *What is a pseudovirus?* Retrieved February 14, 2021, from News-Medical website: https://www.news-medical.net/health/What-is-a-Pseudovirus.aspx

Darós, J. (2019). *Special Issue "Viroid-2018: International Conference on Viroids and Viroid-Like RNAs."* Retrieved from https://www.mdpi.com/journal/viruses/special_issues/Viroid_2018

Dimmock, N. J., Easton, A. J. y Leppard, K. N. (2017). *Modern virology* (Seventh ed). West Susex, UK: Wiley Blackwell.

Johnson, T. y Case, C. (2018). *Laboratory experiments in microbiology* (Tenth edit). Edinburgh: Pearson.

Myhre, J. y Sifris, D. (2020). *Understanding HIV as a Provirus.* Retrieved February 14, 2021, from Verywell Health website: https://n9.cl/wejh2

Robertson, S. (2018). *What is a Prion?* Retrieved February 14, 2021, from News-Medical website: https://www.news-medical.net/health/What-is-a-Prion.aspx

Peretó, J. (2020). Métode. *La covid-19 y el lado oscuro de la promiscuidad de la vida*, 2. Retrieved from https://metode.es/revistas-metode/opinio-revistes/la-covid-19-y-el-lado-oscuro-de-la-promiscuidad-de-la-vida.html

Shaffer, C. (2019). *What are bacteriophages?* Retrieved February 14, 2021, from News-Medical website: https://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Bacteriophages.aspx

Práctica 10.

Análisis microbiológico de muestras clínicas hemocultivo, urocultivo y coprocultivo

10.1. Objetivo general

Conocer la interpretación de los resultados del procesamiento de muestras clínicas como orina, materia fecal y sangre.

10.2. Objetivo específico

- Aprender el procedimiento realizado para un hemocultivo, urocultivo y coprocultivo.

10.3. Introducción

El diagnóstico de ciertas enfermedades se basa en el estudio de los síntomas y signos clínicos del paciente, así como en la demostración de la presencia del agente infeccioso, de sus productos o de la marca que deje en el individuo. La confirmación del diagnóstico es gracias a las muestras clínicas realizadas luego de evaluar los datos contenidos en la historia clínica. Es importante resaltar que la información diagnóstica que se proporciona depende de la calidad de la muestra recibida, situaciones como una toma mal realizada, pobremente recogida o mal transportada puede determinar un posible fallo en la recuperación de los microorganismos que puede inducir a errores diagnósticos, e incluso a un tratamiento inadecuado del paciente (Cabezas et al., 2018). Algunas muestras utilizadas en clínica son sangre para realizar hemocultivo que permite identificar septicemias, urocultivo para infecciones urinarias y coprocultivo para diarreas y disenterías, y posteriormente la realización del antibiograma para el tratamiento.

10.3.1 Hemocultivo

La presencia de bacterias (bacteriemia), u hongos (fungemia) en la sangre es una grave complicación, por la elevada mortalidad que conlleva. Se estima que la mortalidad global es del 60% y la atribuible a la infección es del 26%. La entrada de los microorganismos al torrente sanguíneo puede ser por diversas vías y se ve favorecida cuando el paciente tiene comorbilidades o el sistema inmune está alterado. En pacientes ingresados a las UCI tienen mayor probabilidad de presentar septicemia por sus condiciones clínicas **(Figuras 10.1 y 10.4)** (Zaragoza et al., 2008).

10.3.2. Urocultivo

La Infección del Tracto Urinario (ITU) es la infección bacteriana más común en humanos, producida por un número limitado de bacterias conocidas como especies uropatógenas. Estas infecciones ocurren en cualquier persona, independiente de la edad o estado inmune, aunque es más frecuente en mujeres y personas inmunocomprometidas (Zaragoza et al., 2008).

La ITU indica la presencia de microorganismos en cualquier sitio normalmente estéril del tracto urinario, ocasionando usualmente una respuesta inflamatoria aguda y sintomática.

El urocultivo está indicado en los casos de infección del tracto urinario recurrente, falla en el tratamiento, infección del tracto urinario complicada, cistitis, pielonefritis o bacteriuria asintomática en embarazadas. En general, si las UFC/ml son menos de 10.000 bacterias por mililitro de orina indican flora normal, y si el número es mayor de 10.000 se sospecha infección **(Figura 10.2)** (Mendoza et al., 2014).

- **Recolección de la muestra**

La recolección adecuada de la muestra es un aspecto fundamental para obtener un resultado confiable. En este caso, se debe evitar la contaminación de la orina con la flora perineal, vaginal o uretral. Lo recomendado es obtener la muestra de la primera orina de la mañana, no incrementar la ingesta de líquidos para forzar la diuresis, ya que puede ocasionar dilución de la orina y disminuir el recuento de colonias, lo que da origen a resultados falsos negativos.

- **Tipos de recolección de la muestra de orina**

a) **Recolección por micción espontanea:** es el tipo de recolección utilizado con mayor frecuencia, no es un método invasivo y solo se requiere previo aseo genital por parte del paciente, evacuar la primera parte de la micción y luego si tomar la muestra en el frasco estéril.

b) **Bolsas recolectoras:** es común su uso en niños que aún no controlan esfínteres, se debe realizar previo aseo genital y adherir la bolsa a los genitales del menor.

c) **Recolección por punción suprapúbica**: método de recolección con menor probabilidad de contaminación, usada en niños que no controlan esfínteres, se realiza mediante punción en la zona de la sínfisis púbica.

Respecto a la recolección de la muestra, el volumen mínimo es de 10ml, si es por punción suprapúbica puede ser desde 5ml, para los demás pacientes sin impedimentos, la cantidad requerida son 50ml, se considera infección si hay más de 10.000 UFC/ml, excepto cuando es por punción suprapúbica, ya que solo con una colonia presente se considera que hay infección, debido a que la vejiga es estéril.

10.3.3. Coprocultivo

Las infecciones del tracto gastrointestinal se encuentran dentro de las enfermedades infecciosas más frecuentes después de las del tracto respiratorio. Los síntomas y signos destacados de una gastroenteritis son tales como fiebre, vómito, diarrea moderada a fuerte (Vila et al., 2009).

El coprocultivo es un examen de laboratorio usado para hallar microorganismos en la materia fecal que puedan causar enfermedad y/o síntomas gastrointestinales. La cantidad de muestra sugerida es una pequeña porción, aproximadamente 2 g **(Figura 10.3).**

La mayoría de las enteritis bacterianas son causadas por *Salmonella sp* y *Campylobacter sp*, por lo que deben emplearse medios de cultivo selectivos. Tales como agar EMB y el agar *Salmonella-Shigella* (Mendoza et al., 2014).

10.4. Insumos y materiales

Muestra clínica (orina, materia fecal, sangre), asa, mechero, jeringa.

- **Medios de cultivo**

a) **Hemocultivo:** Caldo BHI.

b) **Urocultivo**: agar EMB, paleta de recuento, agar sangre (utilizado en niños menores de

2 años, pacientes con compromiso inmune, ejemplo: VIH y mujeres con vida sexual activa con urocultivo previo negativo).

c) **Coprocultivo:** agar EMB, agar *Salmonella-Shigella*, agar sangre (utilizado en niños menores de 2 años, pacientes con compromiso inmune, ejemplo: VIH), y agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS) si se sospecha de *Vibrio.*

10.5. Procedimiento

Rotular todos los insumos con nombre, fecha, grupo.

Hemocultivo

Se considera la muestra o set de hemocultivo, la sangre obtenida por vía venosa, tomada de un sitio diferente al del catéter, esta muestra es inoculada en un tubo con BHI a intervalos de tiempo de 20 minutos por tres veces, se debe reportar la temperatura del paciente.

Asimismo, se debe tener en cuenta el volumen requerido dependiendo del paciente, sea neonato, lactante, niño o adulto. El volumen utilizado es según el inserto de casa comercial, generalmente se toman de 2 a 10 ml de la muestra por tubo con el medio de cultivo BHI, hay otros medios que son bifásicos como es el medio de Ruiz Castañeda

1. Tomar la muestra vía venosa, teniendo en cuenta todas medidas de asepsia.
2. Agregar la sangre a los frascos (3) de hemocultivo.
3. Incubar a 37°C y observar cada 24 horas hasta por 7 días.

Figura 10.1. *Pasos para el hemocultivo.*

1. Tomar la muestra vía venosa teniendo en cuenta todas medidas de asepsia.

2. Agregar la sangre a los frascos (3) de hemocultivo

3. Incubar a 37°C y observar cada 24 horas hasta por 7 días.

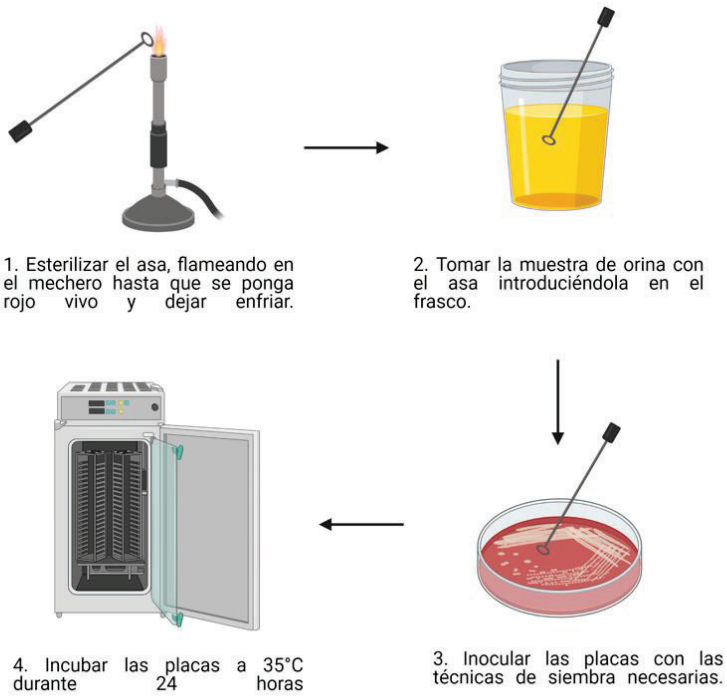
Fuente: Autores (2023).

Urocultivo

1. Tomar la muestra según corresponda para cada paciente.
2. Esterilizar el asa, flameando en el mechero hasta que se ponga rojo vivo y dejar enfriar el asa.
3. Tomar el frasco con la muestra de orina y homogenizar suavemente.
4. Tomar la muestra de orina con el asa introduciéndola en el frasco.
5. Inocular las placas con las técnicas de siembra necesarias.

6. Incubar las placas a 35°C durante 24 horas y empezar hacer las lecturas, para posterior identificación realizando las pruebas diferenciales y los medios selectivos.

Figura 10.2. *Paso a paso de la siembra de un urocultivo.*

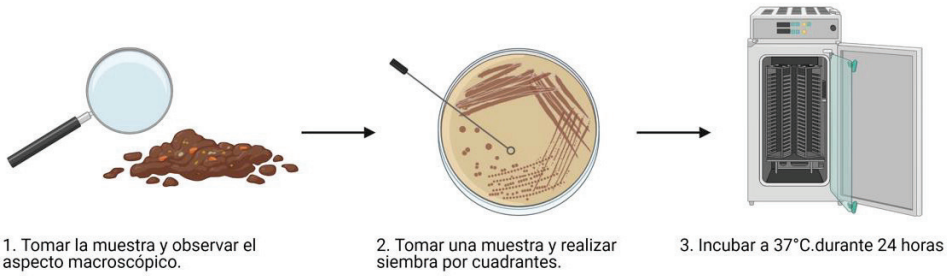


Fuente: Autores (2023).

Coprocultivo

1. Tomar la muestra y observar el aspecto microscópico.
2. Tomar con el asa una parte de la zona más representativa de la muestra (donde haya sangre, moco, pus).
3. Realizar siembra por agotamiento.
4. Incubar a 37°C durante 24 horas y empezar hacer las lecturas, para posterior identificación realizando las pruebas diferenciales y los medios selectivos.

Figura 10.3. *Paso a paso toma coprocultivo.*



Fuente: Autores (2023).

CONSEJOS PARA LA PRÁCTICA:

- Realizar la toma de muestras con técnicas de asepsia, se debe realizar un transporte adecuado de las muestras.
- Intentar realizar el hemocultivo, urocultivo y coprocultivo antes de empezar a suministrar tratamiento antimicrobiano.

10.6. Resultados

Hemocultivo

Figura 10.4. *Resultado hemocultivo.* ***A:*** *Negativo.* ***B:*** *Positivo.* ***C:*** *Control positivo para el caldo (BHI) y negativo para hemocultivo.*

Fuente: Autores (2023).

La sangre es un fluido estéril, por lo tanto, cualquier microorganismo que se encuentre indica que se está produciendo una patología. Los microorganismos que comúnmente se podrían encontrar son bacterias Gram positivas y Gram negativas, tales como *Streptococcus sp, Staphylococcus aureus, Salmonella, Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa,* entre otras.

En un resultado visual de los frascos se puede observar crecimiento microbiano con presencia de turbidez, cambio de coloración y puede presentar hemolisis y coágulos.

Urocultivo: la orina es un líquido estéril, se considera infección cuando se presentan más de 10.000 a 100.000 UFC por mililitro, si se presentan menos de 10.000 UFC se habla de contaminación o microbiota. Los microorganismos que generalmente se pueden encontrar en un urocultivo son: *Escherichia. coli, Klebsiella sp, Proteus sp, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis,* entre otros.

Si se observan tres o más morfologías coloniales significa que hubo contaminación, se debe repetir el examen siguiendo las recomendaciones de higiene.

Coprocultivo: algunos microrganismos que se pueden encontrar en el coprocultivo son: *Salmonella, Shigella, Campylobacter sp, Staphylococcus aureus, Vibrium sp, Escherichia coli,* etc.

10.7. Cuestionario

1. ¿Cuál es la diferencia entre bacteriemia y septicemia?
2. ¿Qué es piemia?
3. ¿Cuáles son los agentes causales más frecuentes de las infecciones urinarias?
4. ¿Cuáles serían las normas de prevención para evitar las infecciones urinarias?
5. Normas de prevención para evitar las gastroenteritis.

Referencias bibliográficas

Cabezas, L., Caiata, L., Gutiérrez, C. y Outeda, M. (2018). *Manual de recolección, procesamiento e interpretación de cultivos en muestras clínicas obtenidas para estudio bacteriológico*. Universidad de la República Montevideo, Uruguay.

Mendoza, V., Hernández, V. y López, F. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología*. Universidad Autónoma de México.

Vila, J., Buesa, J. y Castillo, J. (2009). *Diagnóstico microbiológico de las infecciones gastrointestinales.* NCBI.

Zaragoza, C., R., Gimeno, C. C., Pemán, J. y Salavert, L. M. (2008). *Microbiología aplicada al paciente crítico*. Editorial medica Panamericana.

Práctica 11.

Calidad de agua, aire y alimentos

11.1. Objetivo general

Aislar e identificar los microorganismos presentes en muestras de agua, alimentos y ambientes, con el fin de evaluar la carga microbiana en estos sustratos y su incidencia en la calidad sanitaria y seguridad alimentaria.

11.2. Objetivos específicos

- Adquirir destreza en el manejo de las técnicas para el aislamiento e identificación de los microorganismos indicadores de calidad microbiológica.
- Interpretar los resultados obtenidos de acuerdo con los estándares establecidos en la normatividad.

11.3. Introducción

11.3.1. Calidad de agua

La contaminación en las fuentes hídricas es un problema de salud pública que requiere el trabajo conjunto de las ciudades, municipios y comunidad científica, para asegurar que los patógenos que causan enfermedades como el cólera y la disentería, sean detectados y eliminados del agua potable. El agua de los ríos, lagos y arroyos puede contener una variedad de bacterias que provienen del ecosistema circundante, así como también parásitos causantes de infecciones como la helmintiasis y la amebiasis entre otras. En las ciudades, las aguas residuales se tratan y luego se descargan en los cuerpos de aguas, lo que es un problema importante, porque estos son una fuente de suministro para la potabilización (Brown y Smith, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 1,7 millones de muertes por año son el resultado del consumo de agua no potable, la mayoría de ellas son por enfermedades diarreicas, y el 90% de estas muertes son de niños que viven en países en desarrollo, donde las instalaciones sanitarias y el agua potable son deficientes (Cappuccino y Welsh, 2019), debido a esto, se deben implementar métodos para el tratamiento del agua.

Para monitorear la eficacia del tratamiento se realizan pruebas microbiológicas, con el fin de determinar si el agua es potable y segura para el consumo. Algunos patógenos como *Vibrio cholerae, Salmonella typhi y Shigella dysenteriae*, son de difícil aislamiento (fastidiosos) y, por lo tanto, pueden no ser recuperados en el laboratorio, es por esta razón, que *E. coli*, se utiliza como una bacteria indicadora de contaminación.

Por definición, las bacterias intestinales *como E. coli* y *E. aerogenes* se denominan coliformes, estos son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, que no forman endosporas y que fermentan la lactosa para producir ácido y gas en 48 horas, cuando se cultivan a 35 ° C. La fermentación de lactosa con formación de ácido y gas, es la base para determinar el recuento total de coliformes en muestras de agua y, por lo tanto, su inocuidad.

Existen varios métodos disponibles para determinar la calidad microbiológica del agua, incluidos el Número Más Probable (NMP), pruebas de ATP, filtración por membrana, el uso de placas de vertido y las pruebas rápidas de detección (Cappuccino y Welsh, 2019). El método de NMP se realiza en tres etapas, para el estudio de coliformes en agua: presuntiva, confirmativa y test de McKenzie, cada prueba se basa en las características metabólicas de los coliformes, estas pruebas se realizan secuencialmente en cada muestra a analizar y detectan la presencia de bacterias coliformes, indicadoras de contaminación fecal.

Para las muestras de agua, se recomienda que el agua esté embotellada en su empaque original, que esté sellado y se pueda transportar y almacenar a temperatura ambiente, sin necesidad de refrigeración. El agua contenida en paquetes abiertos o muestras de agua transferidas a otros recipientes debe transportarse y almacenarse en refrigeración. Las muestras deben analizarse en un intervalo de preferiblemente 8 horas, pero no superior a 24 horas.

Para otros tipos de agua, se siguen las siguientes pautas:

- Agua potable para fines de cumplimiento. Preferiblemente, mantenga las muestras a temperaturas por debajo de 8 ° C (sin congelar) durante el transporte al laboratorio. No exceda el tiempo de espera de 24 horas desde la recolección hasta el análisis de bacterias coliformes. No exceda el tiempo de espera de 8 horas para el recuento de mesófilos.
- Agua no potable para fines de cumplimiento. Mantenga las muestras a temperaturas inferiores a 8 ° C (sin congelar), durante un tiempo máximo de transporte de seis horas.

Otros tipos de agua como agua de piscina: mantenga las muestras a temperaturas inferiores a 8 ° C (sin congelar) durante el transporte y hasta el momento del análisis. El tiempo de espera no debe exceder las 24 horas (da Silva et al., 2018).

11.3.2. Indicadores de contaminación fecal en aguas

El control de la calidad microbiológica del agua de consumo y vertido requiere una serie de análisis en laboratorios especializados para determinar la presencia de M.O. patógenos, representando varios días de análisis y costos elevados; como alternativa se ha propuesto el uso de indicadores microbianos, ya que estos tienen un comportamiento similar a los patógenos, pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar. Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección, es similar a la del indicador.

Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características:

1. Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
2. Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
3. Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.
4. Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
5. Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.

6. Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).
7. Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
8. No debe ser patógeno.

No existe ningún microorganismo que reúna todos los criterios de un indicador ideal y apenas algunos grupos satisfacen algunos de estos requisitos (Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua – CYTED, 2004).

11.3.3. Bacterias

Las bacterias más comunes que se encuentran en el agua son las entéricas, pero debido a las condiciones ambientales diferentes a las de su origen (tracto gastrointestinal del hombre) no sobreviven tan fácilmente y su recuento en el laboratorio es más complejo, es por esto que se usan las bacterias coliformes:

Son contaminantes comunes del tracto gastrointestinal tanto del hombre como de los animales de sangre caliente.

- Están presentes en el tracto gastrointestinal en grandes cantidades.
- Permanecen por más tiempo en el agua que las bacterias patógenas.
- Se comportan de igual manera que los patógenos en los sistemas de desinfección.

Los coliformes fecales están formados por *E. coli* y ciertas especies de Klebsiella, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal, debido a su relación con el grupo tifoide-paratifoide y a su alta concentración en diferentes tipos de muestras, los coliformes fecales son termotolerantes lo que los diferencian del subgrupo de los coliformes totales, los cuales no son confiables porque son capaces de multiplicarse en el agua, para aguas superficiales o para evaluar la eficiencia de una planta de tratamiento de aguas residuales deben usarse los coliformes fecales. Solamente deberá recurrirse a los coliformes totales si no hay condiciones para cuantificar los coliformes fecales.

Las características microbiológicas del agua para consumo humano deben enmarcarse dentro de los siguientes valores máximos aceptables desde el punto de vista microbiológico, los cuales son establecidos teniendo en cuenta los límites de confianza del 95% y para técnicas con habilidad de detección desde 1 Unidad Formadora de Colonia (UFC) o 1 microorganismo en 100 cm^3 de muestra:

En aguas tratadas, los coliformes totales funcionan como un alerta de que ocurrió contaminación, sin identificar el origen. Indican que hubo fallas en el tratamiento, en la distribución o en las propias fuentes domiciliarias. Su presencia acciona los mecanismos de control de calidad y de procesamiento dentro de la planta de tratamiento de agua, e intensifica la vigilancia en la red de distribución.

Clostridium perfringens se ha propuesto como indicador de la contaminación fecal lejana, cuando se presenta contaminación del agua subterránea, pero su número no refleja el verdadero grado de contaminación fecal. Sin embargo, sí es un buen indicador de la eficiencia del tratamiento de aguas manantiales. Cuando está presente en el agua potabilizada y desinfectada indica fallas en el tratamiento o en la desinfección. Su presencia en aguas cloradas se asocia con deficiencias en la filtración. Debido a la alta resistencia de las esporas puede indicar, de forma indirecta, la presencia de quistes de protozoarios (Rolim, 2000).

11.3.4. Virus

En contraste con las bacterias, los virus no se encuentran normalmente en las heces del hombre. Están presentes solamente en el tracto gastrointestinal de individuos que han sido afectados. Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son el grupo de microorganismos patógenos más críticos, debido a que la dosis mínima infecciosa es muy baja, son muy resistentes a los sistemas de desinfección y el control a nivel de laboratorio es costoso. Más de 140 virus patógenos pueden ser transmitidos al hombre a través del agua. Estos son los virus entéricos eliminados a través de las heces de personas infectadas. Los más comunes son los virus causantes de gastroenteritis y el virus de la hepatitis. Algunos de estos virus (rotavirus, virus Norwalk) no generan una protección inmunitaria a largo plazo, por lo que la infección puede repetirse varias veces a lo largo de la vida.

El poliovirus ha sido propuesto como indicador viral. Sin embargo, las cantidades de este virus encontradas en ambientes acuáticos son demasiado variables como para que sea considerado un buen indicador. Además de estas variaciones, la detección de virus entéricos requiere laboratorios especializados y los resultados tardan varios días. Estas dificultades en el uso de los enterovirus como indicadores de contaminación de origen fecal en el agua, ha llevado a la búsqueda de indicadores alternativos que sean de rápida y fácil detección y que permitan prever el comportamiento de los enterovirus en el medioambiente. Estos indicadores son los fagos.

Se han propuesto dos tipos de fagos: colifagos somáticos y colifagos F específicos. Los argumentos que validan la propuesta son:

- Los fagos se encuentran abundantemente en agua residual y agua contaminada.
- Las poblaciones de colifagos son mucho más grandes que las de los enterovirus.
- Los colifagos son incapaces de reproducirse fuera del huésped bacteriano.
- Los colifagos se pueden aislar y contar usando métodos sencillos.
- Se obtienen resultados más rápidos cuando se analizan los colifagos que cuando se trabaja con enterovirus.
- Ciertos colifagos son tan resistentes como los enterovirus a los procesos de desinfección.

Los colifagos se relacionan directamente con su huésped bacteriano específico *E. coli*. Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, los coliformes fecales no son buenos indicadores de contaminación fecal, ya que desaparecen rápidamente. Por consiguiente, es mejor usar microorganismos más resistentes, como los colifagos que reflejan mucho mejor los niveles de *Salmonella*, otros bacteriófagos que se han evaluado con mayor éxito son los fagos somáticos, F específicos y los que infectan *Bacteroides fragilis*. Se ha observado que su comportamiento es similar al de algunos virus causantes de enfermedades de origen hídrico y que su detección se puede hacer en pocas horas y con técnicas que representan poca dificultad frente a las utilizadas para los virus patógenos. No se ha definido cuál es el más recomendado para el análisis de calidad de aguas y lo que se observa es que dependiendo del tipo de agua y de algunas condiciones ambientales en particular es recomendable el uso de uno o más de estos fagos (Campos et al., 2008).

11.3.5. Parásitos

El estudio de los huevos de helminto a nivel ambiental ha hecho necesaria la selección de un parásito indicador debido a las limitaciones en la detección a nivel de laboratorio. *Ascaris lumbricoides* se ha sugerido como un buen indicador del comportamiento de los huevos de helminto. Sus ventajas son:

- Persiste en el medioambiente por muchos meses, pero no se multiplica.
- Se puede identificar fácilmente.
- El índice de parasitismo a nivel mundial es muy alto.
- El riesgo de transmisión es alto, debido a la elevada concentración de huevos que se puede encontrar.

Tampoco hay que olvidar que en los últimos años se ha dado gran importancia a la contaminación por *Giardia lamblia* y *Cryptosporidium parvum*. Estos protozoos se consideran patógenos emergentes y la investigación, en el caso de la contaminación de aguas, se ha orientado básicamente a la detección a nivel de laboratorio y al estudio de procesos de desinfección que garanticen la eliminación de este tipo de quistes.

11.3.6. Método de filtración por membrana

La filtración por membrana es un análisis cuantitativo que se basa en el crecimiento, identificación y recuento de las colonias de los microorganismos retenidos en la superficie de una membrana de celulosa, a través del cual se ha filtrado un volumen conocido de muestras de agua incubada en un medio de cultivo según el microorganismo a analizar, durante un tiempo y a una temperatura adecuada.

Existen otras pruebas para hacer análisis microbiológico del agua donde se usan filtros de membrana capaces de retener microorganismos mayores de 0,45 µm, estos filtros ofrecen varias ventajas sobre el método convencional de análisis de agua de múltiples tubos: **(1)** los resultados están disponibles en un período de tiempo más corto, **(2)** se pueden procesar mayores volúmenes de muestra y **(3)** debido a la alta precisión de este método, los resultados son fácilmente reproducibles, una desventaja involucra el procesamiento de muestras turbias que contienen grandes cantidades de materiales en suspensión; la materia particulada obstruye los poros e inhibe el paso del volumen específico de agua.

La prueba consiste en pasar una muestra de agua a través de una de membrana estéril que está alojada en un aparato de filtrado especial contenido en un matraz de succión, después de la filtración, el disco de filtro que contiene los microorganismos atrapados se transfiere asépticamente a una caja de Petri estéril que contiene una almohadilla absorbente saturada con un medio líquido diferencial selectivo, posterior a la incubación, se realiza el recuento de las colonias presentes, este experimento se utiliza para analizar una serie de diluciones de muestras de agua. Las pautas aprobadas por la EPA para la determinación de microorganismos contaminantes fecales se utilizan rutinariamente en todo el mundo para examinar muestras de agua, antes de que el agua tratada se libere en las vías fluviales de una nación. Un recuento total de bacterias coliformes determina la potabilidad de las fuentes de agua. Además, los tipos de contaminación fecal, en su caso, se establecen mediante un recuento de coliformes fecales, indicativo de contaminación (Cappuccino y Welsh, 2019) **(ver Práctica 4 de métodos de siembra, filtración por membrana).**

11.3.7. Alimentos

El examen microbiológico de los alimentos se basa principalmente en técnicas de cultivo para detectar y enumerar microorganismos vivos. Dada la variedad y multiplicidad de grupos, géneros y especies que pueden estar presentes, se utilizan diferentes tipos de pruebas, que se pueden clasificar en dos: **(1)** pruebas cualitativas, que tienen como objetivo detectar la presencia o ausencia de los microorganismos, sin cuantificar, y **(2)** pruebas cuantitativas, que determinan la cantidad de los microorganismos objetivo en la muestra, generalmente por unidad de peso o volumen. Cada una de estas pruebas sigue procedimientos diferenciados, que, a su vez, dependen de los microorganismos presentes en la muestra, pero la mayoría de ellos utilizan las mismas técnicas básicas

de cultivo microbiológico. El procedimiento básico consiste en diluir la muestra e inocular en un medio de cultivo licuado, homogeneizando la alícuota de la muestra y, luego, se incuba de acuerdo a las necesidades de los microorganismos. Estas técnicas son: detección de presencia / ausencia, NMP y recuentos en placa para mesófilos aerobios, psicrotróficos aeróbicos, levaduras y mohos, esporas de clostridium sulfito reductoras, *Staphylococcus aureus, Bacillus cereus y Clostridium perfringens, Salmonella* entre otros.

11.4. Número Más Probable (NMP) para aguas

El NMP es conocido también como el sistema de tubos múltiples, donde se utilizan tres series de tres tubos cada una y se realiza en tres etapas así:

a. Prueba presuntiva

Se utiliza para determinar bacterias fermentadoras de lactosa y productores de gas en una muestra de agua, se inoculan diferentes volúmenes de la muestra en caldo lactosado a diferente concentración, con el fin de permitir un mayor crecimiento microbiano, de cada tubo positivo se repica en caldo brila y de estos, los tubos que presenten resultados positivos pasan a la siguiente etapa.

b. Prueba confirmativa

Para evitar falsos positivos con bacterias Gram positivas como *Clostridium perfringens*, que dan la reacción positiva; el tubo positivo de brila se siembra en estrías en agar EMB (inhibe las bacterias Gram positivas), se espera que los coliformes lactosa positivos presenten brillo metálico.

c. Determinación de coliformes fecales (test de McKenzie)

Una vez confirmada la presencia de *E. coli* en EMB, se requiere la prueba de test de McKenzie para identificar coliformes de origen fecal, repicando una colonia aislada de un tubo de la serie más diluida, simultáneamente se siembra en caldo brila y caldo triptona, se considera un resultado positivo cuando en el caldo brila hay presencia de gas y turbidez; y en el caldo triptona se observa la formación de anillo cereza al adicionar el reactivo de kovacs, lo que indica que es indol positivo, solo si los dos medios tienen resultados positivos se confirma la presencia de *E. coli* de origen fecal.

11.4.1. Equipos

Mechero Bunsen, incubadora.

11.4.2. Insumos y materiales

Muestras de agua de piscina, estanque y grifo, asa de inoculación, gradilla para tubos de ensayo, pipetas estériles de 10 ml y 1,0 ml, dispositivo de pipeteo mecánico, marcador permanente, reactivo de Kovacs, tubos de ensayos.

11.4.3. Medios de cultivo

Los medios de cultivo necesarios por muestra son:

- Tres tubos con caldo lactosa 2 [ ] (doble concentración), rotulados como (A1 -A2 - A3), seis tubos con caldo lactosa N [ ] (concentración normal), rotulados como (a1 - a2 - a3) y (a´1-a´2-a´3), diez tubos con caldo verde bilis brillante, caja de Petri con agar eosina-azul de metileno (EMB), un tubo de caldo triptona.

Tip

- Antes de llevar los medios de cultivos a incubación se debe revisar que las bujías de Durham estén completamente llenas de caldo para evitar falsos positivos.

- Los tubos con caldo lactosa y caldo brila llevarán bujía de Durham.

11.4.4. Procedimiento

Número más probable para aguas (Figura 11.1)

a). Prueba presuntiva

1. Agitar la muestra de agua.
2. Rotular los tres tubos de cada una de las tres series, de acuerdo al volumen a inocular, así:Muestra: agua
   - 3 tubos A1 -A2 - A3- de 10 ml c/u
   - 3 tubos a1 - a2 - a3 – de 1 ml c/u
   - 3 tubos a´1-a´2-a´3 – de 0.1 ml c/u
3. Transferir en condiciones asépticas 10 ml de la muestra de agua a analizar a cada uno de los tres tubos rotulados como de la de caldo lactosa 2 [ ] etiquetados como: A1 A2 A3.
4. A la segunda serie de tres tubos que contienen 10 ml de caldo lactosa N [ ] y marcados como a1 a2 a3, transferir 1 ml de la muestra a cada uno.
5. A la tercera serie de tres tubos que contienen 10 ml de caldo lactosa N [ ] etiquetados como a´1-a´2-a´3, transferir 0.1 ml de muestra.
6. Incubar 24 - 48 h a 35 °C.
7. Leer los resultados, considerando positivos la presencia de gas y turbidez.
8. Transferir la alícuota de cada tubo positivo de caldo lactosa a un tubo de caldo brila y marcar con las diluciones correspondientes.

b). Prueba confirmativa

1. Marque la caja de Petri que contiene agar EMB con la identificación de los tubos que dieron positivos en la prueba anterior.
2. Sembrar en estría en agar EMB cada tubo que dio positivo en la prueba presuntiva, como se muestra en la **Figura 11.1**.
3. Incubar 24 h a 35 ° C.
4. Observar la presencia de brillo metálico en cada una de las estrías considerándolo positivo, registrar el número de tubos positivos en cada serie y leer el valor en la tabla de NMP.
5. Al interpretar en la tabla con los valores estándar si el NMP da por encima de 23 el agua no es potable, pero se debe continuar la confirmación de coliforme de origen fecal realizando el test de McKenzie.

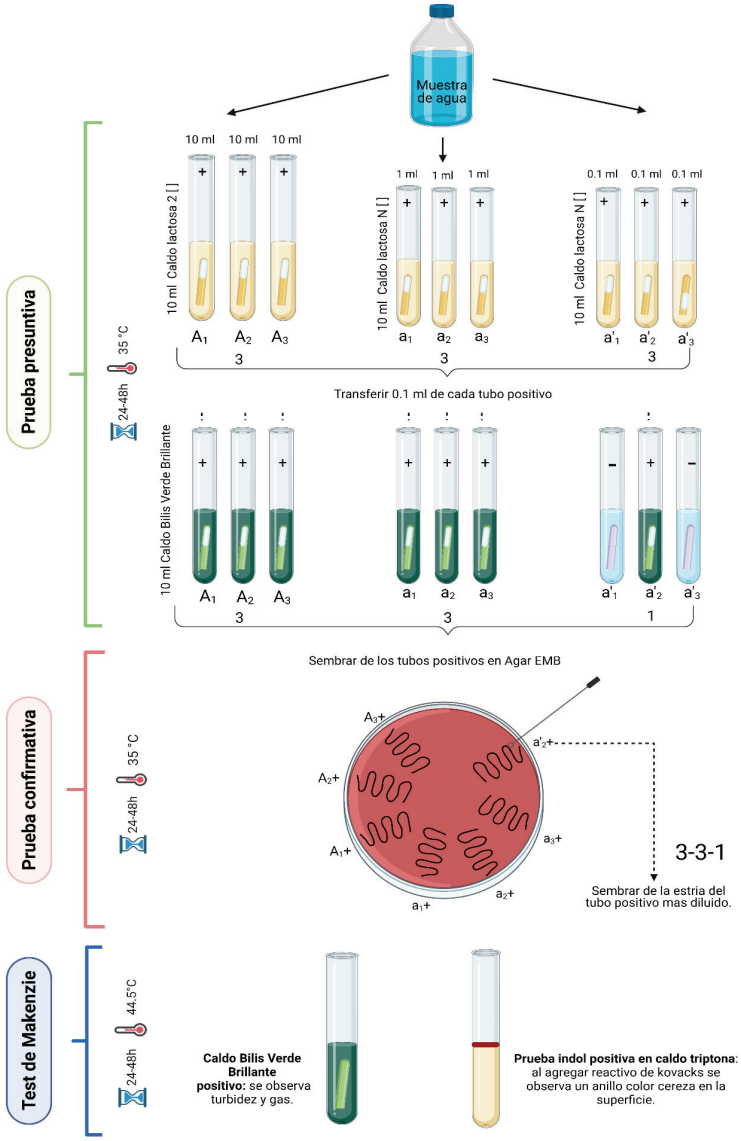
c). Determinación de coliformes fecales (test de McKenzie)

1. Etiquetar los tubos con caldo brila y caldo triptona.
2. Flamear el asa e inocular los tubos, con una colonia de *E. coli* positiva aislada de la serie más diluida.
3. Incubar 24- 48 h a 44.5 ° C.

4. Leer el caldo brila (positivo presencia de gas y turbidez) en el caldo triptona agregar el reactivo de Kovacs para ver la formación de un anillo color cereza, el cual sería un resultado positivo para indol, registrar los resultados en el informe de laboratorio.

5. En caso de que la prueba indol de positiva y el caldo brila, se confirma la presencia de *E. coli* fecal.

Figura 11.1. *Metodología para hallar el número más probable en aguas. A: Prueba presuntiva. B: Prueba confirmativa. C: Test de Mackenzie***.**



Fuente: Autores (2023).

Tabla 11.1. *Tabla de NMP por 100 ml para agua y alimentos. Series de tres tubos.*

Numero de tubos que dan reacción positiva			NMP	Límite de confianza del 95 %	
3 tubos de 10 ml	3 tubos de 1 ml	3 tubos de 0,1 ml		Límite inferior	Límite superior
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	36
2	1	0	15	3	37
2	1	1	20	7	44
2	2	0	21	4	89
2	2	1	28	10	47
3	0	0	23	4	149
3	0	1	39	7	120
3	0	2	64	15	130
3	1	0	43	7	379
3	1	1	75	14	210
3	1	2	120	30	230
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1.300
3	3	1	460	71	2.400
3	3	2	1.100	150	4.800

Fuente: Autores (2023).

11.5. Alimentos y agua envasada

Los alimentos son el principal vehículo responsable de transmitir enfermedades del sistema digestivo, por esta razón, se examinan para detectar la presencia de coliformes, ya que la presencia de coliformes generalmente indica contaminación fecal. Durante el procesamiento (triturado, lavado y envasado), los alimentos pueden estar contaminados con microbios del suelo y microbiota de animales, por los manipuladores de alimentos y maquinaria. Las empresas procesadoras de

alimentos y las agencias de salud pública realizan habitualmente el recuento en placa de alimentos y leche. El recuento en placa heterotrófica se utiliza para determinar el número total de bacterias viables en una muestra de alimento. La presencia de una gran cantidad de bacterias no es deseable en la mayoría de los alimentos porque aumenta la probabilidad de que haya patógenos presentes y aumenta la posibilidad de que los alimentos se echen a perder **(Figuras 11.2 y 11.3)** (Johnson y Case, 2019).

- **Recuento de microorganismos anaerobios mesófilos**

Es el método comúnmente utilizado para determinar el número de células viables o de unidades formadoras de colonias (UFC) en un alimento. Es el indicador más amplio en alimentos, ya que incluye todos los géneros aerobios y facultativos que crecen en medios simples a una temperatura entre 20 °C y 45 °C. Este recuento se considera como indicador del grado de contaminación de los alimentos en cualquier etapa del proceso de producción, permite también obtener información sobre la alteración incipiente de los alimentos y su probable vida útil. Medios de cultivo agar plate count (agar peptona de caseína glucosa extracto de levadura).

- **Determinación de coliformes totales en alimentos (NMP)**

Este grupo de microorganismos comprende varios géneros de la familia Enterobacteriaceae; está ampliamente difundido en la naturaleza, agua y suelo. También es habitante normal del tracto intestinal del hombre y animales de sangre caliente. Su presencia en alimentos es signo de mala calidad higiénica en el proceso, falta de higiene de los manipuladores, recontaminación después del proceso y contaminación fecal.

11.5.1. Equipos

Mezclador vortex, stomacher, baño de agua para calentar el agar.

11.5.2. Insumos y materiales

Pipetas desechables, placas de Petri estériles (4), nueve tubos de ensayo por grupo, nueve tubos de Durham, frasco para hacer la dilución inicial.

11.5.3. Medios y microorganismos

Muestra leche lista para el consumo, agar nutritivo, Solución Salina Peptonada (SSP), agar EMB.

11.5.4. Procedimiento

Primera parte

- **Preparación de diluciones**

1. Transferir asépticamente 10 ml de la muestra de leche a 90 ml de SSP etiquetar el frasco como 10^{-1}, homogeneizar el contenido en el stomacher y dejar en reposo 15 minutos.
2. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10^{-1} a 9 ml de SSP, etiquetar el tubo como 10^{-2}, agitar en vortex.
3. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10^{-2} a 9 ml de SSP, etiquetar el tubo como 10^{-3}.
4. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10^{-3} a 9 ml de SSP, etiquetar el tubo como 10^{-4}.
5. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10^{-4} a 9 ml de SSP, etiquetar el tubo como 10^{-5}.

- **NMP de *E. Coli* total**

a. Prueba presuntiva

1. Marcar 3 tubos por cada serie A1 -A2 - A3; a1 - a2 - a3; a´1-a´2-a´3.
2. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10-1 a los tres tubos de la primera serie de caldo brila.
3. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10-2 a los tres tubos de la segunda serie de caldo brila.
4. Transferir asépticamente 1 ml de la dilución 10-3 a los tres tubos de la tercera serie de caldo brila.
5. Repetir los pasos 1-4 con la muestra de agua envasada.
6. Incubar 24-48h a 35°C.

b. Prueba confirmativa

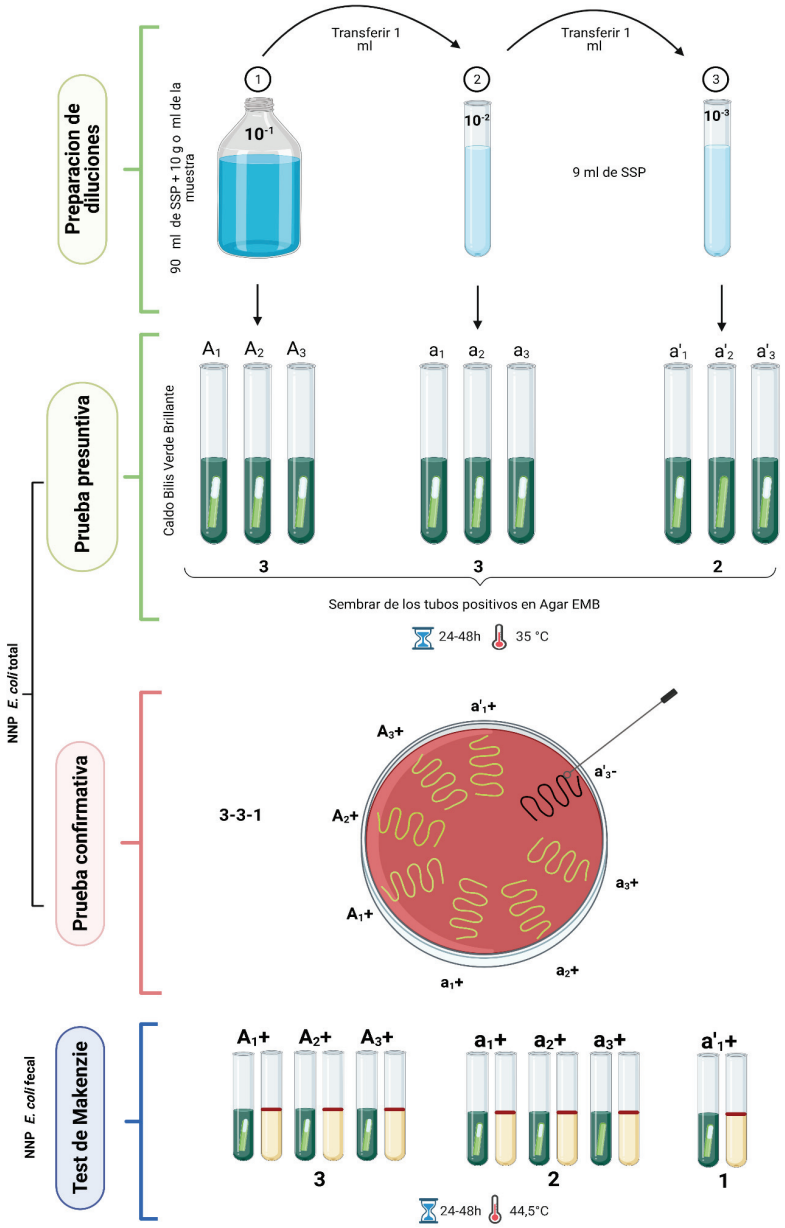
1. Marque la caja de Petri que contiene agar EMB con la identificación de los tubos que dieron positivos en la prueba anterior.
2. Estriar sobre la superficie del EMB, como se muestra en la **Figura 11.1.**
3. Incubar 24 h a 35 ° C.
4. Observar la presencia de brillo metálico en cada una de las estrías considerándolo positivo, registrar el número de tubos positivos en cada serie y leer el valor en la tabla de NMP.
5. Interpretar en la tabla de NMP.

- **NMP *E. coli* fecal**

Test de Mackenzie

1. Etiquetar un tubo brila y otro con caldo triptona por cada tubo que se considere positivo con brillo metálico en el EMB.
2. Flamear el asa e inocular el juego de dos tubos, por cada tubo que de positivo para *E. coli.*
3. Incubar 24- 48 h a 44.5 ° C.
4. Leer el caldo brila (positivo presencia de gas y turbidez), al caldo triptona agregar el reactivo de Kovacs para ver la formación de un anillo color cereza, el cual sería un resultado positivo para indol, registrar los resultados en el informe de laboratorio.
5. Solo se considera *E. coli* de origen fecal cuando los dos tubos son positivos.

Figura 11.2. *Primera parte: metodología para hallar el número más probable en alimentos y agua envasada.* ***A:*** *Prueba presuntiva.* ***B:*** *Prueba confirmativa.* ***C:*** *Test de Mackenzie.*



Fuente: Autores (2023).

Segunda parte

- **Recuento de mesófilos**

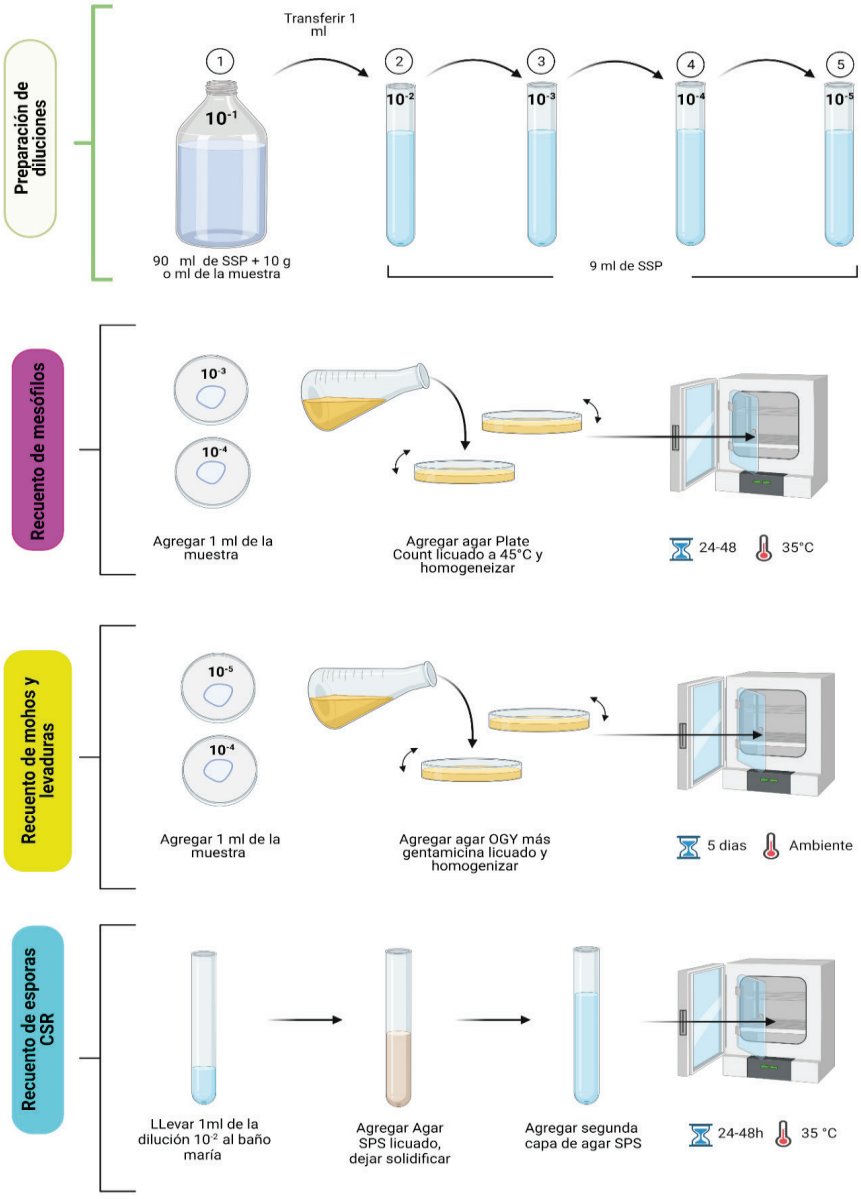
1. Marcar la base en las cajas de Petri estéril con la dilución, tipo de muestra y fecha.

2. Depositar 1 ml de la dilución seleccionada en la caja de Petri.
3. Adicionar el agar plate count licuado a 45°C.
4. Homogeneizar haciendo movimientos rotativos y perpendiculares, con el fin de que se mezclen completamente la muestra y el medio de cultivo en la caja de Petri.
5. Incubar 24-48h 35°C.
6. Contar la UFC independientes, teniendo en cuenta solo las que presentan entre 30 y 300 UFC.

Recuento de mohos y levaduras

1. Marcar la base en las cajas de Petri estéril con la dilución, tipo de muestra y fecha.
2. Depositar 1 ml de la dilución seleccionada en la caja de Petri.
3. Adicionar el agar OGY más gentamicina, licuado.
4. Homogeneizar haciendo movimientos rotativos y perpendiculares, con el fin de que se mezclen completamente la muestra y el medio de cultivo en la caja de Petri.
5. Incubar 5 días a temperatura ambiente en oscuridad.
6. Contar la UFC independientes, teniendo en cuenta solo las que presentan entre 30 y 300 UFC.
7. Recuento de esporas clostridium sulfito reductoras.
8. Marcar un tubo estéril con el tipo de muestra y fecha.
9. Depositar 1 ml de la dilución 10-1 llevar a baño maría a 80°C 10 minutos.
10. Adicionar el agar SPS licuado, dejar enfriar hasta que se solidifique.
11. Adicionar una segunda capa de agar SPS para garantizar la anaerobiosis.
12. Incubar 24-48h 35°C.
13. Contar las UFC independientes.

Figura 11.3. *Segunda parte metodología para hallar el número más probable en alimentos y agua envasada.* ***A:*** *Recuento de mesófilos.* ***B:*** *Recuento de mohos y levaduras.* ***C:*** *Recuento de esporas CSR.*



SSP: Solución salina peptonada
CSR: Clostridium sulfito reductor

Fuente: Autores (2023).

11.6 Aire

La determinación de los microorganismos en el aire interior se vuelve importante cuando se analiza la incidencia en la salud de las personas que ocupan las edificaciones, ya que el aire es un medio de dispersión de muchos patógenos, entre ellos las bacterias. Estas bacterias transportadas en el aire tienen un efecto en la calidad del aire interno de viviendas y oficinas, hospitales, industrias de manufactura y farmacéuticas, laboratorios, salones de clase, archivos documentales, museos, bibliotecas y librerías. El interés en la calidad del aire de los laboratorios radica principalmente en los laboratorios de diagnóstico de microbiología clínica y ambiental. Por el carácter del laboratorio de microbiología clínica, en estos espacios se originan riesgos de diverso tipo, especialmente biológicos, que pueden producir problemas en la salud de los trabajadores y de los usuarios **(Figura 11.4)** (Romero et al., 2016).

11.6.1 Métodos de muestreo

El estudio de los microorganismos del aire depende de las técnicas desarrolladas para la toma de muestras. Desde el siglo XIX comenzaron las investigaciones sobre estos y se han diseñado diversidad equipos y técnicas para su análisis. Actualmente, existen una gran cantidad de métodos e instrumentos para detectar los microbios en el aire, de los que se citan los más útiles y usuales. Las técnicas utilizadas son diversas, de las cuales, la sedimentación, filtración, el impacto sobre superficies sólidas y el borboteo en medios líquidos son las más importantes (Silva et al., 2018).

11.6.2. *Equipos*

Incubadora.

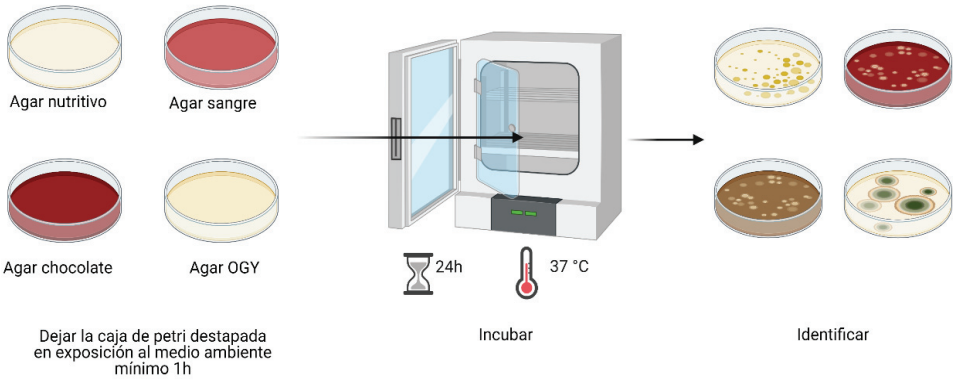
11.6.3. Insumos y materiales

Una caja de Petri con agar nutritivo, una caja de Petri con agar sangre, una caja de Petri con agar chocolate, una caja de Petri con agar OGY.

11.6.4. Procedimiento

1. Marcar en la base las cuatro cajas de Petri de cada ambiente a estudiar.
2. Poner las cajas de Petri destapadas sobre las superficies a estudiar por un tiempo mínimo de 1h (método sedimentación en placa).
3. Incubar 24 h 37°C.
4. Identificar los microorganismos que crecieron.

Figura 11.4. *Metodología para determinar la calidad del aire*



Fuente: Autores (2023).

11.7. Resultados

Calidad de agua

a. Prueba presuntiva

Utilizando la **Tabla 11.1** determine y registre el NMP.

Ejemplo: si apareciera gas en los tres tubos etiquetados como CL2 [ ], en dos de los tubos etiquetados como CL [ ] y en uno etiquetado como CLA [ ], la serie se leería como 5-2-1. De la tabla MPN, tal lectura indicaría aproximadamente 70 microorganismos por 100 ml de agua, con una probabilidad del 95% de que estén presentes entre 22 y 170 microorganismos.

Tabla 11.2. *Reporte de resultados obtenidos de la prueba presuntiva.*

	GAS + TURBIEDAD												Lectura	NMP	Rango de probabilidad del 95%
	A_1-A_2-A_3			a_1-a_2-a_3				a'_1-a'_2-a'_3							
	Tubo			Tubo				Tubo							
Muestra de agua	1	2	3	1	2	3		1	2	3					
Aguas residuales															
Agua del estanque															
Agua del grifo															

Fuente: Autores (2023).

Tabla 11.3. *Reporte de resultados obtenidos de la prueba confirmada.*

	Coliformes	
Muestra de agua	**Agar EMB**	**Agar Endo**
Aguas residuales		
Agua del estanque		
Agua del grifo		

Fuente: Autores (2023).

- **Preguntas**

1. ¿Cuál es la razón fundamental para seleccionar *E. coli* como indicador de la potabilidad del agua?
2. ¿Por qué este procedimiento es más cualitativo que cuantitativo?
3. Explique ¿por qué es de suma importancia analizar los suministros de agua que sirven a las comunidades industrializadas?

- **Análisis de alimentos**

Muestra de alimento listo para el consumo: _____

Tabla 11.4. *Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos.*

Dilución	Colonias por caja
1:	
1:	
1:	
1:	

Fuente: Autores (2023).

Muestra de alimento procesado: _____

Tabla 11.5. *Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos procesados.*

Dilución	Colonias por caja
1:	
1:	
1:	
1:	
1:	
1:	

Fuente: Autores (2023).

11.8. Cuestionario

1. ¿Tus resultados concuerdan con tu hipótesis?, ¿qué probaste?
2. Número de unidades formadoras de colonias por ml (o gramo) de muestra original: realice sus cálculos en el espacio a continuación.
3. En un laboratorio de control de calidad, cada dilución se coloca en placa por duplicado o triplicado. ¿Por qué aumentaría esto la precisión de un recuento de placas estándar?
4. Resultados de sus compañeros de clase que probaron el mismo producto:

Tabla 11.6. *Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos.*

Z	UFC/ml o gramo
1	
2	
3	
Promedio:	

Fuente: Autores (2023).

Registre los datos de otros alimentos utilizados por otros estudiantes:

Tabla 11.7. *Reporte de resultados obtenidos del análisis de alimentos.*

Alimentos	UFC/ml o gramo

Fuente: Autores (2023).

1. ¿Por qué se utilizan placas con 25 a 250 colonias para los cálculos?
2. Existen otras técnicas para contar bacterias, como el recuento microscópico directo y la turbidez.
3. ¿Por qué se prefiere el recuento en placa heterotrófica para los alimentos?
4. ¿Por qué la carne picada es un mejor medio de crecimiento bacteriano que un bistec o un asado?
5. ¿Por qué la congelación y descongelación repetidas aumentan el crecimiento bacteriano en la carne?
6. Suponga que un recuento en placa heterótrofo indica que hay una cantidad sustancial de microbios en la muestra de alimento. ¿Qué se debe hacer a continuación para determinar si la muestra de alimento es un peligro para el consumidor?

Referencias bibliográficas

Brown, A. E. y Smith, H. R. (2017). *Benson's microbiological applications laboratory manual in general microbiology* (Fourteenth, Vol. 7). New York: Mc Graw Hill Education.

Campos, P. C., Cárdenas, G. M. y Guerrero, C. A. (2008). Comportamiento de los indicadores de contaminación fecal en diferente tipo de aguas de la sabana de Bogotá (Colombia). *Universitas Scientiarum, 13*(2), 103-108.

Cappuccino, J. G. y Welsh, C. (2019). *Microbiology a laboratory manual* (Twelfth Ed). New York: Pearson.

da Silva, N., Taniwaki, M., Junqueira, V. C. A., Silveira, N., Okazaki, M. M. y Romeiro Gomes, R. A. (2018). *Microbiological examination methods of food and water a Laboratory Manual* (2nd ed.). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781315165011

Johnson, T. R. y Case, C. L. (2019). Laboratory experiments in microbiolgy. En *Journal of Chemical Information and Modeling* (Twelfth edit, Vol. 53). NY: Pearson.

Red Iberoamericana de Potabilización y Depuración del Agua - CYTED. (2004). *Indicadores de contaminación fecal en aguas. Agua potable para comunidades rurales, reusó y tratamientos avanzados de aguas residuales domésticas* (pp. 224-229). Página web: http://tierra.rediris. Es/hidrored/ebooks/ripda/pdfs/Capitulo_20. Pdf.

Rolim, S. (2000). *Sistemas de lagunas de estabilización*. Mc Graw Hill. Bogotá. Primera edición.370 págs.

Romero, B. C., Castañeda, A. D. y Acosta, P. G. (2016). Determinación de la calidad bacteriológica del aire en un laboratorio de microbiología en la Universidad Distrital Francisco José de Caldas en Bogotá, Colombia. *Nova, 13*(26), 129-137. Recuperado de https://servicios.unileon.es/gestion-de-residuos/wp-content/blogs.dir/34/files/2014/03/guia-de-seguridad-y-buenas-practicas-en-el-laboratorio.pdf

Silva, M. J., Martínez, K. P. y Contreras, R. J. (2018). Determinación *de la calidad microbiológica en los ambientes de los laboratorios de la Universidad de Santander campus Cúcuta en el año 2018.*

Julia Esther Gallego Santos

Bacterióloga de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, especialista en Microbiología Médica de la Universidad Pontificia Javeriana, con diplomados en Docencia Universitaria de la Universidad del Tolima. Cuenta con experiencia laboral como bacterióloga en la Clínica Minerva, Clínica Tolima, Creasalud, Banco de Sangre de la Cruz Roja y como microbióloga en la Universidad del Tolima, ha ejercido como catedrática desde hace 22 años en los programas de Medicina, Enfermería y Biología. Coordinadora del Semillero de Infectología y Epidemiología (SEMIE) en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad del Tolima.

Leidy Adelaida Ángel González,
Saira Romero Sánchez,
Yeraldine González Sierra
Luis David Becerra Calderón,

Biólogos de la Universidad del Tolima, con curiosidad e iniciativa en el área de la microbiología.

Manual de laboratorio en microbiología general

El *Manual de laboratorio en microbiología general* recoge la experiencia, tanto académica como investigativa, adquirida en el ejercicio profesional de las docentes y el interés de los estudiantes en fortalecer su formación; está diseñado de forma didáctica para ayudar a mejorar la comprensión y aplicación de las técnicas específicas, usadas en los diferentes programas en los que se orienta la cátedra de Microbiología.

El texto unifica conceptos basados en los estándares usados en Microbiología y ajustados a las condiciones de los laboratorios de docencia, lo que permite su uso en diferentes programas. Está dirigido a estudiantes y docentes, quienes estén desarrollando un curso de Microbiología o áreas afines. El manual consta de 11 prácticas en las que se incluyen elementos teóricos y prácticos para, de este modo, contribuir a mejorar las destrezas en el desarrollo de la praxis y su aplicación en el ejercicio profesional e investigativo. Además, el *manual de laboratorio en microbiología general*:

- Está organizado por prácticas de laboratorio con objetivos de aprendizaje definidos.
- Cada práctica posee un soporte teórico.
- Las imágenes, fotos, tablas y videos explicativos ayudan a mejorar la comprensión y aplicación de técnicas específicas.
- Incluye preguntas de opción múltiple que ayudan a la autoevaluación y preparación de exámenes.

ISBN: 978-628-7537-56-9

Universidad del Tolima
ACREDITADA DE ALTA CALIDAD
¡Construimos la universidad que soñamos!