Manual Fundamentos y técnicas básicas en microbiología



Luz Marina Lizarazo Forero

Bacterióloga y Laboratorista Clínica Universidad Industrial de Santander-UIS. Ms.C. en Microbiología de la Universidad Javeriana. Doctora en Biología de la Universidad de Alicante-España. PosD., en Rizobiologia de la Estación Experimental del Zaídin, Granada-España.

Luz Marina Lizarazo Forero

Manual
Fundamentos y técnicas básicas en microbiología

Manual
Fundamentos y técnicas básicas en microbiología

Luz Marina Lizarazo Forero

Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
Tunja
2019

Manual Fundamentos y técnicas básicas en microbiología /Lizarazo Forero, Luz Marina. Tunja: Editorial UPTC, 2019. 202 p.

ISBN 978-958-660-234-1

1. Bioseguridad. 2. Preparación de medios de cultivos. 3. Bacterias, hongos, protozoos, virus. 4. Crecimiento microbiano, antibiosis. 5. Interacciones Microbianas.

(Dewey 547/21).

Rector, UPTC
Óscar Hernán Ramírez

Comité Editorial
Manuel Humberto Restrepo Domínguez, Ph. D.
Enrique Vera López, Ph. D
Yolima Bolívar Suárez, Mg.
Sandra Gabriela Numpaque Piracoca, Mg.
Olga Yaneth Acuña Rodríguez, Ph. D.
María Eugenia Morales Puentes, Ph. D.
Édgar Nelson López López , Mg.
Saida Zarely Ojeda Pérez, Ph. D.
Carlos Mauricio Moreno Téllez, Ph. D.

Editora en Jefe
Lida Esperanza Riscanevo Espitia, Ph. D.

Coordinadora Editorial
Andrea María Numpaque Acosta, Mg.

Corrección de Estilo
Claudia Helena Amarillo

Diseño y diagramación
Andrés A. López Ramírez
andres.lopez@uptc.edu.co

Primera Edición, 2015
Segunda Edición, 2017
Tercera Edición, 2019
200 ejemplares (impresos)

Manual Fundamentos y técnicas básicas en microbiología

ISBN 978-958-660-234-1

Colección Libros académicos UPTC.
© Luz Marina Lizarazo Forero, 2019
© Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, 2019

Editorial UPTC
Edificio Administrativo – Piso 4
Avenida Central del Norte 39-115, Tunja, Boyacá
comite.editorial@uptc.edu.co
www.uptc.edu.co

Libro financiado por la Dirección de Investigaciones de la UPTC. Se permite la reproducción parcial o total, con la autorización expresa de los titulares del derecho de autor. Este libro es registrado en Depósito Legal, según lo establecido en la Ley 44 de 1993, el Decreto 460 de 16 de marzo de 1995, el Decreto 2150 de 1995 y el Decreto 358 de 2000.

Libro resultado de procesos académicos

Citación: Lizarazo, L. (2015). *Manual Fundamentos y técnicas básicas en microbiología*. Tunja: Editorial UPTC.

A mis profesores de la carrera de bacteriología y laboratorio clínico de la Universidad Industrial de Santander, que sembraron en mí el entusiasmo por el mundo microscópico, a mis alumnos de la UPTC, de quienes también he aprendido.

Contenido

Prólogo.....9

Capítulo 1
Reconocimiento de los materiales, reactivos y equipos. Manipulación y medidas de seguridad.....11
1.1 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología.....13
1.2 Normas de trabajo en el laboratorio de microbiología.....15
1.3 Cabinas de seguridad biológica (CSB).....18

Capítulo 2
Morfología bacteriana.....25
2.1 Descripción microscópica de bacterias.....26
2.2 Descripción macroscópica de colonias de bacterias.....44

Capítulo 3
Distribución de los microorganismos en el ambiente.....49

Capítulo 4
Metabolismo bacteriano.....55
4.1 Medios de cultivo.....55
4.2 Métodos para obtener cultivos puros.....63
4.3 Medios de cultivo selectivos y diferenciales.....67
4.4 Pruebas bioquímicas.....75
4.5 Requerimientos de oxígeno y factores osmóticos de las bacterias.....97

Capítulo 5
Recuento de microorganismos.....105
5.1 Recuento microscópico directo.....106
5.2 Método de recuento en placa.....109

5.3 Método del número más probable (NMP).....114
5.4 Filtración por membrana.....120
5.5 Turbidimetría (curva de crecimiento).....122

Capítulo 6
Control del crecimiento microbiano.....131
6.1 Factores físico-químicos sobre el proceso de crecimiento de microorganismos.....131
6.2 Desinfectantes, antisépticos y antibióticos.....141

Capítulo 7
Hongos: formas filamentosas y levaduras.....149
7.1 Estructuras vegetativas fúngicas.....163
7.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y esporulación de los hongos.....169
7.3 Aislamientos de hongos del suelo.....170
7.4. Aislamiento de hongos acuáticos.....174

Capítulo 8
Interacciones o relaciones microbianas.....177

Capítulo 9
Virus.....185

Capítulo 10
Protozoos.....189

Referencias.....195

Índice de figuras.....199
Índice de tablas.....201

Prólogo

La versatilidad microbiana hace que los microorganismos jueguen un rol importante en la conservación del medio ambiente, la salud y la industria. Ellos constituyen también excelentes sistemas modelo para el estudio de la genética molecular y la fisiología celular. De igual forma, el conocimiento de nuevas técnicas, como la tecnología del ADN recombinante, ha revolucionado tanto la investigación como la aplicación práctica en todas las áreas de la microbiología.

Dado el importante valor que representa esta disciplina, he desarrollado este *Manual fundamentos y técnicas básicas en microbiología,* con el cual pretendo poner a disposición de los usuarios los conocimientos esenciales y actualizados, de los procedimientos básicos utilizados en microbiología. Todas las técnicas aquí descritas las he evaluado durante mi práctica profesional académica y de investigación, por tanto, el seguimiento de ellas asegura un resultado final de recomendable calidad.

Por consiguiente, este libro constituye una herramienta para el manejo de procesos que permitan despertar en el estudiante el deseo de conocer e investigar más allá de lo adquirido durante el curso.

El texto está dirigido a estudiantes de ciencias básicas, ciencias agrícolas, ingenierías, e incluye temas tales como: medidas de bioseguridad, preparación de medios de cultivo, técnicas de esterilización, siembra e identificación de bacterias, hongos, partículas virales y protozoos, fisiología, control del crecimiento microbiano, antibiosis e interacciones o relaciones microbianas

Capítulo I

Reconocimiento de materiales, reactivos y equipos. Manipulación y medidas de seguridad

Objetivos

- Describir los materiales y los reactivos de uso rutinario en el laboratorio de Microbiología.
- Reconocer el funcionamiento de los diferentes equipos.
- Ejercitar la manipulación de asas, tubos y cajas de Petri, teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad.

Introducción

La microbiología estudia los microorganismos y sus actividades, su morfología, estructura, reproducción, fisiología, metabolismo y genética, cómo están distribuidos en la naturaleza, sus interacciones con otros organismos, los efectos perjudiciales que ejercen sobre los seres vivos y las alteraciones físicas y químicas que provocan en su entorno.

Sin el conocimiento de los microorganismos, la biología sería mucho más limitada, no sabríamos que hay vida en condiciones de temperatura, salinidad o pH extremas, y la fotosíntesis solamente sería aerobia y oxigénica.

Materiales, reactivos y equipos

Portaobjetos (láminas)
Cubreobjetos (laminillas)
Cajas de Petri
Tubos de ensayo, probetas, erlenmeyers, pipetas
Asas de Drigalsky (rastrillo)
Asas bacteriológicas y micológicas
Gradillas
Pinzas
Dispensadores
Mechero de Bunsen
Medios de cultivo comerciales
Colorantes
Cámara de flujo laminar
Microscopios
Estereoscopios
Recuenta colonias
Autoclave
Incubadora
Horno de aire caliente
Baño serológico
Centrífuga
Balanzas
Espectrofotómetro

Procedimiento

1. El profesor dará las explicaciones sobre los materiales y reactivos que se utilizan en el laboratorio de microbiología. En relación con los equipos, solo se

mencionarán sus características generales, ya que su uso se explicará a medida que se desarrollen los demás laboratorios.

2. Cada uno de los estudiantes manipulará asas, tubos y cajas de Petri, teniendo en cuenta las medidas de bioseguridad e indicaciones del docente y las figuras 1, 2 y 3.

1.1 Bioseguridad en el laboratorio de microbiología

Generalidades

Se reconocen cuatro niveles de bioseguridad (BSL), que constan de combinaciones de prácticas y técnicas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio. Cada combinación es específicamente apropiada para las operaciones llevadas a cabo, las vías de transmisión documentadas de los agentes infecciosos, y la función o la actividad del laboratorio (APHA, 2004, https://www.cdc.gov › training › biosafety).

Nivel de bioseguridad 1. Se trabaja con microorganismos no patógenos identificados y con patógenos oportunistas, como los estudiados en laboratorios de fundamentos de microbiología. Son agentes biológicos que tienen escasísimas probabilidades de causar enfermedades en el ser humano y tienen pocas posibilidades de propagarse en la población.

Nivel de bioseguridad 2. Incluyen agentes biológicos y muestras con un potencial de riesgo que va de moderado a alto para el personal y el medio ambiente, es decir que pueden ser causa de enfermedades humanas y que podrían constituir un peligro para los trabajadores. Pero poco probable que se propaguen en la población y se suele disponer de profilaxis o tratamientos efectivos. Son microorganismos como los estudiados en laboratorios de enseñanza, en diagnóstico microbiológico y laboratorios de microbiología en un centro de atención primaria..

Difiere del nivel de bioseguridad 1 en que el personal del laboratorio cuenta con una capacitación específica en la manipulación de agentes patogénicos y está dirigido por personal competente. El acceso al laboratorio es limitado cuando se están desarrollando actividades. Se toman precauciones extremas

con elementos cortantes contaminados, y ciertos procedimientos que pueden generar aerosoles infecciosos, se llevan a cabo en cabinas de seguridad biológica.

Nivel de bioseguridad 3. Agentes biológicos indígenas o exóticos que pueden ser causa de enfermedades humanas graves o potencialmente letal como resultado de la exposición por vía de inhalación. Puede existir el riesgo de que se propaguen en la población, pero se suele disponer de profilaxis y tratamientos efectivos. Aplicable a las instalaciones clínicas, diagnóstico especializado, enseñanza, investigación o producción. El personal de laboratorio recibe instrucción específica en el manejo de agentes patogénicos y potencialmente letales, y es supervisado por científicos competentes con experiencia en el trabajo con estos agentes.

Todos los procedimientos que involucren la manipulación de materiales infecciosos se efectúan dentro de cabinas de bioseguridad u otros dispositivos de contención física, o por personal que lleva ropa y equipo protector adecuado. El laboratorio debe tener características de diseño e ingeniería especiales.

Nivel de bioseguridad 4. Agentes biológicos de altísimo riesgo o que son foráneos en el país y que requieren máxima seguridad. Son causa de enfermedades humanas graves y que constituyen un serio peligro para el personal. Puede existir el riesgo de que se propague en la población y no se suele disponer de profilaxis o tratamientos efectivos.

NIVEL DE BIOSEGURIDAD	BACTERIAS	HONGOS	PARTICULAS VIRALES
1	-*Escherichia coli* no patogénicas -*Bacillus subtilis* -*Staphylococcus epidermidis* -*Lactobacillus bulgaricus* -*Streptococcus lactis*	-*Sacharomyces cerevisiae* -*Penicillium roqueforti*	-Virus de hepatitis canina infecciosa
2	-*Staphylococcus aureus* -*Streptococcus* -*Bordetella pertussis* -*Clostridium botulinum* -*Clostridium tetani* -*Corynebacterium diphtheriae* -*Listeria monocytogenes* -*Micobacterias oportunistas* -*Haemophilus influenzae* -*Yersinia enterocolitica*	-*Aspergillus spp* -*Candida spp* -*Cryptococcus neoformans* -Hongos Dermatofitos -*Pneumocystis jiroveci* -*Sporothrix schenckii.*	Adenovirus Parvovirus Rotavirus Virus de la hepatitis B Virus de la gripe Virus del sarampión Virus de las paperas Virus de la rubéola

NIVEL DE BIOSEGURIDAD	BACTERIAS	HONGOS	PARTICULAS VIRALES
2	-Especies de Salmonelas *-Shigella* *-Legionella* *-Borrelia* *-Neiserias* patógenas *Treponema pallidum.*		
3	*Bacillus anthracis* *Brucella* *Coxiella burnetii* *Escherichia coli (verotoxigénica)* *Francisella tularensis* *Mycobacterium tuberculosis* *Mycobacterium leprae* *Rickettsias* *Salmonella* serotipo *typhi* *Shigella dysenteriae* serotipo 1 *Yersinia pestis.*	*Blastomyces dermatitidis* *Coccidioides immitis* *Histoplasma capsulatum* *Paracoccidioides brasiliensis.*	Virus de la encefalitis de California Virus de la encefalitis equina americana Virus de la estomatitis vesicular Virus de la hepatitis B Virus de la hepatitis C Virus de la hepatitis D Virus de la fiebre amarilla VIH.
4	Virus de la viruela Virus de la fiebre hemorrágica Congo-Crimea Fiebre Lassa Virus de Marburg Virus Ébola.		

1.2 Normas de trabajo en el laboratorio de microbiología

1. La bata de laboratorio, los guantes y las gafas deben utilizarse en todas las prácticas de laboratorio.
2. No debe deambular con la bata de trabajo fuera del laboratorio.
3. Hay que lavar la bata y el gorro independientemente de otra ropa.
4. Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente con hipoclorito diluido al 10 % y siempre que se produzca un derrame.
5. Es recomendable colocar una hoja de papel desechable en el área desinfectada, sobre la cual se ubican el mechero y los elementos de trabajo necesarios. La hoja se descarta al terminar el trabajo en la bolsa marcada *desechos biológicos*.
6. Es necesario informar inmediatamente sobre la ocurrencia de cualquier accidente como cortaduras y quemaduras. En caso de rompimiento de tubos con cultivos microbianos, cubrir los restos del tubo con hipoclorito

de sodio al 2 % o fenol al 5 %, tapar con una hoja de papel periódico y dejar sedimentar los aerosoles durante media hora, luego recoger el material, envolverlo en papel y llevarlo a esterilización antes de descartarlo.

7. En la zona de trabajo no deben colocarse materiales de escritorio, ni libros. Mantener el puesto de trabajo solamente con el material necesario.
8. Al utilizar el asa para siembras, debe calentarse el alambre de ferroníquel en toda su extensión, a la llama del mechero hasta que se ponga roja, este proceso debe realizarse antes y después del uso. El flameado o proceso de esterilización por incineración destruye cualquier forma de vida sobre la superficie del asa. **No mover el asa durante su calentamiento para evitar la formación de aerosoles** (Figura 1).

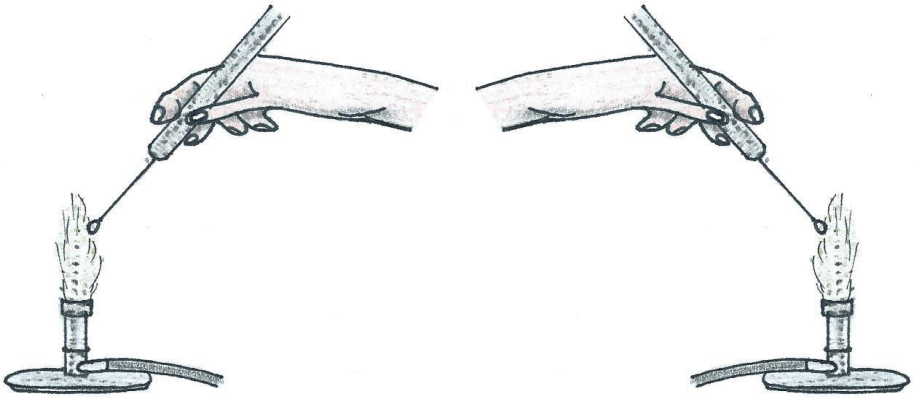


Figura 1. Uso del asa con la mano derecha e izquierda.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

9. Si se trabaja con tubos, se debe flamear la boca de estos después de quitarles el tapón y antes de volverlos a tapar, para evitar la formación de aerosoles o la contaminación del contenido del tubo. Durante las siembras, el tubo debe mantenerse en la mano izquierda y el tapón en la mano derecha, sostenido entre el dedo meñique y la palma de la mano, cerca de la llama del mechero, con esta misma mano debe cogerse el asa entre el dedo índice y el pulgar, o viceversa si es zurdo (Figura 2).

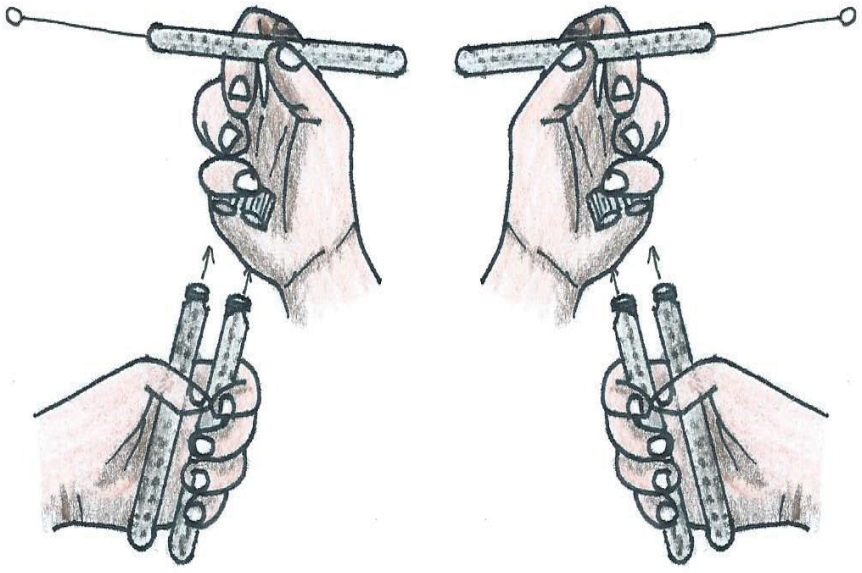


Figura 2. Manipulación de tubos taparroscas con la mano derecha e izquierda.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

10. Cuando se trabaja con cajas de Petri, estas se destapan manteniendo la base y la tapa simultáneamente en la mano izquierda, abriendo la caja parcialmente y cerca del mechero (Figura 3).

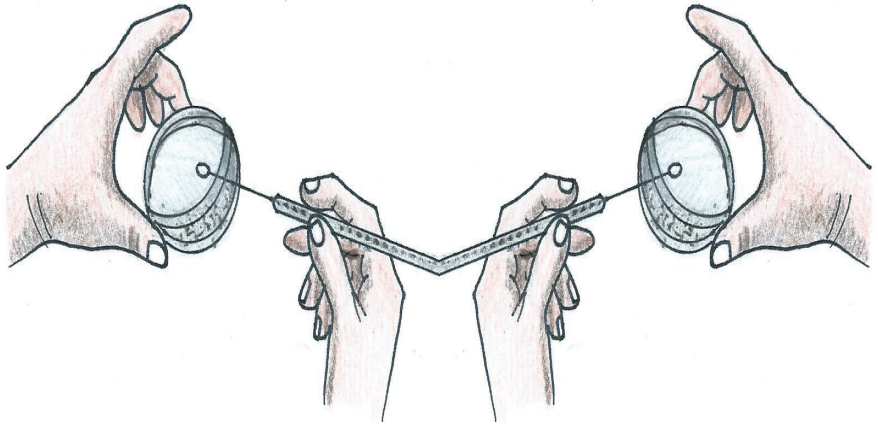


Figura 3. Manipulación de cajas de Petri con la mano derecha e izquierda.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

11. Pipetear aspirando con dispositivos adecuados y **nunca** con la boca directamente.
12. Una vez que se han utilizado los bajalenguas y escobillones, se deben descartar en solución de hipoclorito diluido al 10 %.
13. Al terminar el período de trabajo en el laboratorio: apague el mechero, descarte el material contaminado en las bolsas o recipientes destinados para tal fin, coloque los materiales en su puesto y limpie su área de trabajo.

Higiene

- Los estudiantes con el cabello largo deben llevarlo recogido.
- Evitar el uso de joyas durante el trabajo.
- Comer, beber, fumar y aplicarse cosméticos está totalmente prohibido en el área de trabajo de laboratorio, así como el almacenamiento de comida o bebida.
- Los estudiantes deben lavarse las manos frecuentemente durante las actividades rutinarias, antes y después de terminar el laboratorio y siempre antes de abandonar el laboratorio. Se usará un jabón antiséptico y el secado se realizará con papel desechable.

1.3 Cabinas de seguridad biológica (CSB)

Son cámaras de circulación forzada que, según sus especificaciones y diseño, proporcionan diferentes niveles de protección. Son fundamentales en un laboratorio de microbiología y se clasifican según el nivel y tipo de protección (OMS, 2005; Lammert, 2007).

Es necesario distinguir entre las campanas de extracción de gases, las cabinas de flujo laminar y las cabinas de seguridad biológica.

La campana de gases o cabina extractora de gases es un recinto ventilado que captura los humos y vapores procedentes de la manipulación de los productos químicos en el laboratorio. Si bien constituye un equipo muy útil en la contención del riesgo químico, no ofrece protección alguna frente a riesgos biológicos.

Las cabinas de flujo laminar se dividen en Cabinas de Flujo Laminar Horizontal y Cabinas de Flujo Laminar Vertical, son recintos que emplean un ventilador para forzar el paso del aire en forma vertical u horizontal a través de un filtro HEPA (High Efficiency Particulate Air). Estas cabinas brindan un flujo de aire limpio y sin turbulencias sobre al material que se maneja en su interior, pero nunca al operador.

Las cabinas de seguridad biológica CSB son recintos ventilados diseñados para limitar al máximo el riesgo del personal de laboratorio expuesto a agentes infecciosos. Ello es especialmente importante si se tiene en cuenta que muchas de las operaciones realizadas en un laboratorio implican la formación de aerosoles. Estos equipos tienen como objetivo principal proporcionar una zona de trabajo que disminuya la probabilidad de que una partícula transportada por el aire pueda escapar hacia el exterior de la cabina y contaminar así al operario y a la zona que le rodea. Además, algunas de ellas ofrecen protección al material que se manipula.

Las CSB disponen de dos sistemas que impiden la salida de contaminación: las barreras de aire y los filtros.

Las barreras de aire se crean permitiendo que este fluya en una sola dirección y a una velocidad constante, dando lugar a una verdadera "cortina" de aire que se conoce como flujo de aire laminar. Es, por definición, un flujo con ausencia de turbulencias.

El aire en las CSB (la velocidad del flujo de aire es de unos 0,38-0,40 m/s de la sala) penetra por el área frontal, atraviesa la zona de trabajo y sale todo al exterior (conducto de extracción), pasando previamente por un filtro HEPA. *Los filtros* tienen como finalidad atrapar las partículas contenidas en este flujo de aire y los empleados habitualmente son los HEPA, que retienen con una eficacia del 99,97 % partículas de hasta 0,3 micras de diámetro y el 99,99 % de las partículas de tamaño mayor o menor.

Las CSB se dividen en tres categorías: **clase I, clase II y clase III.**

Cabinas de clase I.. Son apropiadas para manipular agentes biológicos de los grupos 1 y 2. Su ventaja es que proporciona protección tanto personal como ambiental y puede utilizarse para trabajar con sustancias químicas tóxicas

volátiles, pero no previene la exposición por contacto a materiales peligrosos. La mayor desventaja que presentan es que no garantiza la protección, en caso de que se requiera, del producto manipulado Se recomienda para estas cabinas velocidades de entrada de aire, para aberturas frontales no superiores a 20 cm, de 0,4 m/seg como mínimo y no superiores a 1 m/seg (velocidades superiores a 1 m/seg dan lugar a turbulencias y posibles retornos con lo que disminuiría el grado de protección proporcionado por la cabina). El sistema de filtración HEPA en la extracción, puede estar o no acoplado a un sistema de extracción conectado al exterior. (Figura 4).

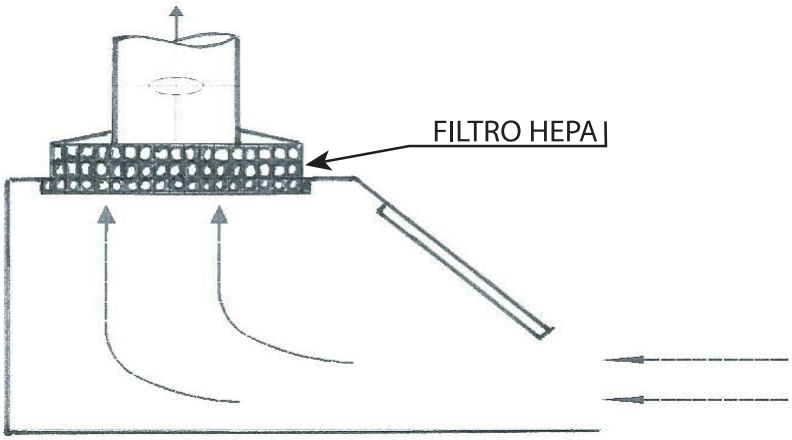


Figura 4. Cabina de bioseguridad clase I.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Cabinas de clase II. Son equipos válidos para el manejo de agentes biológicos de los grupos 1, 2, y en algunas ocasiones se incluyen el grupo 3, siempre que se utilicen trajes presurizados. Se diferencian principalmente de las de clase I en que, además de al operario y su entorno, ofrecen protección a la muestra frente a la contaminación. La superficie de trabajo está bañada por un flujo descendente de aire filtrado estéril (Flujo Laminar Vertical). La protección del trabajador se logra por la creación de una barrera de aire formada por la entrada de aire desde el ambiente, a través de la abertura frontal, y por el flujo descendente de aire filtrado estéril. El ventilador o ventiladores (algunas cabinas poseen un único ventilador para la extracción y la recirculación y otras, utilizan hasta tres ventiladores, dos para la recirculación y otro para la

extracción) fuerzan el paso del aire de la cabina y el que penetra por la abertura frontal, a través de rejillas situadas en la parte frontal y posterior del área de trabajo. Este aire es filtrado por un Filtro HEPA y reconducido a la parte superior de la cabina donde una parte del aire filtrado estéril es recirculado y otra parte es extraído a través de un sistema de filtración-purificación del aire, por otro ventilador que suele estar instalado en el exterior de la cabina. La ubicación de ventiladores y filtros debe asegurar que todas aquellas zonas del circuito de aire contaminado (no filtrado) se hallan a presión negativa, de modo que ante cualquier eventualidad el aire no pueda escapar al exterior de la cabina. El volumen de aire extraído es equivalente al tomado en la abertura frontal. (Figura 5).

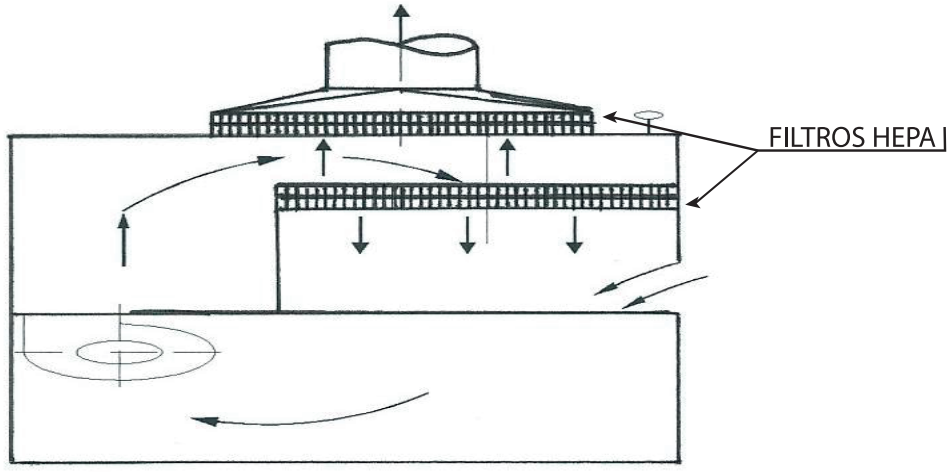


Figura 5. Cabina de bioseguridad clase II.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Existen varios tipos de cabinas de **clase II: A1, A2, B1, B2 y B3**, según sus características de construcción, aire recirculado, flujo de aire y sistema de extracción, velocidades de aire en la abertura frontal y sobre el área de trabajo. ***Cabinas de clase III.*** Protección ofrecida al operador, al producto y al ambiente y se utilizan para trabajar con agentes del grupo de riesgo 3 y 4. Son recintos herméticos con presión negativa (alrededor 124,5 Pa) y, por ello, su interior está completamente aislado del entorno. Se opera en ellas por medio de unos guantes, con trampa para introducir el producto, el aire es tomado del exterior y filtrado a través de un filtro HEPA. En su extracción (100%), suele haber

dos filtros HEPA montados en serie para la completa purificación del aire extraído (Figura 6).

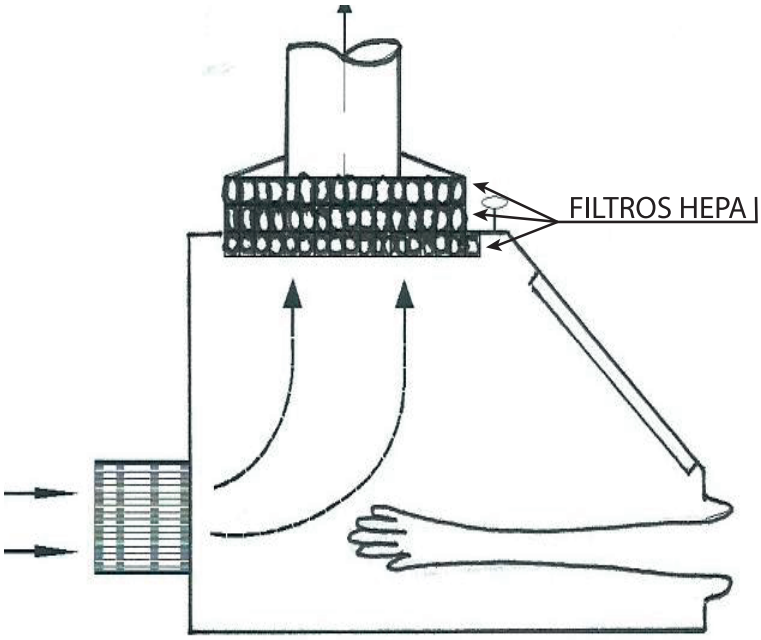


Figura 6. Cabina de bioseguridad clase III.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Capítulo 2

Morfología bacteriana

Objetivo

Mediante la utilización de coloraciones diferenciales y especiales, observar la morfología, la agrupación y algunas estructuras de la célula bacteriana.

Introducción

Por lo general, las bacterias y otros microorganismos son transparentes, lo que dificulta el estudio de los detalles morfológicos cuando se los examina en su estado natural. Los primitivos métodos de fijación y coloración iniciados por Paul Ehrlich y Robert Koch permitieron distinguir detalles estructurales como la presencia de pared (Perry & Staley, 1999)

En general, se aconseja que se utilicen cultivos de 15 a 24 horas de crecimiento para los métodos de coloración de rutina, salvo que se trate de microorganismos que tengan un tiempo de generación muy prolongado.

La coloración de las bacterias tiene como fines (Bailey, 2009).:

- Poder visualizarlas para determinar formas y agrupaciones bacterianas.
- Revelar la presencia de distintas estructuras, como esporas y cápsulas de algunos géneros.
- Diferenciar grupos bacterianos por su reacción frente a determinados colorantes.

2.1 Descripción microscópica de bacterias

Forma

✓ Los principales tipos de formas bacterianas son:

- ***Cocos:***(células esféricas).
- ***Bacilos:*** (en forma de bastón, alargados), que a su vez pueden tener **varios aspectos y extremos**:

Según aspecto:

- Cilíndricos.
- Fusiformes.
- En forma de maza

Según tipos de extremos:

- Redondeados (los más frecuentes).
- Cuadrados.
- Biselados.
- Afilados.

- ***Helicoidales: (vibrio, espirilo, espiroqueta)***

- *Vibrios:* bacterias curvas (en forma de coma). *Vibrio, Campylobacter, Helicobacter*
- *Espirilos:* bacterias que poseen una configuración helicoidal rígida, semejante a la de un tirabuzón. Se desplazan con la ayuda de apéndices externos llamados flagelos. *Brachispira, Spirillum volutans, Aquaspirillum gracile, Aquaspirillum fasciculus.*
- *Espiroquetas:* helicoidales y flexibles. Se desplazan mediante filamentos axiales que se asemejan a los flagelos, pero están rodeados por una vaina externa flexible. *Treponema palidum, Leptospira interrongans, Borrelia recurrentis,*

Otros tipos de formas:

- Bacterias filamentosas, ramificadas o no. Filo Actinobacteria: géneros *Actinomyces*, *Frankia, Micromonospora, Nocardia*, *Streptomyces*, *Propionibacterium*. Filo Chloroflexi, donde se clasifican bacterias verdes del azufre como *Chloroflexus sp*.

- Bacterias en forma de estrella. *Stella vacuolata.*
- Bacterias en forma triangular. *Haloarcula japonica* en ciertos estadios de su ciclo celular presenta una forma triangular.
- Bacterias planas y rectangulares. *Haloquadratum walsbyi*
- Bacterias en forma de una *i griega*. *Pyrodictium abyssi*
- Bacterias que forman varios tipos de extrucciones plasmáticas: (apéndices no celulares) prostecas, tallos o pedúnculos. Las prostecas son apéndices filiformes derivados de la pared, que están relacionados con la reproducción, la adhesión a sustratos inertes, flotabilidad de las bacterias, mayor superficie para la captación de nutrientes en ambientes oligotróficos. *Caulobacte*r, *Hyphomicrobium*. *Hyphomonas, Ancalomicrobium, Prosthecomicrobium,* y *Stella*. Los tallos o pedúnculos es una extensión del citoplasma, contiene citoplasma rodeado de membrana celular y membrana plasmática con un disco adhesivo (botones de anclaje) localizado en su extremo. *Gallionela* y *Planctomyces:*
- Bacterias con yemas: microorganismos en forma alargada o de pera, producen una yema al final de la prosteca al reproducirse por gemación. *Hyphomicrobium* y *Rhodomicrobium.*
- Pleomórficas: este término hace referencia a algunos géneros que pueden variar la forma, pero la mayor parte de las bacterias mantienen constante su forma. *Arthrobacter* es un ejemplo de pleomorfismo debido a que su forma cambia en función del tiempo del cultivo, otros géneros son *Corynebacterium* y *Rhizobium.*

  También exhiben pleomorfismo aquellas bacterias que no poseen pared celular, como es el caso de los *Micoplasmas.* Otro ejemplo son las formas L, que son bacterias que carecen de pared celular debido a una situación de estrés (choque térmico u osmótico, antibióticos, etc.), pero cuando cesa el estrés, sintetizan de nuevo la pared celular. Sin embargo, el pleomorfismo no suele ser lo más frecuente.

Cápsula

Algunas células bacterianas están rodeadas por una capa que toma forma de cápsula o cubierta mucilaginosa o capa mucosa o glicocálix. Esta estructura está compuesta por polisacáridos (levanos, dextranos, celulosa) y en menor proporción polipéptidos.

Materiales de reserva o inclusiones orgánicas e inorgánicas

Dependiendo de las condiciones ambientales y nutricionales, los microorganismos pueden almacenar diversas substancias como materiales de reserva. Estos gránulos se depositan uniformemente por todo el citoplasma y no están rodeados por una membrana.

Esporas

Algunos géneros bacterianos *Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus* (BG+), *Anaerobacter* (BG+), *Alicyclobacillus* (BG+ o Gram variable), *Desulfotomaculum* (BG+), *Sporomusa* (BG-), *Thermoactinomyces (T. vulgaris),* filamentoso G+, *Sporosarcina* (CG+), *Sporohalobacter* (CG+), *Syntrophospora* (CG variable), *Heliobacterium* y *Heliophilum, (*Gram-positivas, pero se tiñen como Gram-negativas*)* tienen la capacidad de producir formas en estado de dormancia, o formas latente o de reposo (y no formas reproductivas), de alta resistencia (calor, radiaciones, agentes químicos, etc.) denominadas endosporas. Estas son cuerpos altamente refringentes de formas esféricas, subesféricas u ovales, formados dentro de la célula vegetativa (uno por célula), al final del crecimiento exponencial. Con ubicación central, terminal o subterminal, que puede abultar la célula o no hacerlo (Harvey et al 2008; Bailey, 2009: Maier 2009).

2.1.1 Frotis, coloraciones diferenciales y especiales

En general existe la siguiente clasificación para las coloraciones:

- Simple: uso de un solo colorante. Ejemplo: azul de metileno, violeta de genciana, etc.
- Diferencial o compuesta: Gram, Ziehl-Neelsen.
- Especial: cápsula, esporas, flagelos.

Coloración diferencial o compuesta

Coloración de Gram:

Es el método de tinción más ampliamente utilizado en bacteriología. Fue desarrollado por el médico danés Hans Christian Gram en 1884, y permite distinguir entre diferentes bacterias que pueden mostrar una morfología similar.

Mecanismo de la tinción de Gram: aunque se han propuesto varias explicaciones sobre el fundamento de la tinción de Gram, parece probable que la diferencia entre las bacterias Gram negativas y Gram positivas se deba a la naturaleza física de las paredes. El peptidoglicano no se tiñe apropiadamente, más bien parece que actúa como barrera de permeabilidad para evitar la pérdida de cristal violeta. Si la pared celular se elimina en las bacterias Gram positivas, estas se convierten en Gram negativas (Prescott, Harley & Klein, 1999).

El proceso incluye cuatro etapas (Talaro, 2005):

Tabla 1. Reacciones de la bacteria durante la coloración de Gram

Compuestos	**Frotis de muestra mixta** (Bacterias Gram positivas y Gram negativas)	
Cristal violeta (CV) Colorante básico	**Bacteria violeta**	**Bacteria violeta**
Lugol: fijador solución yodo (I) yoduro (ayuda a la retención del colorante)	- Se forma el complejo **CV+I** - BACTERIA VIOLETA (SE OBSERVA MÁS OSCURA, A VECES NEGRA)	- El yodo no tiene efecto - BACTERIA VIOLETA
Alcohol- acetona Decolorante	Contrae los poros de la gruesa capa de peptidoglicano **El complejo CV+I no es eliminado** - **Bacteria violeta**	Capa de peptidoglicano es muy fina **y es probable** que suceda una extracción de los lípidos de la membrana externa (o *outer membrane*) de la pared y se aumente la porosidad **- Bacteria incolora**
Fucsina básica Colorante de contraste	- No tiene efecto el colorante - **Bacteria violeta**	- Se tiñe la bacteria - **Bacteria rosada**

Coloración para bacterias acidorresistentes (Ziehl Neelsen):

Los géneros *Corynebacterium*, *Nocardia* y, en especial *Mycobacterium*, presentan una pared celular muy compleja, con abundancia de lípidos (algo excepcional entre las Gram-positivas). Estas bacterias, una vez que se han teñido con fucsina (forzando mediante calentamiento de la preparación), tienen resistencia a decolorarse por una mezcla de ácido clorhídrico al 3 % en etanol de 96º. Por ello se denominan bacterias ácido-alcohol-resistente. Esta propiedad depende esencialmente de la presencia en su pared celular de unos lípidos llamados ácidos micólicos, que oscilan en un 40 % del peso seco de la

bacteria (lípidos complejos, ácidos grasos y ceras), unidos en su mayor parte a proteínas y polisacáridos.

Coloraciones especiales

1. Tinción de cápsula:

- La cápsula de las bacterias no tiene la misma afinidad por los colorantes que otros componentes de la célula, y por eso exige el empleo de métodos de coloraciones especiales.
- Se utilizan tinciones de contraste de fondo, donde el fondo toma generalmente un color oscuro y la cápsula se observa refringente, por su composición de mucopolisacáridos.
- Coloración de Anthony: colorea la célula y el fondo, pero no la cápsula, de manera que la cápsula se aprecia por contraste.
- Coloración de la tinta china o rojo congo: usa el principio de la coloración negativa, en el cual se ve la cápsula como un halo claro contra un fondo oscuro.

Coloración de gránulos metacromáticos:

- Se utilizan dos métodos: la coloración con azul de metileno y la coloración de Albert.
- Coloración de Albert: los gránulos aparecen de color azul oscuro, y el citoplasma verde
- Coloración de azul de metileno: los gránulos se observan de un color azul intenso.

Coloración de esporas o endoesporas:

- En el método de coloración de Gram aparecen como cuerpos refráctiles no coloreados.
- Por lo general, en los métodos especiales de coloración se requiere del calor para permitir la penetración del colorante en las esporas.
- Coloración de Wayson: el azul de metileno que contiene el colorante tiñe la parte vegetativa de la bacteria.
- Otras coloraciones para la observación de endosporas son: verde de malaquita (método de Shaeffer-Fulton), Dorner, Moeller.

Materiales

Cepa de *Klebsiella* sp

Cepa de *Bacillus* sp

Cepa de *E. coli*

Cepa de actinomicetos

Solución salina estéril al 0.85 % o agua destilada

Asas bacteriológicas

Láminas portaobjetos

Portaobjeto con excavación

Pipetas Pasteur

Coloración de Gram

Tinta china o rojo congo

Verde de malaquita

Azul de metileno

Aceite de inmersión

Vaselina o parafina

Microscopio óptico

Procedimientos

Coloración de Gram

Preparación del frotis o extendido:

1. Medio de cultivo líquido: se recoge por medio de un asa el cultivo de la muestra líquida y se extiende sobre el portaobjetos. Dejar secar a temperatura ambiente.
2. Medio de cultivo sólido: servir una gota de agua destilada o solución salina al 0.85 %, tomada con un asa sobre un portaobjeto, luego tomar una colonia y colocarla sobre la gota y hacer un extendido.

Nota: para obtener mejores resultados, la película debe ser homogénea. En ningún caso la mezcla o el extendido se hará enérgicamente, pues esto tiende a destruir la disposición característica de las bacterias, como las cadenas estreptocócicas y otras agrupaciones.

3. Se deja secar el extendido, se fija por medio de calor pasándolo suavemente por la llama del mechero para que las células se adhieran al portaobjetos. Debe evitarse el recalentamiento ya que ocasiona deformaciones.

Nota: cuando se va a examinar un gran número de colonias, se harán varios pequeños extendidos en un mismo portaobjetos, en secciones demarcadas por medio de un marcador de vidrio.

4. Realizar la coloración de Gramen el siguiente orden:

- Cristal violeta – 1 minuto. Lavar.
- Lugol – 1 minuto. Lavar.
- Alcohol acetona – 10 a 13 segundos. Lavar.
- Fucsina – 1 minuto. Lavar y dejar secar.

5. Enfoque la preparación en 10 X, agregar una gota de aceite de inmersión a la preparación y observar con el objetivo de 100 X.
6. Observar tinción, forma y agrupación (comparar con las figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13) y complete la tabla de resultados (Tabla 2).

Forma: cocos



Figura 7. Forma cocos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Agrupación de los cocos: parejas (diplococos), grupos de cuatro (tétradas), en cadenas (estreptococos), paquetes de ocho a sesenta y cuatro células (sarcina), grupos irregulares (micrococos, estafilococos)

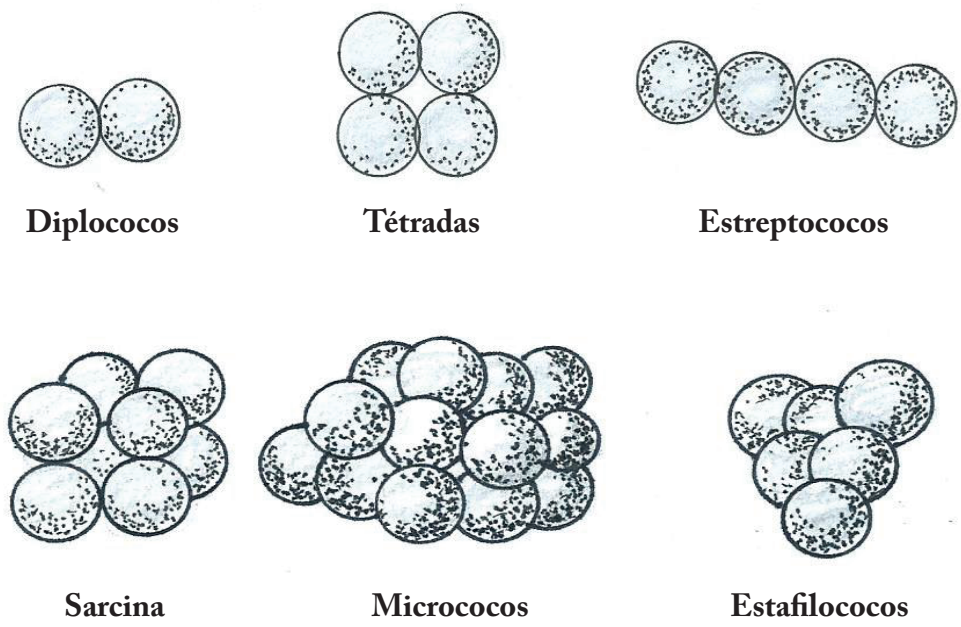


Figura 8. Agrupaciones de los cocos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Forma: bacilos

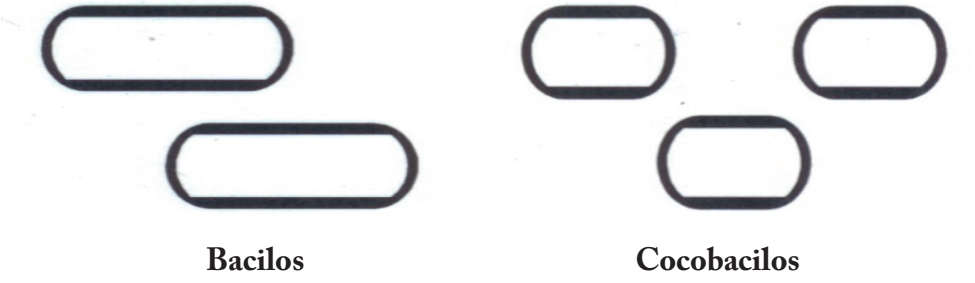


Figura 9. Forma bacilos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Agrupación de los bacilos: parejas (diplobacilos), cadenas (estreptobacilos), formas irregulares [en empalizada o en paquetes de cigarrillos (debido a giros de 180º) dos bacilos en ángulo (en forma de letra V o L) varios bacilos formando "letras chinas" (ej. género Corynebacterium)]



Diplobacilos **Estreptobacilos** **Formas irregulares**

Figura 10. Agrupación de los bacilos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

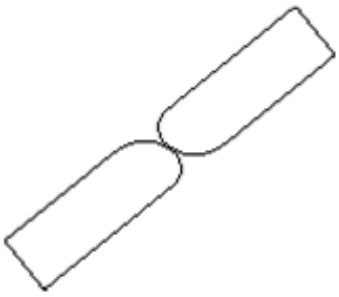
Bacilos según tipo de aspecto y extremos



Bacilos cilíndricos con extremos redondeados



Bacilos en forma de maza con bordes redondeados



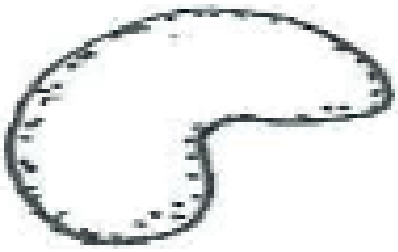
Bacilos cilíndricos con extremos cuadrados



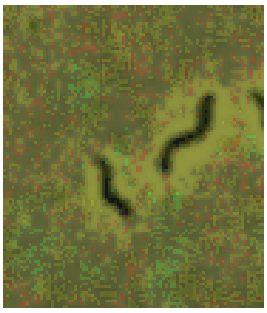
Bacilos fusiformes con bordes afilados

Figura 11. Aspectos y extremos de los bacilos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Forma: helicoidales

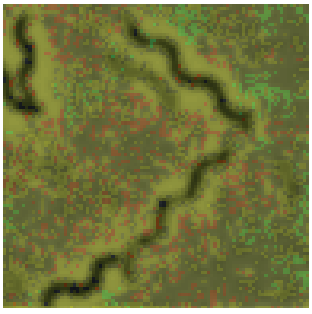


Vibrio



Espirilo

Figura 12. Formas helicoidales.
Fuente: Aura Lizarazo Forero



Otras formas: filamentosas



Figura 13. Formas filamentosas (1000x)
Fuente: autora

Tabla 2. Tabla de resultados

		Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5
Morfología macroscópica: Pigmento(morfología macroscópica)						
Tinción	Gram positivas					
	Gram negativas					
	Gram variables					
Forma	Cocos					
	Bacilos					
	cocobacilos					
	Vibrios					
	Espirilos					
	Filamentosas					
Agrupación						
Cocos	Diplococos					
	Tétradas					
	Estreptococos					
	Sarcina					
	Micrococos					
	Estafilococos					
Bacilos	Diplobacilos					
	Estreptobacilos					
	Empalizada o en paquetes de cigarrillos					
	Letras V o L, “letras chinas					

Tinción de cápsula

Tinta china:

1. Coloque una gota pequeña de tinta china o nigrosina sobre el portaobjeto.
2. Tome con un asa previamente estéril, una gota del cultivo líquido de *Klebsiella* sp y deposítelo sobre la gota de tinta china.
3. Mezcle bien la preparación y extiéndala sobre una superficie de 1 cm.
4. Dejar secar y fije brevemente con calor.
5. Cubra el frotis con safranina por 15 segundos.
6. Lave y deje secar.
7. Examine al microscopio: observar la cápsula como un halo transparente sobre fondo oscuro. La bacteria se percibe de un color rosa (Figura 14).

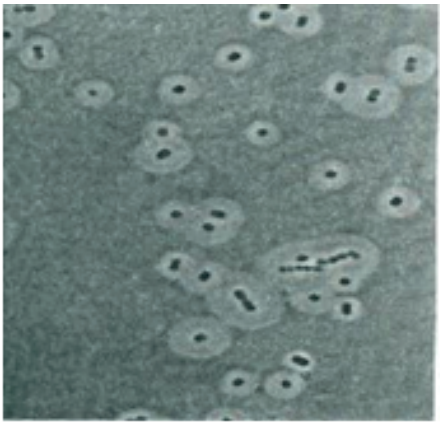


Figura 14. Coloración de cápsula con tinta china.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Coloración rojo Congo:

1. Emulsionar la muestra con una gota de rojo congo.
2. Dejar secar a temperatura ambiente.
3. Sumergir un segundo en HCL 1N.
4. Poner azul de metileno por 3 minutos.
5. Lavar con agua.

Tinción de esporas

Coloración verde de malaquita (Método de Shaeffer Fulton)

1. Tome con un asa previamente estéril, una gota del cultivo líquido de *Bacillus* sp y deposítelo sobre la lámina.
2. Dejar secar y fije con calor.
3. Cubra el frotis con verde de malaquita y pase un mechero por debajo de la placa hasta obtención de vapores (no permita que hierva el colorante).
4. Lave con agua corriente.
5. Cubra con cristal violeta por un minuto.
6. Lave y deje secar.
7. Examine al microscopio: observará la parte vegetativa de color violeta y la espora como cuerpos con bordes verde.

Coloración con azul de metileno (Método de Wayson)

1. Tome con un asa previamente estéril, una gota del cultivo líquido de *Bacillus* sp y deposítelo sobre la lámina
2. Dejar secar y **fije con calor**
3. Cubra el frotis con azul de metileno durante un minuto
4. Lave con agua corriente
5. Lave y deje secar
6. Examine al microscopio: Observara la parte vegetativa de color azul y la espora como cuerpos refráctiles no coloreados. Comparar con la siguiente Figura 15

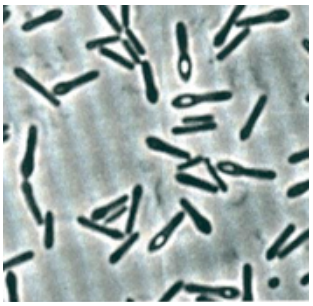


Figura 15. Coloración de esporas con azul de metileno
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Observación de la movilidad

Método de la gota suspendida o gota pendiente

1. Prepare un cubreobjeto realizando un círculo con vaselina o parafina
2. Con una pipeta Pasteur coloque una gota muy pequeña de la suspensión bacteriana sobre el círculo del cubreobjeto
3. Sobre el cubreobjeto se coloca un portaobjeto con una excavación central que queda adherido gracias a la vaselina
4. Invierta la preparación y colóquela en la platina del microscopio
5. Observe la gota suspendida con aceite de inmersión en 100X

2.1.2 Uso y manejo del microscopio óptico

Objetivo

Familiarizarse con el uso correcto del microscopio óptico y esteroscopio para la observación de las preparaciones teñidas.

Introducción

Un microscopio es un juego de lentes de aumento que permite observar objetos de tamaño no visible a simple vista. Además del aumento o magnificación, debe tener poder de resolución, de definición y profundidad de campo (Heritage, 1996).

El poder de aumento o magnificación: permite magnificar la imagen, es característica de las lentes de los objetivos y del ocular y es independiente del poder de resolución. Ejemplo: un ocular de 10x y un objetivo 10x dan un aumento total de 100 diámetros.

El poder de resolución: nos permite distinguir dos objetos muy vecinos uno de otro. Mientras menor sea la distancia que pueda medirse entre dos puntos en un campo microscópico, mayor es el poder de resolución. Este poder de resolución depende, a su vez, de la longitud de onda y de la apertura numérica del objetivo (es la relación del ángulo de apertura de los rayos de luz provenientes

de la fuente con el índice de refracción. También se define la capacidad de recolección de luz y poder de resolución (a una distancia fija) de un objetivo). Los microscopios no permiten la resolución de objetos de tamaño inferior a la mitad de la longitud de onda de la luz utilizada, por ejemplo un microscopio con longitud de onda de 500 nm, Un buen microscopio debe tener un poder de resolución de cerca de 200 nm (0.2 μm).

Poder de definición: permite formar imágenes claras con contornos definidos.

Profundidad de campo: permite observar varios planos de una preparación, sin variar la posición del enfoque (Avers, 1981; Madigan, Martinko & Parker, 2004).

Partes del microscopio

Un microscopio está compuesto por dos partes: una mecánica y una óptica.

Partes mecánicas

Las partes mecánicas están constituidas por:

- *Pie o soporte*: es la base donde descansan las otras partes del microscopio.
- *Brazo:* soporta todo el sistema óptico, se acopla al soporte y es la parte por donde debe agarrarse el microscopio cuando se le traslada de un sitio para otro.
- *Platina*: es la pieza donde se colocan las preparaciones para ser observadas, tiene un orificio por donde pasa la luz para iluminar las preparaciones.
- *Revólver*: sirve de soporte a los lentes u objetivos. Tiene movimiento circular para permitir el acople del objetivo deseado.
- *Carro o escuadra*: se encuentra sobre la platina y sirve para sujetar y mover el portaobjeto.
- *Tornillo macro y micrométrico*: es una rueda de bordes dentados que sube o baja el tubo que soporta las lentes u objetivos, o sube la platina, dependiendo del modelo. El tornillo macro sirve para desplazar distancias mayores y el tornillo micro para distancias imperceptibles a la vista, se utiliza para enfoques más nítidos.

- *Tornillo del condensador*: se emplea para graduar la iluminación del campo microscópico.

Partes ópticas

- *Ocular*: es la lente colocada en la parte superior y aumenta a manera de lupa la imagen real proyectada por el objetivo y permite que sea percibida por el ojo. Lleva grabado el número de aumento.
- *Objetivos*: van colocados en el revólver. Son varios, de acuerdo con su aumento proporcionan una imagen real e invertida y aumentada.

Tipos de objetivos:

- *De menor aumento: 4x o 10x*: se usa para ubicar la imagen. Con este objetivo se logra un campo microscópico mayor y por tanto el objeto puede localizarse más fácilmente que con los otros objetivos.
- *De mayor aumento: 40x, 43x, 45x, 60x*: permite un mayor aumento del objeto, aunque abarca un menor campo microscópico.
- *Objetivo de inmersión: 100x, 91x, 97x*: con este objetivo se logra el mayor aumento posible, aunque requiere de una mayor iluminación del campo microscópico y del empleo de aceite de inmersiónque se coloca entre él y la preparación, con el fin de reducir la refracción de los rayos luminosos.
  - *Condensador:* con un sistema de lentes convergentes que permiten concentrar los rayos luminosos en el campo microscópico.
  - *Diafragma*: se encuentra en la parte inferior del condensador o incorporado a este y permite ajustar la cantidad de luz que llega a la preparación.

Manejo del microscopio

Preparaciones teñidas (coloración de Gram, rojo Congo, tinta china, verde de malaquita)

1. Coloque la preparación teñida. Al colocarla verifique que la superficie de la preparación quede hacia arriba, es decir, mirando el objetivo.
2. Sitúe el objetivo de menor aumento (4x o 10x). Ilumine la preparación acercando el condensador a la platina y con el diafragma abierto. Enfoque acercando la preparación con el macrométrico.

Uso del objetivo de inmersión

1. Una vez ejecutado los pasos anteriores, se gira el revólver hacia el objetivo de inmersión pero dejándolo a medio camino, coloque la gota de aceite de inmersión sobre el punto de luz. Termine de girar suavemente el revólver hasta el objetivo de inmersión, teniendo la precaución de no tocar la preparación, pero sí la gota de aceite.
2. Si se ha hecho un buen enfoque primero en 4x o 10x, debe observarse inmediatamente al pasarlo al objetivo de 100x. De no ser así, pase al objetivo de 4x o 10x, y proceda a enfocar nuevamente.
3. Nunca retire la preparación con el objetivo de inmersión (100x), hágalo colocando el objetivo de menor aumento (4x o 10x).
4. Al terminar la jornada, limpie siempre los objetivos y todo el microscopio. El objetivo de 100x debe limpiarse con una solución de alcohol o xilol.

Preparaciones frescas (azul de lactofenol)

1. Coloque la preparación sobre la platina.
2. Sitúe el objetivo de menor aumento (4x o 10x), disminuya la iluminación bajando el condensador y con el diafragma abierto. Enfoque acercando la preparación con el macrométrico.
3. Gire al objetivo 40x y observe

Trabajo de laboratorio:
Escriba las diferentes partes del microscopio en la Figura 16.

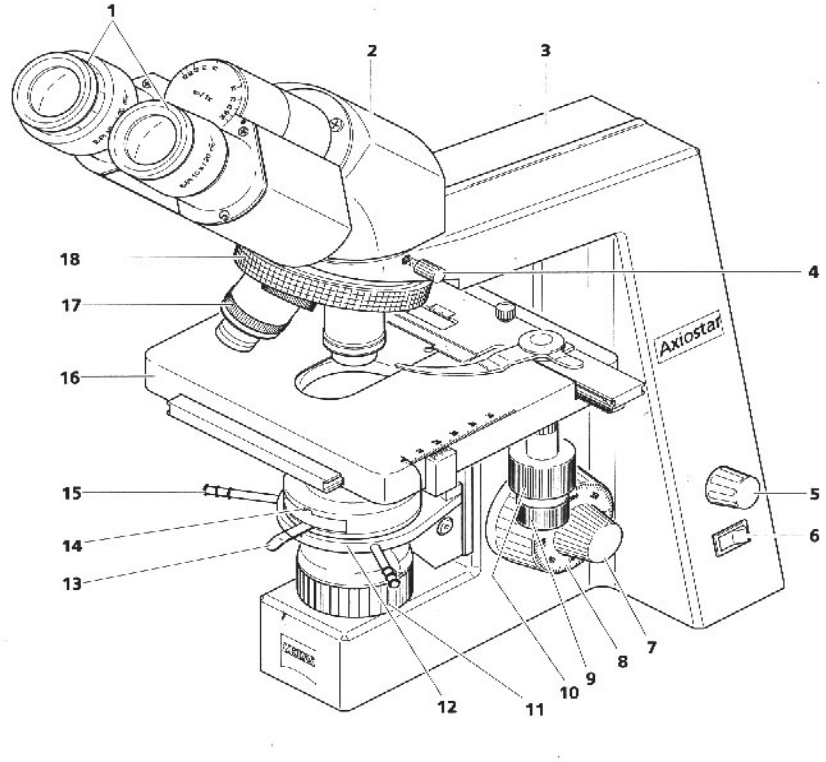


Figura 16. Microscopio óptico.
Fuente: manual del equipo marca Carl Zeiss® del Laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

2.2 Descripción macroscópica de colonias de bacterias

Objetivo

Observar el crecimiento bacteriano estudiando las características de las colonias.

Introducción

Para realizar una descripción macroscópica de bacterias, se deben tener en cuenta los siguientes parámetros: *pigmento, elevación, borde o margen, aspecto, consistencia, olor* (Park, 2005; Pollack et al., 2005).

*Pigmento:*amarillo, blanco, negro, gris, rojo, violeta, verde etc.
Elevación: (Figura 17)
No elevada: plana.
Elevada: convexa, umbilicada, mamelonada, papilar.

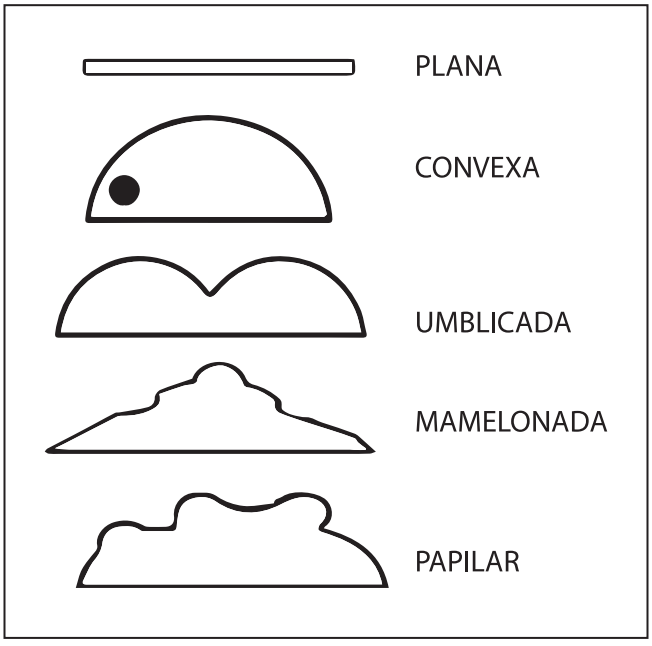


Figura 17. Elevación.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Borde o margen:(Figura 18)
Regular: continuo.
Irregular: dentado, lobulado, filamentoso.

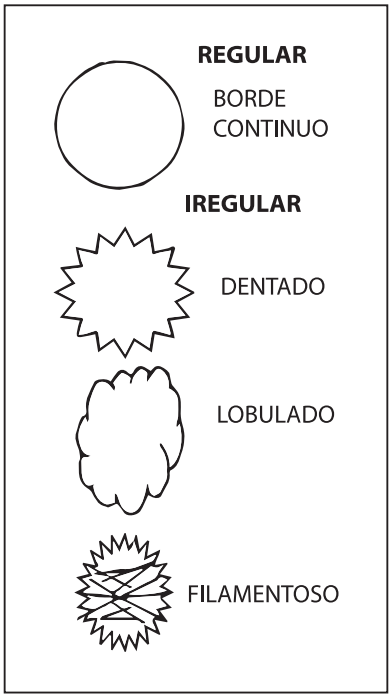


Figura 18. Borde.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Aspecto:

Brillante o translúcida.

Mate u opaca.

Consistencia:

Blanda.

Dura.

Mucoide (Figura 19).

Olor:

Aromático, pútrido, alcohólico, etc.

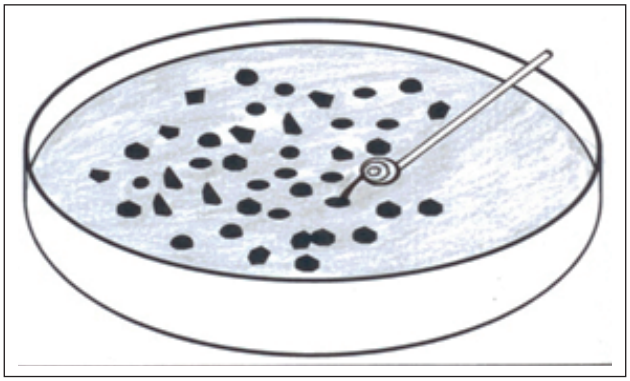


Figura 19. Consistencia mucoide.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales

Medios de cultivo con crecimiento
Asas bacteriológicas
Mecheros

Procedimiento

Observar y describir la morfología macroscópica de las colonias de bacterias que crecieron en los medios de cultivo y completar el siguiente cuadro:

Morfología macroscópica		**Colonia 1**	**Colonia 2**	**Colonia 3**	**Colonia 4**	**Colonia 5**
Pigmento						
Morfología microscópica						
Elevación: No elevada **Elevada**	Plana					
	Convexa					
	Umbilicada					
	Mamelonada					
	Papilar					
Borde: **Regular** **Irregular**	Continuo					
	Dentado					
	Lobulado					
	Filamentoso					
Aspecto	Brillante					
	Opaco					
Consistencia	Blanda					
	Dura					
	Mucoide					

Capítulo 3

Distribución de los microorganismos en el ambiente

Objetivos

- Reconocer la ubicuidad de los microorganismos en varios ambientes.
- Adquirir habilidad para muestrear microorganismos del ambiente y de las superficies.

Introducción

Debido a que los microorganismos son extraordinariamente pequeños e invisibles, su presencia en el medio ambiente frecuentemente pasa desapercibida, sin embargo, la vida microbiana es de una importancia considerable para la función del ecosistema (Harvey et al., 2008).

En el ambiente natural es muy raro que los microorganismos se encuentren aislados, en realidad la población normal de un hábitat (suelo, agua, drenajes, etc.), abarca un gran número de especies microbianas diferentes, todas las especies que se desarrollan en una región son características de ese ambiente.

Cualquier estudio de los microambientes requiere el empleo del microscopio para observar la muestra donde se desarrolla el microorganismo. Lo ideal, sin embargo, es tratar de aislarlos en los medios de cultivo, con el fin de poderlos identificar.

Aplicaciones

Muestreo de equipos y utensilios

Se puede realizar por varios métodos (Salyers & Whitt, 2001; Maier, 2009). La selección del método de muestreo debe estar en función de las características de la superficie a muestrear.

a) Enjuagado: Se utiliza para superficies vivas (manos) y para objetos pequeños o para el muestreo de superficies interiores de envases, botellas, bolsas de plástico, etc.

El método consiste en realizar un enjuague (botellas, frascos, similares) o inmersión (manos, objetos pequeños) en una solución diluyente o medio de cultivo o de buffer, el cual es sometido posteriormente al análisis microbiológico.

b) Contacto de superficie: Método del hisopo: Se utiliza para superficies inertes regulares e irregulares, tales como tabla de picar, bandejas, mesas de trabajo, utensilios, cuchillas de equipos, cortadora de embutidos, cortadora de pan de molde, fajas transportadoras, tolvas, mezcladoras, pisos, paredes y otros. consiste en deslizar un hisopo embebido en buffer por un área determinada del equipo y posteriormente descargar el hisopo en un volumen medido de diluyente, el cual es analizado. Este método es recomendado para zonas de difícil acceso, en cambio para áreas planas se aconseja el contacto directo de la superficie por analizar con una placa RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact Plates), con agar nutritivo y se expresa el resultado por área total muestreada.

También pueden emplearse esponjas estériles, se utiliza preferentemente para muestrear superficies de mayor área. (humedecidas en suero fisiológico u otro diluyente) que se pasan por la superficie y luego la esponja es inoculada en un caldo (si se realiza una búsqueda) o se diluye en un volumen medido de suero fisiológico y se realiza el recuento de esta solución para expresar finalmente el resultado por unidad de superficie muestreada.

c) Inmersión: los utensilios se sumergen en un volumen determinado de diluyente y se determina el número de microorganismos por unidad.

Muestreo de aire

a) Sedimentación: se exponen placas de agar durante 15 minutos a 2 horas, dependiendo de la contaminación del área por analizar. Se detectan solo los microorganismos que están adheridos a partículas sedimentables.

b) Impacto: se hace pasar un volumen determinado de aire mediante aplicación de vacío y el aire impacta sobre la superficie del medio de cultivo. También existen equipos que permiten el pasaje del aire a través de una serie de tamices que retienen distintos tamaños de partícula. Los tamices son incubados sobre agar y se puede determinar el número de microorganismos asociados a partículas de distinto tamaño.

c) Impregnación de líquidos: son muestreadores de impactación en medio líquido (*Borboteo o impigement*). El aire es aspirado a través de una entrada curvada que simula el tracto respiratorio superior y las partículas impactan en un volumen conocido de líquido de captación, empleándose normalmente agua desmineralizada, tampón fosfato salino o agua peptonada. Con el fin de preservar la viabilidad de los microorganismos, se le añaden aditivos como proteínas, antiespumantes y anticongelantes. Posteriormente el líquido de captación puede analizarse empleando diversas técnicas, como cultivo, microscopía, así como ensayos para determinar componentes, productos, o metabolitos microbianos.

Materiales

Cajas de Petri con medios de agar nutritivo

Tubos con caldo nutritivo

Escobillones o hisopos estériles

Equipo impactador Merck® (demostración)

Procedimiento

1. Marque tubos y cajas especificando nombre del medio, lugar, hora, fecha, tipo de muestra.

2. Exponga dos de los medios de cultivo sólido (siembra por sedimentación) durante 20 minutos en el lugar designado por el docente.
3. Humedezca un escobillón en caldo nutritivo y frote una superficie cualquiera dentro del área designada, introduzca el hisopo de nuevo dentro del caldo.
4. Incubar a 37 ºC por 24 a 48 horas tanto las cajas como los tubos.

Capítulo 4

Metabolismo bacteriano

4.1 Medios de cultivo

4.1.1 Tipos de medios de cultivo, preparación y esterilización

Objetivos

- Adquirir habilidad para preparar, esterilizar y envasar un medio de cultivo.
- Reconocer la importancia de la selección y preparación adecuada de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y cultivo de los microorganismos.

Introducción

Comercialmente se dispone de muchos medios de cultivo deshidratados, que son estables y se adaptan perfectamente a su empleo al laboratorio de diagnóstico. Los componentes habituales de los medios de cultivo son: extractos, peptonas, fluidos corporales (por ejemplo, sangre, suero), agar-agar, sistemas amortiguadores, indicadores de pH, agentes reductores y agentes selectivos (Parés & Juàrez, 1996; Wheelis, 2008).

Tabla 3. Nutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo

	Forma habitual del nutriente en el ambiente		**Forma química utilizada en medios de cultivo**
Elemento aportado	**Formas inorgánicas**	**Formas orgánicas**	-Glucosa, malato, acetato, piruvato. -Otros compuestos o mezclas: extractos de levadura, extractos de carne, peptona, triptona, caseína, gelatina
Carbono (C)	-CO_2 del aire. -CO_3^{-2} en rocas y sedimentos.	-Compuestos Orgánicos	
Nitrógeno (N)	-N_2 del aire. -NH_3 ,NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+ en suelos y agua.	-Compuestos orgánicos nitrogenados	-Inorgánicos: NH_3,NO_3,N_2,NH_4CL $(NH_4)_2SO_4$,KNO_3, N_2, -Orgánicos: aminoácidos bases nitrogenadas de nucleótidos. -Otros compuestos orgánicos que contienen mezclas: extractos de levadura, extractos de carne, peptona, triptona, caseína, gelatina
Oxígeno (O)	-O_2 del aire. -Ciertos óxidos -Agua	-Compuestos orgánicos	-Agua -Compuestos orgánicos
Hidrógeno (H)	-Agua. -H_2 como gas. -En depósitos minerales.	-Compuestos orgánicos	-Agua -Compuestos orgánicos
Fósforo (P)	-En depósitos minerales (PO_4^{-3}, KH_3PO_4)		-KH_2PO_4 -Na_2HPO_4
Sulfuro (S)	-En depósitos minerales, sedimentos orgánicos (SO_4^{-2}, H_2S, S) -Sulfuros metálicos (FeS, CuS, ZnS, NiS, etc.)	-Compuestos Orgánicos azufrados	-Na_2SO_4 -H_2S -$Na_2S_2O_3$ -Na_2S
Magnesio (Mg)	-En depósitos minerales, sedimentos geológicos ($MgSO_4$)		-$MgCL_2$. -$MgSO_4$
Sodio (Na)	-En depósitos minerales, océanos (NaCL, NaSi)		-NaCl
Calcio (Ca)	-En depósitos minerales, océanos ($CaCO_3$, $CaCL_{2)}$		-$CaCL_2$
Hierro (fe)	-En depósitos minerales, sedimentos geológicos ($FeSO_4$)		-$FeCL_3$ -$FeSO_4$ -Varias soluciones de Fe quelato con EDTA, citrato, etc.
Potasio (k)	-K+ en solución o como sales		-KCl, -KH_2PO_4

Tipos de medios de cultivo

Al preparar un medio de cultivo para un microorganismo cualquiera, el objetivo principal consiste en proporcionar una mezcla equilibrada de los nutrientes requeridos a concentraciones que permitan un buen crecimiento (Krulwich, 1990).

Por su origen

Medios sintéticos o definidos químicamente: estrictamente definidos desde el punto de vista de su composición química.

Medios naturales: son los preparados a partir de sustancias naturales de origen animal o vegetal como extractos de tejidos o infusiones y cuya composición química no se conoce exactamente.

Por su función o aplicación

Medios comunes o universales: su finalidad es el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos cultivables del aire, suelo, agua, lo más utilizados son el agar o caldo nutritivo

Medios enriquecidos: están compuestos de un medio base como apoyo del crecimiento al cual se le puede agregar un gran exceso de nutrientes como suplementos nutritivos, por ejemplo: sangre, suero. Se utiliza para microorganismos que tienen grandes exigencias nutricionales. Son medios que sembrados con poblaciones mixtas de microorganismos, favorecen la multiplicación de ciertos grupos e inhiben el desarrollo de las especies restantes. Tienen las siguientes características:

- Suelen ser medios líquidos.
- Incluyen compuestos químicos específicos (sangre, suero o extracto de tejidos animales y de plantas) o requieren condiciones físicas especiales (temperatura, pH) que favorecen el desarrollo de un microorganismo determinado.
- Contienen sustancias que inhiben o destruyen la microbiota acompañante.
- El caldo de tetrationato y el caldo de selenito son medios de enriquecimiento que se usan principalmente en bacteriología entérica.

Medios selectivos: son medios que permiten el crecimiento de un grupo de microorganismos e inhibiendo el de otros. La selectividad se logra alterando las condiciones físicas del medio de cultivo o agregando compuestos químicos inhibidores:

- Cambiando pH: para favorecer el desarrollo de *Lactobacillus*, se puede agregar ácido acético a los medios de cultivo para obtener un pH final de 5.4, totalmente inadecuado para muchas bacterias acompañantes.
- Altas concentraciones osmóticas: en agar manitol salado con una concentración de NaCl de 7.5 % muy pocas bacterias pueden crecer, salvo las que presenten una elevada tolerancia a NaCl, como *Staphylococcus aureus.*
- Agregando colorantes como verde brillante, cristal violeta, eosina, sales biliares para inhibir gérmenes Gram positivos, mientras que los Gram negativos se desarrollan sin dificultad.
- Agregando antibióticos: en biología molecular, al agregar ampicilina o tetraciclina en los medios de cultivo, se evidencia la presencia de bacterias genéticamente manipuladas. Estas células son resistentes a uno o más antibióticos y se pueden desarrollar en un medio que las incluye, mientras que las células acompañantes, sensibles a los antibióticos, no pueden crecer. En microbiología clínica se usan antibióticos de espectro de acción reducido, que inhiben o destruyen microorganismos cuyo estudio no interesa, a la vez que no afectan los microorganismos que se están investigando.

Medios diferenciales: permiten demostrar características metabólicas de un determinado grupo de microorganismos, se usa para diferenciar distinguir entre varios géneros y especies de microorganismos. Suelen ser a la vez selectivos.

Medios de prueba: son medios de composición conocida para el ensayo de vitaminas, aminoácidos y antibióticos.

Medios de mantenimiento: son medios que se utilizan para preservar satisfactoriamente las características fisiológicas y la viabilidad de un cultivo.

*Medios para caracterización (pruebas bioquímicas):*generalmente consisten en una base simple (nutricionalmente adecuada), a lo que se ha adicionado el sustrato que se va a probar, a veces con indicador, para mostrar que ha ocurrido un cambio en la reacción.

Medios reductores: contienen agentes reductores (ejemplo, tioglicolato de sodio, cisteína o glutatión). Se usa para el cultivo de microaerófilos y anaerobios.

Medios de transporte: son medios son utilizados para asegurar la viabilidad de la bacteria sin multiplicación significativa de los microorganismos desde el momento de su extracción hasta su posterior siembra en un medio de cultivo adecuado. Los medios de transporte más frecuentemente utilizados son los de Stuart, Amies y Carey - Blair.

Por la consistencia del medio

Sólidos: contienen agar.

Semisólidos: contienen pequeñas cantidades de agar (0.5 %).

Líquidos: son medios que no contienen agar.

Conservación y almacenamiento de los medios de cultivo deshidratados

- Deben ser lugares libres de humedad, polvo y radiación solar directa.
- Los recipientes deben mantenerse herméticamente cerrados.

Materiales

Balanza
Espátula
Pesasustancias
Medios de cultivo deshidratados
Erlenmeyer
Agua destilada
Estufa
Tubos de ensayo estériles
Cajas de Petri estériles
Autoclave
Pipetas de 10 ml estériles
Gradillas

Procedimientos

Preparación de los medios de cultivo

Para una buena preparación de los medios de cultivo es fundamental el empleo de instrumental de vidrio limpio, libre de detergentes.

Siempre que vaya a preparar un medio de cultivo, lea cuidadosamente las instrucciones que aparecen en el recipiente.

1. Pese la cantidad de medio, según la cantidad de cajas de Petri para preparar.
2. El volumen que se va a agregar en cada caja de Petri, es: para bacteria(15 ml) y para hongos(20 ml). Para tubos de 13x100 es de 5 ml, y para tubos 16x150 es de 12 ml.
3. Agregue el medio pesado a un erlenmeyer y adicione el volumen de agua(volumen de agua con respecto a gramos de medio para preparar).
4. Caliente hasta obtener una solución completamente transparente, agitándola constantemente para impedir que el medio se pegue en el fondo del recipiente. Este calentamiento se recomienda para medios líquidos, que usualmente se reparten en los tubos antes de llevarlos a esterilización.
5. La esterilización puede efectuarse de diferentes maneras: por calor, filtración o métodos químicos. El método de elección dependerá del medio, su consistencia y sus componentes lábiles.
6. Generalmente en la esterilización de los medios de cultivos se emplea el calor húmedo (autoclave) con preferencia al calor seco.
7. Llevar el erlenmeyer (previamente tapado con algodón y papel Kraft y marcado) al autoclave.

Si el medio se va a utilizar en tubos, es más práctico servirlo antes de ponerlo en autoclave.

Esterilización en el autoclave

El autoclave es un aparato similar a una olla a presión especial. El desarrollo del autoclave por Chamberland, en 1884, estimuló enormemente el progreso de la microbiología.

Para verificar que la esterilización en el autoclave fue efectiva, se suele incluir, durante el proceso un indicador biológico junto con el resto del material. Este indicador consiste normalmente de una ampolla estéril con un medio y una tira de papel cubierta de esporas de *Bacillus stearothermophilus* o *Clostridium* PA3679. Después de la esterilización en el autoclave, se rompe asépticamente la ampolla y el cultivo se incuba durante varios días. Si la bacteria indicadora no crece en el medio, los materiales han quedado esterilizados. A veces, se introduce también en el autoclave una cinta especial con la palabra *estéril* escrita o una tira de papel indicador que cambia de color después de un tratamiento suficiente con calor. Si la palabra aparece en la cinta o si el color cambia después del tratamiento, se supone que el material es estéril.
Reconozca inicialmente las partes del autoclave en la Figura 20:



Figura 20. Autoclave.
Fuente: manual del equipo marca All-American® del Laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

1. Verifique el nivel del agua de la cámara de vapor.
2. Coloque el recipiente de aluminio dentro de la cámara de vapor.

3. Introduzca el material que se va a esterilizar. Coloque en uno o dos de los materiales para esterilizar un pedazo de cinta control de esterilización.
4. Coloque la tapa, teniendo presente que la flecha que se encuentra en el borde de la tapa coincida con la ranura que está en el borde externo y además que la manguera del manómetro y conductora del vapor que está en la tapa, encaje en la canal del recipiente de aluminio.
5. Ajustar las llaves que están en la tapa, por parejas, tomando una frente a la otra, para ejercer la misma fuerza y así permitir un cierre nivelado de la tapa, evitando que se escape vapor y, por consiguiente, el fracaso, del método de esterilización.
6. Aplicar calor al autoclave, ya sea por medio de la estufa o de electricidad. En los primeros 10 a 15 minutos **la válvula de salida de vapor debe estar cerrada**, con el fin de calentar el autoclave, posteriormente la válvula de salida de vapor se abre y debe permanecer así hasta cuando el vapor desaloje el aire, lo cual se percibe cuando se produce un chorro continuo de vapor a través de la válvula.
7. Cerrar la válvula para permitir la concentración de vapor y el consecuente aumento de la temperatura y la presión, factores que deben ser controlados por medio del manómetro, que se encuentra ubicado sobre la tapa del autoclave.
8. Tenga en cuenta las condiciones establecidas que garantizan una verdadera esterilización:

   Tiempo: 15-30 minutos

   Presión de vapor: 15 libras/pulgadas cuadradas (lb/in^2) o 1.1 kg/centímetro cuadrado (kg/cm^2) o 1.2 atmósfera

   Temperatura: 121 °C (249,8 °F)
9. Cumplido el tiempo de esterilización, se deja enfriar el autoclave hasta cuando la aguja del manómetro descienda a cero.

Precaución: abrir la válvula de escape después de que la aguja del manómetro esté en cero, para evitar quemaduras graves y derrame de medios dentro del autoclave.

Envase de los medios de cultivo (asegurar condiciones de completa esterilidad)

- Lleve el medio al baño de María (que se debe tener a una temperatura de 42 °C).

- Servir 15 ml (medios para bacterias) o 20 ml (para hongos) en las cajas de Petri previamente estériles y dejar solidificar.

Conservación de los medios de cultivo preparados (cajas de Petri o tubos)

- Las cajas de Petri o tubos se guardaran en el refrigerador para evitar su deterioro y su deshidratación. Se recomienda guardar los medios dentro de bolsas de plástico selladas. Según el medio de cultivo de que se trate y del hecho de que esté preparado en placas o tubos, guardados en bolsas es posible conservarlos entre 2 semanas y 4 meses.
- Antes de su uso deben colocarse a temperatura ambiente.

Prueba de esterilidad

Si no se utiliza un indicador de esterilización, se debe llevar uno o dos tubos o cajas de Petri a la incubadora durante 12 a 24 horas a 37 ºC, (medios de cultivo para bacterias) y a 25 ºC por 5 días (medios de cultivos para hongos). Observe después de la incubación si ha habido crecimiento microbiano. En caso de presentarse crecimiento, es indicativo de una mala esterilización y por lo tanto debe repetirse todo el procedimiento de preparación.

Prueba de efectividad

Para comprobar que en el medio preparado efectivamente se desarrollan microorganismos, se usa el medio de cultivo (ya sea exponiéndolo al ambiente o sembrando cualquier tipo de muestra).

Esterilización de material de vidrio

Placas de Petri: se preparan en paquetes de 8 a 10 placas según el tamaño, envolviéndolas con papel Kraf.

Tubos: se tapa cada uno con un tapón de algodón y se envuelven con papel en paquetes **Pipetas**: se coloca un algodón en la parte superior de la pipeta y se envuelve con papel. Todos estos materiales se esterilizan en horno a 160 (2 h) o a 180 ºC (1 h).

4.2 Métodos para obtener cultivos puros: tipos de siembra

Objetivo

Practicar las diferentes formas de siembra.

Introducción

En el ambiente, y en general sobre cada sustrato, se encuentran mezclas de microorganismos, que al ser aislados en medios de cultivo sólidos en el laboratorio, se obtiene un cultivo mixto. A partir de estos, se deben realizar diferentes tipos de siembras, dependiendo del microorganismo, para obtener cultivos puros.

Los cultivos puros son fundamentales para los siguientes estudios:

- Características de las colonias (morfología, reacciones de coloración).
- Propiedades bioquímicas.
- Susceptibilidad de una especie determinada a los agentes antimicrobianos.
- Reacciones inmunológicas.

Siembra

La inoculación de los microorganismos presentes en una muestra, a un medio de cultivo, se denomina *siembra.* Las siembras se practican por medio de un escobillón, de asa bacteriológica o de pipeta. La transferencia de un cultivo a otro se denomina *subcultivo* o comúnmente, *repique.*

Tipos de siembra

Siembra en caja de Petri por agotamiento o estrías: este tipo de siembra, si se ha efectuado correctamente, constituye quizás el método más práctico y más útil para la obtención de colonias separadas (Figura 21).

1. Divida la caja en cuatro partes con un marcador. Tome el inóculo con el asa bacteriológica y trace estrías en el primer cuarto de la placa del medio de cultivo (Figura 21 a).
2. Se esteriliza el asa, se enfría en un borde de la caja y se hace girar la caja, se trazan estrías en el segundo cuarto de la placa (Figura 21 b).
3. Nuevamente se esteriliza el asa, se enfría en un borde de la caja y se hace girar la caja y continuar la estriación en el tercer cuarto de la placa (Figura 21 c).

4. Se esteriliza nuevamente el asa (enfriar el asa), y se hace girar la caja, se trazan estrías perpendiculares a las anteriormente practicadas en el cuadrante libre (Figura 21 d).
5. Al terminar el procedimiento se esteriliza el asa.
6. Llevar la caja de Petri a incubación.

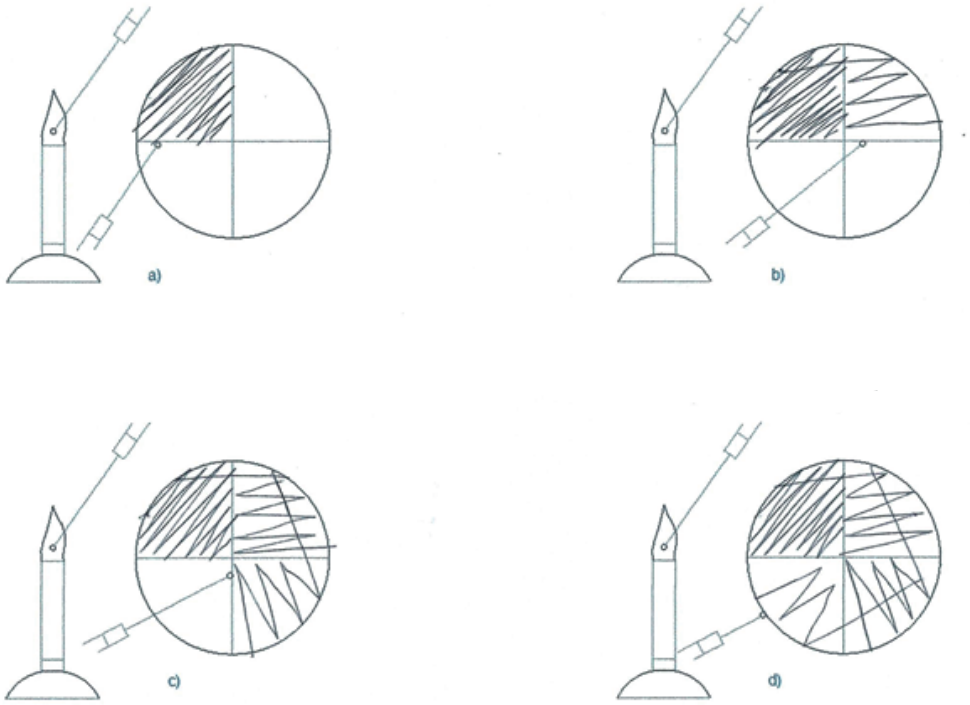


Figura 21 a, b, c, d. Técnica de siembra por agotamiento o estría.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Siembra en caja de Petri por sedimentación: consiste en abrir el medio de cultivo en el ambiente durante 15 minutos.

Siembra en caja de Petri con la técnica de siembra masiva: esta siembra se realiza con escobillón, sobre la superficie de un medio de cultivo sólido.

1. Humedezca un escobillón estéril dentro del medio líquido bacteriano, retire el exceso del inóculo realizando una ligera presión en las paredes del tubo.
2. Pintando en forma horizontal y vertical toda la superficie de la caja de Petri

Siembra en tubos:

Siembra en estría (medio sólido inclinado en bisel o pico de flauta).

Siembra mixta (medio sólido con siembra en picadura y estría).

Siembra en picadura (medio sólido o semisólido sin inclinar).

Siembra en tubo:

1. Flamee el asa bacteriológica.
2. Enfríe el asa en el fondo del tubo. Tape el tubo.
3. Tome con el asa una colonia a partir de sus placas de medio de cultivo.
4. Destape nuevamente el tubo estéril.
5. Introduzca el asa y coloque el inóculo según el tipo de siembra en tubo que desee realizar (Figura 22).
6. Al terminar el anterior procedimiento, esterilice el asa.

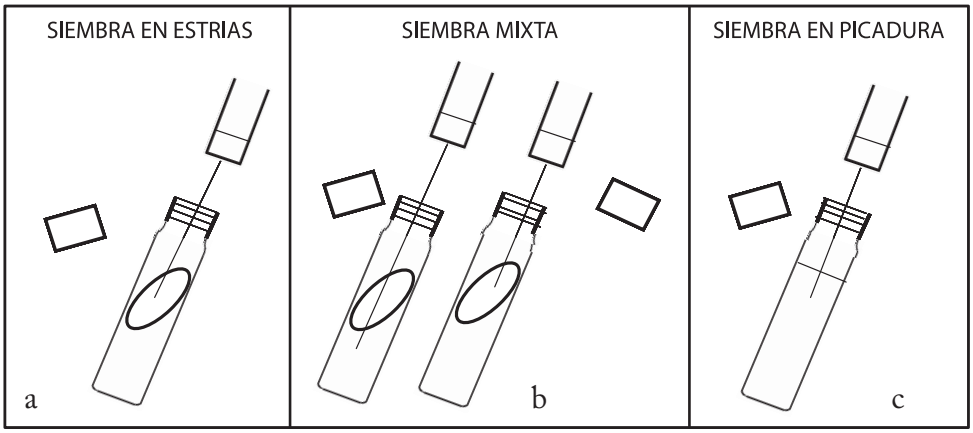


Figura 22. Tipos de siembra en tubo. a. siembra en estría, b. Siembra mixta. c. Siembra en picadura
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales

Cajas de Petri con agar nutritivo estériles

Asas bacteriológicas

Gradillas

Mecheros

Procedimiento

1. Siembre en las cajas de Petri, según la manera indicada en la introducción.
2. La superficie del agar del medio de cultivo por inocular debe hallarse libre de gotas de líquido de condensación antes de efectuar la estriación.

4.3 Medios selectivos y diferenciales

Objetivo

Familiarizarse con el uso y función de medios especializados para la selección y diferenciación de microorganismos.

Introducción

Las bacterias son microorganismos con una enorme capacidad de utilización de diversos compuestos nutritivos, desde moléculas inorgánicas sencillas hasta compuestos orgánicos complejos. La diferencia en la capacidad del empleo de los nutrientes constituye parte de las bases para la identificación tradicional de los microorganismos(Jones, 1982; Krulwich, 1990).

Existen numerosos medios de cultivo que permitirán diferentes propósitos:

- Aislar tipos bacterianos de una población mixta de microorganismos.
- Identificar microorganismos en alimentos, aire, suelos, aguas, lodos o productos de uso diario.
- Caracterizar e identificar los microorganismos según su habilidad para producir cambios químicos en diferentes medios.
- Diferenciar grupos bacterianos cercanamente relacionados, con base en la apariencia macroscópica de las colonias y las reacciones bioquímicas con el medio.

Algunos medios empleados para seleccionar o diferenciar grupos de bacterias son (Atlas, 2006; Merck, 1996; Scharlau, 2011):

Agar Mac Conkey: diseñado para aislar bacilos Gram negativos y de la familia Enterobacteriaceae. El cristal violeta y las sales biliares inhiben el crecimiento de organismos Gram positivos, lo que permite la selección y el aislamiento de bacterias Gram negativas. Las bacterias que tienen la habilidad de fermentar lactosa pueden ser detectadas utilizando el carbohidrato lactosa y el indicador de pH rojo neutro. Las fermentadores de lactosa producen ácido como producto final de su metabolismo, creciendo con la formación de colonias de color rojo-rosado; si la cantidad de ácido producida es grande, la zona periférica al crecimiento se apreciará como una zona roja causada por la precipitación de las sales biliares y la absorción del rojo neutro. Las no fermentadoras de lactosa no producirán ácido, sino que se formarán colonias incoloras y frecuentemente transparentes.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros o especie**
Lactosa positiva/rojas con halo turbio o transparente	*Escherichia coli*
Lactosa positiva/rosadas	*Enterobacter* *Klebsiella*
Lactosa negativa/incoloras	*Salmonella* , *Shigella*, y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de caseína (17), peptona de carne (3), NaCL (5), lactosa (10), mezcla de sales biliares (1.5), Cristal violeta (0.001), rojo neutro (0.03), agar-agar (13.5), pH 7.1 ± 0.1.

Agar eosina-azul de metileno (EMB): Este medio de cultivo permite una diferenciación muy clara entre las colonias de bacterias fermentadores de lactosa y aquellos que no la fermentan. La presencia de sacarosa permite para algunos miembros del grupo coliforme fermentarla con más facilidad que la lactosa. Los colorantes eosina y azul de metileno inhiben el crecimiento de la mayoría de los microorganismos Gram positivos.

La enterobacteriácea *Escherichia coli* crece formando colonias azul oscuro con un brillo verde metálico causado por la gran cantidad de ácido producido por el proceso de fermentación y la precipitación de los colorantes en la superficie de su crecimiento. Otras bacterias entéricas, como las del género *Enterobacter*,

producirán colonias rosadas, y mucoides. Las bacterias que no degradan lactosa o sacarosa, se observan incoloras o rosa pálido transparentes las cuales, debido a su transparencia, parecerán tomar el color púrpura del medio de cultivo.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros o especie**
Lactosa positiva/verdes con brillo metálico verde, a veces negro verdosas	*Escherichia coli*
Lactosa positiva/colonias rosadas a violetas	*Enterobacter* *Klebsiella* y otras
Lactosa negativa/transparentes, de color ámbar (amarillo claro)	*Salmonella, Shigella*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona (10), hidrogenofosfato dipotásico (2), sacarosa (5), lactosa (5), eosina amarillenta (0.4), azul de metileno (0.07), agar-agar (13.5), pH 7.1 ± 0.1.

Agar Salmonella-Shigella: Medio utilizado para el aislamiento de Salmonelas y algunas cepas de Shigelas. Las sales biliares, el verde brillante y la elevada concentración de tiosulfato y de citrato inhiben el crecimiento de bacterias Gram positivas. Las colonias fermentadoras de lactosa se observarán de color rojo a rosadas debido a la unión de los ácidos al rojo neutro. Con el tiosulfato e iones de hierro se pone de manifiesto la formación de sulfuro por el ennegrecimiento de las correspondientes colonias.

Reacciones bioquímicas /morfología macroscópica de las colonias	**Géneros o especie**
Lactosa negativa, H_2S negativo/incoloras	Mayorías de *Salmonella,* y *Shigella*
Lactosa negativa, H_2S positiva/transparentes con centro negro	Algunas *Salmonella,* y *Proteus*
Lactosa positiva, H_2S negativa/rosadas hasta rojas	*Escherichia coli*
Lactosa positiva, H_2S negativa/rosadas hasta de color blanquecino	*Enterobacter aerogenes*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona (10), lactosa (10), bilis de buey desecada (8.5), verde brillante (0.0003), citrato sódico (10), tiosulfato sódico (8.5), citrato de amonio y hierro III (1), rojo neutro (0.025), agar-agar (12), pH 7.1 ± 0.1.

Agar bismuto sulfito: agar selectivo para aislamiento y diferenciación de *Salmonella typhi* y otras *Salmonellas*. El verde brillante y el bismuto sulfito inhiben bacterias Gram positivas. Las colonias de salmonelas H_2S-positivas presentan ennegrecimiento debido al sulfuro de hierro. La reducción de los iones bismuto a bismuto metálico produce brillo metálico alrededor de la colonia.

Reacción bioquímica/morfología macroscópica de las colonias	**géneros o especie**
H_2S positiva/centro negro borde claro precipitado negro con brillo metálico alrededor de las colonias colonias denominadas *ojo de pez o ojo de conejo*	Mayoría de las *Salmonella* no crecen los géneros *Salmonella paratyphi A* y *Salmonella pollorum*
H_2S negativa/verdes o café claro	Bacterias coliformes *Serratia, Proteus* y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®
Extracto de carne (5), peptona de carne (10), D(+)-glucosa (5), hidrogenofosfato disódico (4), sulfato ferroso (0.3), verde brillante (0.025), bismuto sulfito (8), agar-agar (15), pH 7.6 ± 0.2.

Agar TCBS (agar-tiosulfato-citrato-sales biliares- sacarosa) para el aislamiento y cultivo selectivo de *Vibrio cholerae* y otros vibriones enteropatógenos (*V. parahaemolyticus*, Vibrios NAG). La bilis de buey y el colato sódico inhiben, sobre todo, a los Enterococos. Las elevadas concentraciones de tiosulfato y citrato, así como el medio fuertemente alcalino, inhiben a las Enterobacteriáceas. Solamente algunas cepas de *Proteus* sacarosa-positivas pueden formar colonias amarillas semejantes a las de los vibriones. El indicador mixto azul de timol-azul de bromotimol da lugar a un viraje a amarillo por la formación de ácido al degradar las bacterias la sacarosa.

Morfología macroscópica de las colonias	**Géneros o especie**
Pequeñas amarillas	*Vibrio cholerae, Vibrio cholerae* tipo El Tor
Centro verde azulado	*Vibrio parahaemolyticus*
Grandes amarillas	*Vibrio alginolyticus*
Diminutas, transparente	Enterobacteriáceas y otros

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de caseína (5), peptona de carne (5), extracto de levadura (5), sacarosa (20), NaCl (10), bilis de buey desecada (5), colato sódico (3), citrato sódico (10), tiosulfato sódico (10), citrato de hierro III (1), azul de timol (0.04), azul de bromotimol (0.04), agar-agar (14), pH 8.6 ± 0.2.

Agar F, agar P y Agar Base King B para Pseudomonas: el agar P favorece la formación de piocianina y/o piorrubina y reduce la producción de fluoresceína. El agar F estimula la formación de fluoresceína y reduce la piocianina y/o piorrubina. La glicerina favorece la producción de pigmentos. La utilización del fosfato tripotásico-3-hidrato en el agar King B, impide el descenso del pH después de la esterilización y así se evita la escasa formación de fluoresceína por parte de la bacteria.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros y/o especie**
Producción de piorrubina en agar P/ colonias rodeadas de una zona azul hasta verde Producción de fluoresceína en agar F/ colonias rodeadas de una zona amarilla hasta amarillo verdoso. Producción simultánea de fluoresceína y piocianina en agar F/ tono verde fluorescente bajo luz ultravioleta (366 nm).	*Pseudomonas aeruginosa*
Producción de fluoresceína/ tono amarillo fluorescente bajo luz ultravioleta (366 nm).	*Pseudomonas aeruginosa, Ps fluorescens*

Composición del medio Agar P y agar F (g/litro): MercK®
Peptona de caseina (10), peptona de carne (10), sulfato de magnesio(1,5), hidrógenofosfato dipotásico (1,5), agar-agar (12), pH 7.2 ± 0.1 Estos medios requieren una semana de incubación.

Composición del medio Aga base King B (g/litro): MercK®
Peptona-proteosa (20), sulfato de magnesio (1,5), fosfato tripotásico-3-hidrato (1,8), agar-agar (10), pH 7.1 ± 0.1.
Aditivo glicerina (10 ml) para los tres medios

Agar selectivo para Bacillus cereus: El contenido de manitol permite la separación de la microbiota manitol positivo que se caracteriza por un cambio al amarillo

del indicador de pH del *B. cereus* manitol negativo, pero que forma lecitinasa al degradar la lecitina de la yema de huevo, formando un precipitado blanco.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros y/o especie**
Manitol negativo y formación de lecitinasa/ colonias rugosas, secas de color rosado hasta violeta rodeada de halo de precipitado blanco	*Bacillus cereus,Bacillus cereus* var mycoides
Manitol positivo/ colonias con halo amarillento	*Bacillus subtilis*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de carne (10), extracto de carne (1), cloruro de sodio (10), D-manitol (10), rojo de fenol (0,025) agar-agar (12), pH 7.1 ± 0.1
Aditivos: emulsión de yema de huevo (100 ml), Polimixina B sulfato (0,01 a 0,1 g)

Agar Baird Parker: medio para el aislamiento de *Staphylococcus aureus*. El cloruro de litio y el telurito inhiben la microbiota acompañante. El aditivo que se debe añadir después de autoclavar el medio, por su contenido de yema de huevo y telurito, frente a las cuales las colonias de *Staphylococcus aureus* producen lipólisis, proteólisis y desarrollan colonias negras (por la reducción de telurito a teluro). El piruvato sódico y la glicina, incrementa el crecimiento del *S. aureus*.

Reacciones bioquímicas/ morfología macroscópica de las colonias	**Géneros o especie**
Formación teluro, lipólisis, proteólisis/negras, brillantes con un halo claro (2-5 mm), y dentro del halo anillos opacos (visibles después de 48 horas de incubación)	*Staphylococcus aureus*
Formación teluro/negras, brillantes con borde o halo opacos (visibles después de 24 horas de incubación)	*Staphylococcus epidermidis*
Cafés claras hasta negras ausencia de bordes o halos	*Micrococcus*
Cafés oscuras	*Bacillus*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de caseína (10), extracto de carne (5), extracto de levadura (1), piruvato sódico (10), glicina (12), cloruro de litio (5), agar-agar (15), pH 6.8 ± 0.2.
Aditivo: emulsión de yema de huevo y telurito (50 ml), sulfametacina (0,05 g).

Agar salado manitol: este medio de cultivo contiene altas concentraciones de sal (7.5 % de NaCl), lo cual inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias diferentes a los *Staphylococcus*. El manitol incorporado en el medio realiza una función diferencial, pues solo algunos *Staphylococcus* pueden fermentarlo. La adición de rojo de fenol, como indicador de pH, permite detectar la producción de ácido como resultado de la vía fermentativa para el metabolismo del manitol, estos microorganismos forman una zona amarilla periférica a su crecimiento. *Staphylococcus* que no fermenten el manitol no producirán este cambio de coloración.

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros y/o especie**
Manitol positivo/con halo amarillo luminoso* crecimiento abundante	*Staphylococcus aureus*
Manitol negativo/sin halo amarillo luminoso crecimiento escaso	*Staphylococcus epidermidis* y otros

*el halo luminoso se difunde por toda la caja

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona (10), extracto de carne (10), D-manitol (10), cloruro de sodio (75), rojo de fenol (0,025), agar-agar (12), pH 7.4 ± 0.1.

Agar bilis esculina: la presencia de sales biliares inhibe bacterias diferentes a los enterococos. Aunque si hay presencia de Estreptococos del Grupo D, Aerococos y Listerias que toleran las sales biliares y pueden degradar la esculina. El glucósido esculina es hidrolizado por los enterococos convirtiéndolo en glucosa y esculetina. Se forma un complejo de color verde hasta negro por la unión de la esculetina con iones de hierro (III).

Reacciones bioquímicas/morfología macroscópica de las colonias	**Géneros y/o especie**
Degradación de la esculina/el medio se torna de verde a negro alrededor de la colonias	*Enterococcus faecalis, E. faecium*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de carne (5), extracto de carne (3), esculina (1), bilis de buey (40), citrato férrico(0,5), agar-agar (14,5), pH 6.6 ± 0.2.

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Mecheros

Lámpara de luz U.V.

Cultivos bacterianos puros

Medios selectivos y diferenciales

Procedimiento

1. Reconozca junto al docente e identifique la apariencia y color de cada uno de los medios de cultivo.
2. Realice una siembra por aislamiento (agotamiento), según las indicaciones del docente.
3. Incube las cajas durante 12 a 24 horas a 37 ºC.
4. Realice las lecturas de las cajas de Petri y complete los siguientes cuadros:

Nombre del medios					
Clase de medio de cultivo					
Indicador de pH (si lo tiene)					
Inhibidor (si lo tiene)					
Reacciones bioquímicas que suceden					

Nombre del medios					
Clase de medio de cultivo					
Indicador de pH (si lo tiene)					
Inhibidor (si lo tiene)					
Reacciones bioquímicas que suceden					

4.4 Pruebas bioquímicas

Objetivo

Identificar algunos géneros bacterianos de la familia Enterobacteriaceae y otros géneros Gram negativos, mediante el uso de pruebas bioquímicas.

Introducción

Las bacterias requieren aporte continuo y de acceso inmediato de energía, que es usada en procesos de biosíntesis, transporte activo, translocación de proteínas a través de la membrana citoplasmática, movimiento flagelar y bioluminiscencia.

Los procesos químicos que ocurren en el interior de la célula constituyen una compleja cadena de reacciones, en las cuales coexisten los procesos de síntesis-anabólicos y los de tipo degradativo-catabólicos. La suma total de estos cambios se denomina metabolismo.

El estudio de las características bioquímicas de los microorganismos constituye un aspecto importante para la clasificación microbiana. Su fundamento radica en la dotación enzimática bacteriana, visualizada a través de la acción de las

mismas sobre determinados sustratos con agentes reveladores (Parés, & Juárez, 1996).

Para observar las reacciones bioquímicas se utilizan diferentes agentes reveladores que permiten visualizarlas. A los medios de cultivo se le adicionan indicadores de pH, sales hierro, aminoácidos azufrados, entre otros.

***A nivel comercial se encuentran pruebas bioquímicas para la identificación de* bacilos Gram negativos, bacilos Gram negativos no fermentadores de glucosa y bacilos Gram positivos** Son sistemas para la identificación de Enterobacterias, bacilos Gram negativos tipo *Pseudomonas* y Bacilos Gram positivos respectivamente.

Consiste en una plantilla con microtubos o pocillos conteniendo medios de cultivo deshidratados que se rehidrata al agregar una suspensión bacteriana y se e inicia las reacciones del análisis. Después de un período de incubación, se examinan los pocillos para observar cambios de color.

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Mecheros

Cultivos bacterianos puros

Pruebas bioquímicas o medios de reacción

Prueba de la oxidasa

Agar Simons Citrato

TSI (triple azúcar-hierro)

LIA (agar lisina hierro)

SIM (movilidad, indol, sulfuro)

Caldo MR (rojo de metilo)

Caldo VP (Voges Proskauer)

Caldo urea

Caldo nitrato

Gelatina

Reactivos

Rojo de metilo

α-Naftol al 5 % (en alcohol etílico) y KOH al 40 %

Reactivo de Gries o Reactivo A (α -naftilamina o dimetil - α - naftilamina + ácido acético) y Reactivo B (ácido sulfanílico + ácido acético)

Reactivo de Kowács o Reactivo de Ehrlich

Procedimiento

1. Realizar frotis y coloración de Gram de las colonias aisladas de los cultivos selectivos.
2. Realizar la prueba de oxidasa: esta prueba está ligada a las enzimas oxidativas denominadas citocromos, involucradas en la cadena respiratoria. Esta prueba es útil para determinar aquellos microorganismos que carecen de la enzima o son anaerobios obligados.

La prueba puede realizarse *indirectamente*: con tiras de papel, extendiendo una colonia sospechosa sobre la tira comercial o colocando sobre una tira de papel filtro puesta sobre una lámina, varias gotas de reactivo recién preparado de tetrametil-p-finilendiamina al 1 % en agua destilada estéril. Con el asa previamente esterilizada, tomar una colonia de los microorganismos en estudio y frotarla sobre el papel humedecido.

Reacción positiva: color azul.

Reacción negativa: sin color.

Pruebas bioquímicas

1. Anote los colores de las pruebas bioquímicas.
2. Escoja una colonia característica a partir de los cultivos puros y siembre un set de medios de cultivo para pruebas bioquímicas en el siguiente orden y técnica:

- Agar Simons Citrato: estría con asa recta. Se incuba 24 - 48 horas a 37ºC.
- TSI (triple azúcar-hierro) y LIA: se pica hasta el fondo pero sin tocar el vidrio, para evitar que se pierda la cámara anoxigénica; al sacar el asa, hacer una estría sobre la superficie, de esta forma queda sembrado el medio en toda su profundidad y superficie. Se incuban **a 37ºC y se realiza la lectura a las 18 – 24 horas.**
- SIM y gelatina: picar el medio por el centro y hasta dos terceras partes de profundidad, procurando sacar el asa por el mismo orificio. Se incuban **a 37º C durante 24- 48** horas.
- Caldo RM, caldo VP, caldo urea, y nitrato, debido a que son medios líquidos, basta agitar el asa redonda dentro de ellos suavemente. El caldo RM, se incuba a 37ºC durante 48- 72 horas (nunca menos de 48). El caldo VP y caldo nitrato 24 horas, de incubación a 37 º C. El caldo urea, se incuba entre 2 y no más de 6 horas a 36 ºC.

3. Interprete la actividad bioquímica.

Lectura de las pruebas bioquímicas

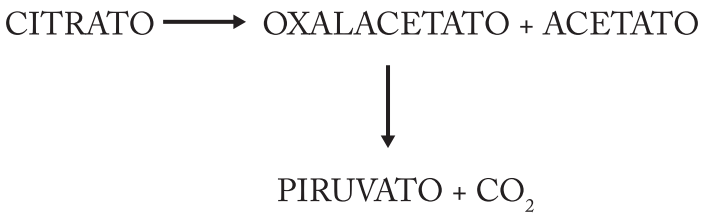
(McFaddin, 1980, Atlas 2006, Merck 1996, Scharlau 2011)

- **Determinar si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono:**

Agar Simons citrato:

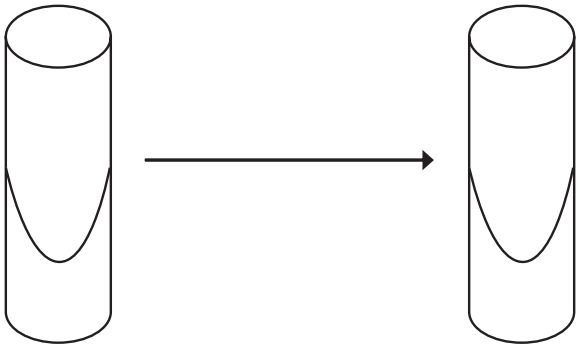
Algunos microorganismos heterotróficos pueden crecer y multiplicarse en un medio inorgánico, que contiene citrato de sodio como única fuente de carbono, mediante la enzima citritasa (citrato oxalacetato liasa), o citrato desmolasa (requiere cationes de Mg o Mn). Como fuente de nitrógeno usa las sales de amonio con producción de amoníaco y posterior formación de NH_4OH, que alcaliniza el medio ocasionando un viraje de verde a azul. El indicador presente en el medio es azul de bromotimol (pH>7,6 azul).

Reacción:



Reacción positiva: azul brillante

Reacción negativa: no hay cambio de color



VERDE
Citrato negativo

AZUL
Citrato positivo

Reacción bioquímica	Géneros o especie
Citrato positivo	
Azul oscuro	*Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia, Salmonella parathyphi B, Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium, Arizona* y otros
Citrato negativo o inhibido	
Verde	*Escherichia, Shigella, Salmonella thyphi, Salmonella parathyphi A* y otros

Composición del medio (g/litro): MercK®
Dihidrógenofosfato amónico (1), dihidrógenofosfato dipotásico (1), NaCl (5), citrato sódico (2), sulfato de magnesio (0.2), azul de bromotimol (0.08), agar-agar (13), pH 6.6 ± 0.1.

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar carbohidratos (TSI, rojo de metilo, Voges Proskauer)**

TSI (triple azúcar-hierro):

a. Capacidad de un microorganismo de degradar glucosa, sacarosa y lactosa, con producción o no de gas (H_2, CO_2)

los resultados que se pueden observar son los siguientes: **hay fermentación de azúcares (glucosa, sacarosa y lactosa), hay fermentación de glucosa pero no de lactosa ni sacarosa, y no hay fermentación de azucares.**

b. Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H_2S)

a. **Degradación de azúcares**:.

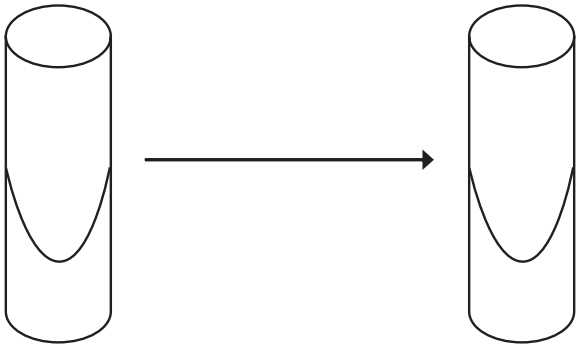
(A): ácido

(K): alcalino

Formación de gas: burbujas, rupturas, desplazamiento del medio.

Resultados:

A/A: color *amarillo* en todo el tubo. Hay degradación de los tres azúcares.

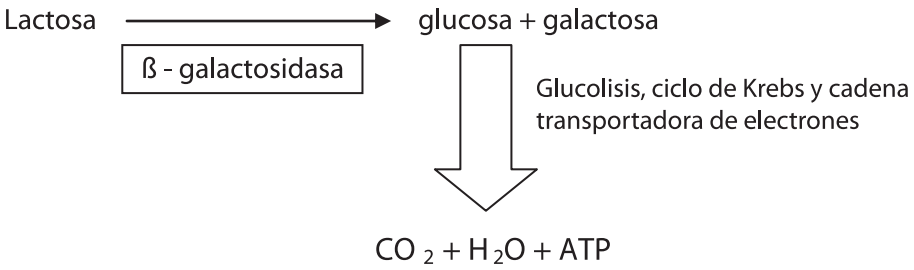


ROJO
Tubo sin inocular

CLARO AMARILLO
Degradación de los 3 azúcares

Reacciones:

1. *Metabolismo o respiración aeróbica de los azúcares en la superficie o pico de flauta*

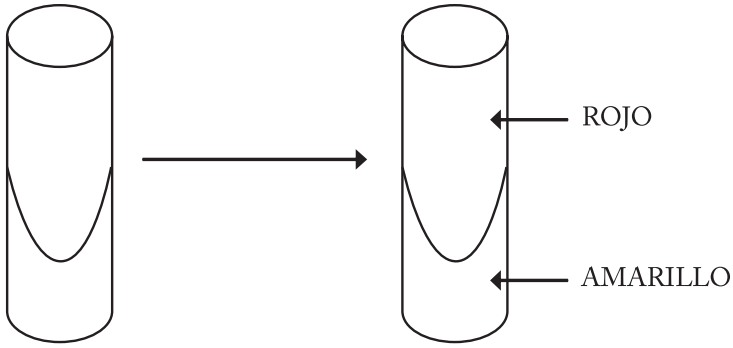


2. *Metabolismo o Fermentación de la glucosa en la capa inferior*

Glucosa → ácidos orgánicos + aldehídos + alcoholes + CO_2 + H_2O + ATP

La fermentación de los azúcares provoca la acidificación del medio con el consiguiente viraje del indicador rojo de fenol a amarillo

K/A: color *rojo* en la superficie y *amarillo* en el fondo. Solo hay fermentación de glucosa.



ROJO CLARO
Tubo sin inocular

ROJO y AMARILLO
Fermentación de glucosa

Reacción:

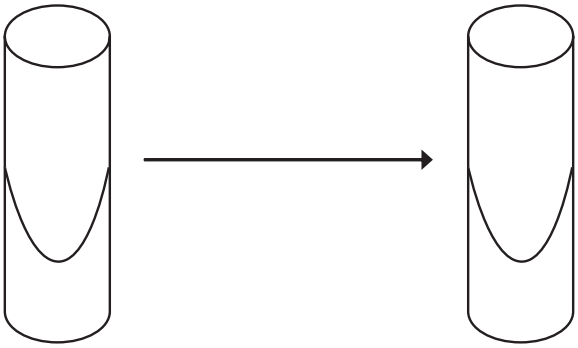
Metabolismo o Fermentación de la glucosa en la capa inferior

Glucosa → ácidos orgánicos + aldehídos + alcoholes + CO_2 + H_2O + ATP

Después de 18 a 24 horas de incubación la baja concentración de glucosa (0.1 %) ha sido consumida por completo y el microorganismo comienza a utilizar

las peptonas, esto produce liberación de amoniaco que da lugar a pH alcalino con el rojo de fenol (de ahí el rojo en la superficie o pico de flauta) y formación de productos ácidos dando un pH ácido (amarillo) en el fondo.

K/K: color *rojo* en todo el tubo. No hay degradación de los azúcares.



ROJO CLARO
Tubo sin inocular

ROJO
No hay degradación de los azúcares

Reacción:

Peptonas ⟶ **amoníaco**

Hay microorganismos que son incapaces de degradar la glucosa y la lactosa, pero crecen catabolizando las peptonas en condiciones aeróbicas y anaerobias, dando lugar a formación de productos alcalinos dando un pH alcalino (rojo en todo el tubo) .

b. Producción de ácido sulfhídrico (H_2S):

Producción de H_2S: formación de color negro en cualquier parte del medio.

Reacción:

Tiosulfato sódico ⟶ **SH_2** (gas incoloro)

SH_2 → **amonio de hierro (III) citrato** → **sulfuro ferroso** (precipitado negro insoluble)

Reacción bioquímica	Géneros o especie
A/A: fermentación de los tres azúcares	
Amarillo en todo el tubo con/sin gas	*Escherichia, Enterobacter, Klebsiella* y otras
A/A: fermentación de los tres azúcares, y SH_2 (+)	
Amarillo en todo el tubo **Precipitado negro** en cualquier parte del tubo	*Arizona, Citrobacter, Proteus mirabilis, Proteus vulgaris*
K/A: fermentación de glucosa	
Color **rojo** en la superficie y **amarillo** en el fondo. Con/sin gas	*Escherichia cepas* sin movilidad, *Enterobacter hafniae, Serratia, Shigella,* y otras
K/A: fermentación de glucosa y SH_2(+)	
Color **rojo** en la superficie y **amarillo** en el fondo. Con/sin gas	*Edwardsiella, Arizona, Citrobacter* y otras
K/K: no hay fermentación de azúcares	
Color ***rojo*** en todo el tubo	*Alcaligenes faecalis, Acinetobacter, Pseudomonas aeruginosa*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de caseína (15), peptona de carne (5), extracto de carne (3), extracto de levadura (3), NaCl (5), lactosa (10), sacarosa (10), D- glucosa (1), amonio de hierro (III) citrato (0.5), tiosulfato sódico (0.3), rojo de fenol (0.024), agar-agar (12), pH 7.4± 0.1.

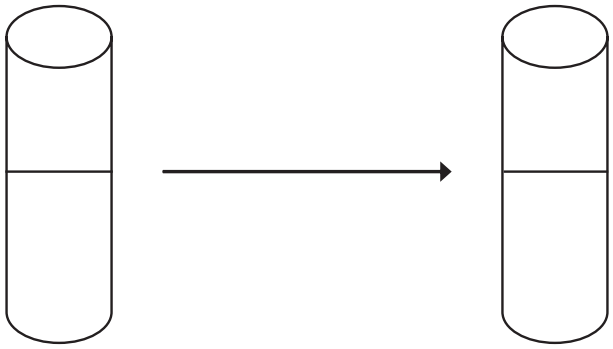
Rojo de metilo:

Determinar la capacidad de una bacteria para fermentar la glucosa por la vía acido-mixta. Después de la incubación se adiciona el indicador de pH rojo de metilo, el cual tiene la propiedad de determinar la concentración de hidrogeniones de los productos ácidos mixtos (ácido láctico, acético, fórmico, succínico). Si bien muchas especies de bacterias son capaces de producir grandes cantidades de ácidos en las fases iniciales de la incubación, sólo los microorganismos capaces de mantener el pH bajo luego de una incubación prolongada superando el sistema amortiguador de pH del medio pueden considerarse rojo de metilo positivo.

Para interpretar esta prueba se debe adicionar 1 gota de reactivo de rojo de metilo por cada ml del caldo después de la incubación.

Reacción positiva: desarrollo de un color rojo.

Reacción negativa: sin cambio de color.



COLOR AMARILLO
Tubo sin inocular

COLOR ROJO
Formación de ácidos

Reacción bioquímica	Géneros o especie
Fermentación glucosa positiva	
Rojo	*Escherichia coli,* y otras
Fermentación glucosa negativa	
Amarillo	*Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae, Klebsiella*

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de carne (7), D(+)-glucosa (5), tampón de fosfatos (5), pH 6.9± 0.1.

VP (Voges Proskauer):

Determinar la capacidad de una bacteria para fermentar la glucosa por la vía butanodiol o butanodiólica. Los microorganismos rojo de metilo negativo también producen estos ácidos, pero finalmente se obtiene una concentración menor de hidrogeniones, debido a que los microorganismos continúan

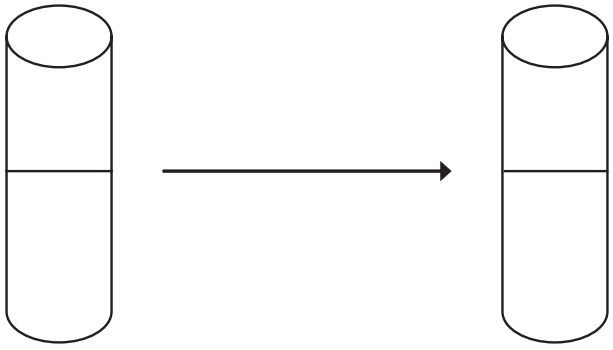
degradando los ácidos produciendo carbonatos y CO_2. Las proteínas las degradan formando compuestos de amonio, y el ácido pirúvico formado en la degradación de glucosa es metabolizado hasta la producción de acetoína. Todos estos productos de la fermentación contribuyen a que el pH suba casi hasta la neutralidad, por lo tanto cesa la producción de hidrogeniones y aumenta la concentración de $CO_{2.}$

Para interpretar esta prueba se debe agregar después de la incubación:

- (naftol al 5 % (en alcohol etílico) y KOH al 40 %.
- 3 gotas de (naftol y 2 gotas KOH al 40 % por cada 5 ml de caldo.
- Agitar el tubo suavemente para exponer el medio al oxígeno atmosférico, a fin de oxidar la acetoína y obtener una reacción de color.
- Dejar reposar 20 minutos, se inicia el cambio de color en la superficie, que se intensifica en el transcurso de aproximadamente 2 horas.

Reacción positiva: rojo.

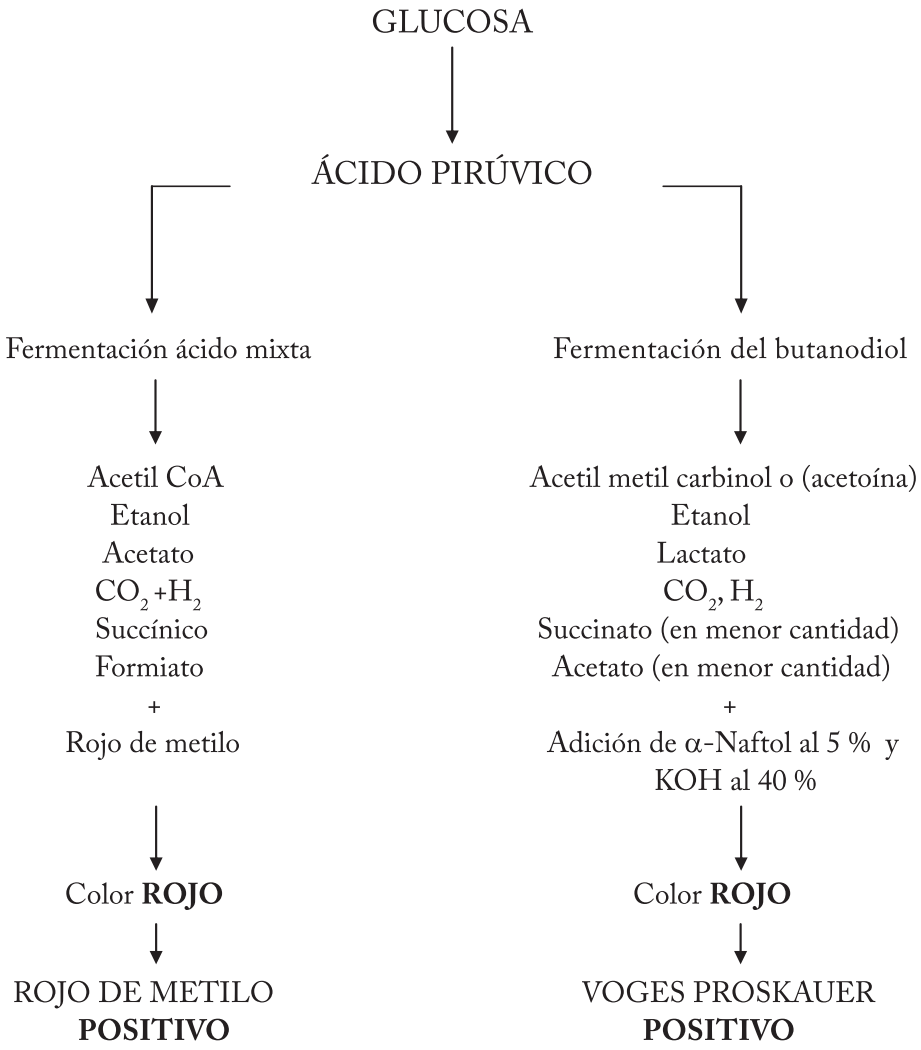
Reacción negativa: sin cambio de color.



COLOR AMARILLO
Tubo sin inocular

COLOR ROJO
Formación de acetoína

Reacciones:


GLUCOSA
ÁCIDO PIRÚVICO
Fermentación ácido mixta
Acetil CoA
Etanol
Acetato
CO_2 +H_2
Succínico
Formiato
+
Rojo de metilo
Color **ROJO**
ROJO DE METILO
POSITIVO
Fermentación del butanodiol
Acetil metil carbinol o (acetoína)
Etanol
Lactato
CO_2, H_2
Succinato (en menor cantidad)
Acetato (en menor cantidad)
+
Adición de α-Naftol al 5 % y
KOH al 40 %
Color **ROJO**
VOGES PROSKAUER
POSITIVO

Reacción bioquímica	Géneros o especie
Fermentación glucosa débilmente positivo o positivo	
De **anaranjado** a **rojo**	*Escherichia coli, Citrobacter* y otras
De **anaranjado** a **amarillo**	*Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae)* y otras
Rojo	*Enterobacter aerogenes, Enterobacter cloacae)* y otros
fermentación glucosa negativa	
Sin reacción **amarillo**	*Escherichia coli, Citrobacter* y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de carne (7), D- glucosa (5), tampón de fosfatos (5), pH 6.9± 0.1.

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar los nitratos y urea como fuente de nitrógeno**

Prueba de reducción de nitratos a nitritos:

La reducción de nitratos incluye todos los procesos en los que el nitrato (NO_3) se reduce a nitritos (NO_2^-), y en algunos casos pueden llegar hasta nitrógeno molecular (N_2). Tiene lugar generalmente en condiciones de respiración o metabolismo anaeróbico.

La mayoría de las bacterias aerobias facultativas reducen nitratos en forma anaeróbica.

Reacción:

$$NO_3^- + 2e + 2H^+ \longrightarrow NO_2^- + H_2O$$

La presencia de nitritos en el medio se detecta añadiendo después de la incubación:

Reactivo de Griess o Reactivo A y B:
Composición Reactivo A (alfa-naftilamina o dimetil -alfa- naftilamina + ácido acético).
Composición Reactivo B (ácido sulfanílico + ácido acético).
Añadir:5 gotas del reactivo de Griess o
5 gotas del reactivo A y 5 gotas del reactivo B / por cada ml de medio.

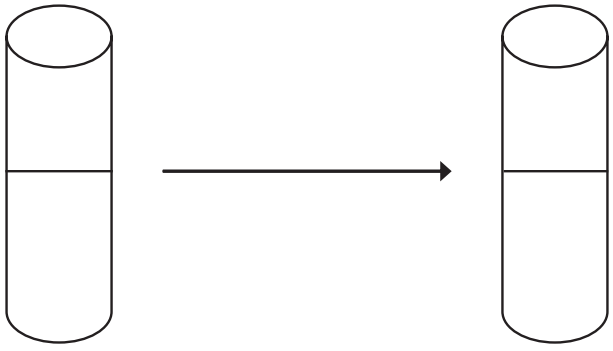
Química de reacción de los reactivos:

Reacción:

Ácido sulfanílico + alfa-naftilamina → p-sulfobenceno-azo-alfa-naftilamina
(incoloro) (incoloro) (rojo)

Reacción positiva: color rosado a rojo intenso.

Reacción negativa: no hay cambio de color.



AMARILLO
Nitratos negativo

ROSADO O ROJO
Nitratos positivo

La mayoría de los miembros de la familia Enterobacteriaceae son generalmente son nitrato positivo.

Composición del medio (g/litro): MercK®

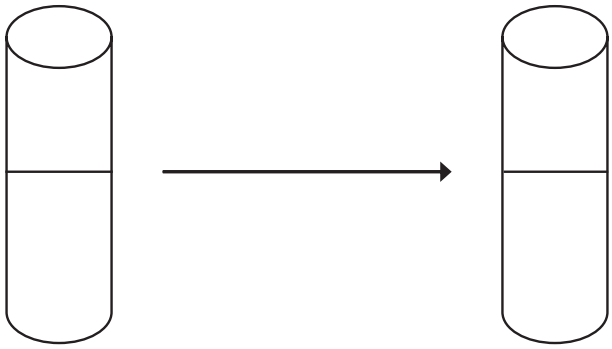
Peptona de carne (8.6), NaCl (6.4), nitrato potásico (1.5), pH 7.2 ± 0.1

Prueba de la urea:

Determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea, por la acción de la enzima ureasa (enzima constitutiva).

Reacción positiva: violeta oscuro.

Reacción negativa: violeta claro.



VIOLETA CLARO
Tubo sin inocular

VIOLETA OSCURO
Prueba positiva

Reacción:

Urea ⟶ anhídrido carbónico+2 (amoníaco)+carbonato de amonio

Reacción bioquímica	**Microorganismos**
Urea positiva	
Rojo	*Proteus, Morganella* y otras
Urea débilmente positivo o negativo	
Amarillo	*Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Serratia Shigella, Salmonella* y otras

Composición del medio (g/litro): MercK® extracto de levadura (0.1), dihidrógenofosfato dipotásico (9.1), hidrógenofosfato disódico (9.5), urea (20), rojo de fenol (0.01), pH 6.8± 0.1.

- **Determinar la capacidad de un microorganismo de degradar las proteínas (LIA, SIM y gelatina)**

LIA (agar lisina hierro):

Medir la capacidad enzimática de un microorganismo para utilizar el aminoácido lisina:

a. Descarboxilación y deaminación de la lisina para formar una amina (cadaverina).
b. Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H_2S). Formación de color negro en cualquier parte del medio.
c. Producción de CO_2: espacios aparentemente vacíos en cualquier parte del medio.

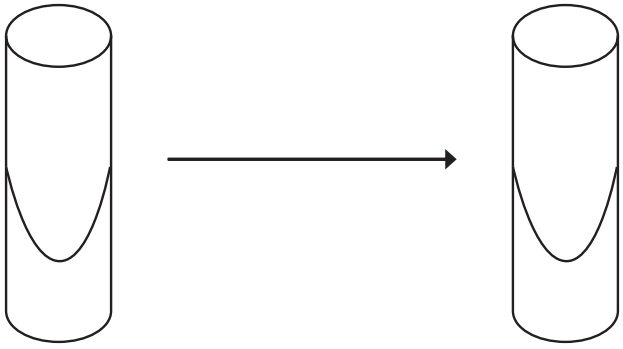
Descarboxilación y deaminación de la lisina:

(K): alcalino

(A): ácido

(R): rojo

K/K: **Descarboxilación de la lisina:** (superficie inclinada y fondo de color violeta) indica presencia de cadaverina + producción de CO_2



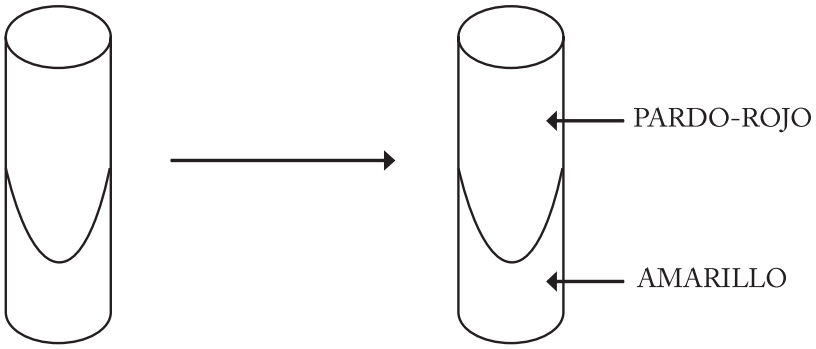
VIOLETA CLARO
Tubo sin inocular

VIOLETA TURBIO +VACÍOS
Descarboxilación + CO_2

Reacción:

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas son capaces de atacar a los aminoácidos en su grupo carboxilo (-COOH) dando una amina o una diamina y CO_2.
En este caso el aminoácido L-lisina sufre la descarboxilación en condiciones anaeróbicas y en un medio ácido -6.0- (es necesario que se produzca previamente esta acidificación, por la fermentación de la glucosa), para dar cadaverina(una diamina) y CO_2 por acción de la enzima específica lisina descarboxilasa (enzima adaptativa o inducida), estos productos producen un viraje al violeta del indicador de pH al alcalinizarse el medio.

R/A: **Deaminación de lisina:** (superficie inclinada pardo-rojo y fondo amarillo).



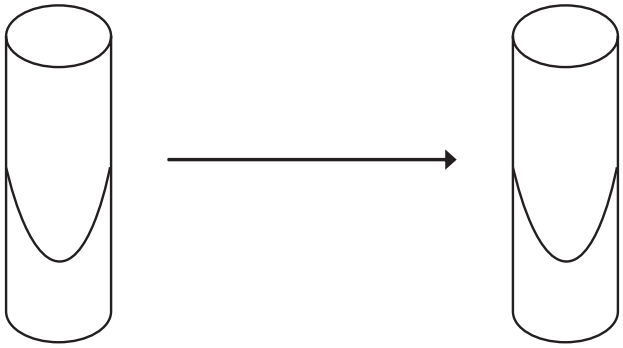
VIOLETA CLARO
Tubo sin inocular

ROJO y AMARILLO
Deaminación de la lisina

Reacción:

Algunas cepas desaniman la lisina a ácido α-cetocarbónico. Este último forma compuestos pardo-rojizos en la superficie inclinada en condiciones aeróbicas.

A/A: No descarboxilación ni deaminación de lisina (superficie inclinada y fondo amarillo) indica solamente fermentación de glucosa



ROJO CLARO
Tubo sin inocular

AMARILLO
No descarboxilación ni deaminación de lisina

Reacción:

Microorganismos lisina negativos, pero fermentadores de glucosa, producen un viraje al amarillo de la totalidad del medio de cultivo.

Producción de H_2S

Reacción positiva: coloración negra en el medio

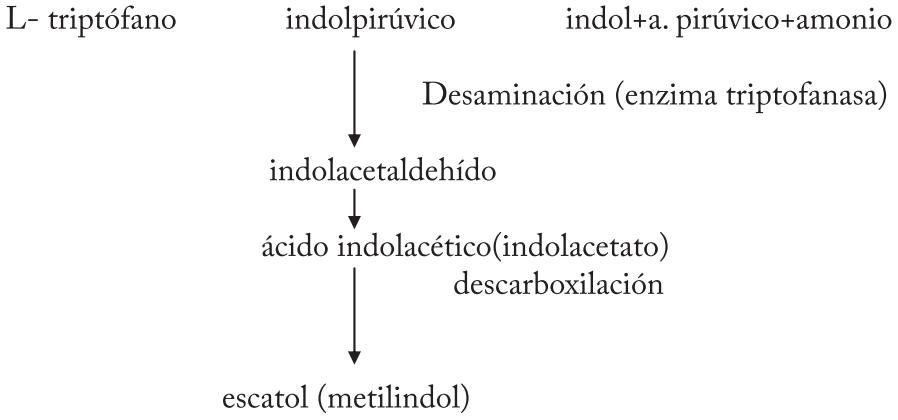
Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
K/K: descarboxilación de la lisina, H_2S (+)	
Violeta en todo el tubo **Gas** Coloración **negra** en el medio	*Arizona,* algunas Salmonelas, *Edwardsiella*
R/A: deaminación de la lisina	
Superficie inclinada **pardo-rojo** y fondo **amarillo** Coloración **negra** en el medio	*Proteus mirabilis, Proteus vulgaris* y otras especies de *Proteus*
A/A: no descarboxilación ni deaminación de lisina	
Amarillo en todo el tubo	*Citrobacter* y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de carne (5), extracto de levadura (3), D (+)-glucosa (1), L-lisina monoclorhidrato (10), tiosulfato sódico (0.04), citrato de amonio y hierro III (0.5), púrpura de bromocresol (0.02), agar-agar (12.5), pH 6.7± 0.1

SIM (movilidad, indol, sulfuro)

a. Determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar el aminoácido triptófano y producir indol
b. Capacidad de un microorganismo de producir ácido sulfhídrico (H_2S).
c. Determinar si un microorganismo es móvil o inmóvil.

a. Producción de indol:

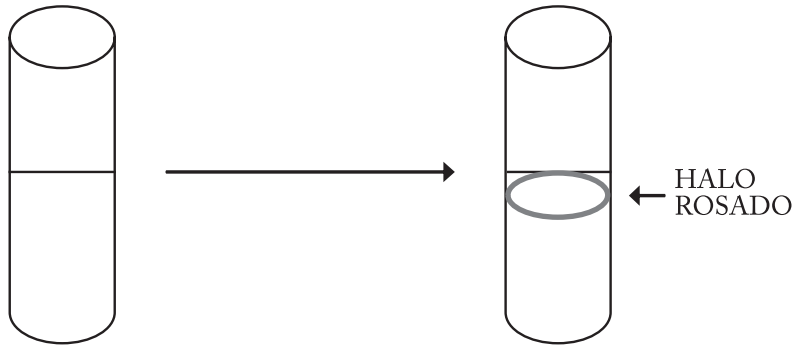


La presencia del indol, se detecta añadiendo el reactivo de Kovács o Ehrlich, que se adiciona después de la incubación (5 gotas del reactivo para cada 4 ml de medio), forma un anillo color rojo o cereza en la superficie del medio (capa de alcohol).

P-dimetil aminobenzaldehído+indol ⟶ color rojo
HCL
alcohol

Reacción positiva: formación de un anillo rojo o violeta.

Reacción negativa: anillo incoloro.



AMARILLO
Tubo sin inocular

AMARILLO CON HALO ROSADO
Indol positivo

b. Producción de H_2S

Reacción positiva: coloración negra en el medio.

c. Movilidad

Reacción positiva: turbidez u opacidad.

Reacción negativa: solo crecimiento en la picadura.

Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
Indol positivo	
Formación de un anillo **rojo** o **violeta**	*Escherichia, Proteus vulgaris* y otras
Indol negativo	
No formación anillo	*Enterobacter, Citrobacter* y otras
Indol (+) y H_2S (+)	
Formación de un anillo **rojo** o **violeta, negro** en zona de crecimiento	*Proteus vulgaris, Edwardsiella*
Indol (-) y H_2S (-)	
No **formación anillo**	*Hafnia, Serratia* y otras
Indol (+) y H_2S (+) y movilidad (+)	
Formación de un anillo **rojo** o **violeta, negro** en zona de crecimiento y **turbidez**	*Edwardsiella*

Reacciones bioquímicas	Géneros o especie
Indol (+) y H_2S (-) y movilidad (+)	
Formación de un anillo **rojo** o **violeta** y **turbidez**	*Providencia*
Indol (+) y H_2S (-) y movilidad (+/-)	
Formación de un anillo **rojo** o **violeta** y o no **turbidez**	*Escherichia*
Indol (-) y H_2S (-) y movilidad (+)	
Turbidez	*Hafnia, Serratia*
Indol (-) y H_2S (+) y movilidad (+)	
Negro en zona de crecimiento y **turbidez**	*Arizona* y otras

Composición del medio (g/litro): MercK®
Peptona de caseína (20), peptona de carne (6.6), citrato de amonio y hierro III (0.2), tiosulfato sódico (0.2), agar-agar (3), pH 7.3± 0.1

Licuefacción de la gelatina:

La gelatina es una proteína que cuando se disuelve en agua puede ser utilizada por aquellos microorganismos que poseen la enzima extracelular gelatinasa dando lugar a su licuefacción.

Reacción positiva: el medio se torna líquido.

Reacción negativa: el medio permanece sólido.

Las lecturas de las pruebas bioquímicas se harán en el grupo de trabajo, se debe colorear cada uno de los tubos y completar el siguiente cuadro:

Pruebas	Reacciones	Resultado
Oxidasa		
Agar citrato		
TSI	Lactosa, sacarosa, glucosa	
	Glucosa	
	Gas	
	H_2S	
Rojo de metilo		
VP		
Nitratos		
Urea		
LIA	Descarboxilación de la lisina	
	Deaminación de la lisina	
	H_2S	
	CO_2	
SIM	H_2S	
	Indol	
	Movilidad	

4.5 Requerimientos de oxígeno y factores osmóticos de las bacterias

Objetivo

Diferenciar bacterias de acuerdo con sus requerimientos de oxígeno y factores osmóticos.

Introducción

Las bacterias presentan un amplio potencial en su capacidad de utilizar para el crecimiento, fuentes de nutrición diversas que van desde sustancias completamente inorgánicas hasta materiales orgánicos muy complejos. Pero otros factores, tales como pH, tensión de oxígeno, presión osmótica (concentración de sal y azúcar), temperatura, afectan la habilidad del microorganismo para crecer.

Tioglicolato: medio utilizado para el cultivo de aerobios, microaerófilos, anaerobios facultativos y aerotolerantes y anaerobios estrictos. Las sustancias reductoras, tioglicolato y cisteína proporcionan una anaerobiosis suficiente, incluso para anaerobios exigentes. Los grupos sulfhidrilos (aportados por la cisteína, tioglicolato, glutatión), enlazan el oxígeno para formar agua e impiden la formación y acumulación de peróxido de hidrógeno en el medio, además de inactivar junto al tioglicolato el efecto antibacteriano de compuestos de arsénico, mercurio y de otros metales pesados. El tioglicolato de sodio disminuye el potencial redox del medio de cultivo y la elevada viscosidad por la presencia de una baja cantidad de agar, retarda la dispersión de CO_2 y O_2. La resazurina sódica actúa como un indicador de la óxido-reducción, que es de color rosado fucsia en presencia de oxígeno (Neidhart et al., 1990; Tortora, 2010).

Materiales

Asa bacteriológica redonda

Suspensiones bacterianas de cepas de referencia de *E. coli, Staphylococcus aureus, Bacillus* sp

Géneros y/o especies de Enterobacterias aisladas en los laboratorios anteriores

Gradillas

Caldo de tioglicolato con indicador

Solución al 3 % de peróxido de hidrógeno

Placas portaobjetos

Caldo nutritivo (CN) con NaCL a 1 %, 6.5 % y 15 %

Jarra de anaerobiosis

Baño serológico a 45 ºC

Procedimiento

Requerimientos de oxígeno

1. Caliente los tioglicolato a 45 ºC/10 min con el fin de excluir el oxígeno (en medio con resarzurina)
2. Inocule tres tubos de tioglicolato con cada una de las cepas de referencia *Escherichia coli*, se siembra en profundidad en el medio de cultivo y el *B. subtilis* en la parte superior del tubo.
3. Inocule en profundidad tres tubos de tioglicolato con cada uno de los microorganismos (familia Enterobacteriaceae aislados en la práctica anterior)
4. Cubra cada tubo con agar agua (1 cm) y tapar el tubo.
5. Llevar a incubación a 37 ºC por 48-72 horas.
6. Realice la lectura y complete el siguiente cuadro:

Bacteria inoculada	Crecimiento parte superior del tubo	Crecimiento a lo largo del tubo
Escherichia coli		
Bacillus sp		
Bacteria inoculada por cada grupo de trabajo		

Catalasa

La catalasa es una enzima que degrada el peróxido de hidrogeno:

$$2H_2O_2 \xrightarrow[\text{catalasa}]{} 2H_2O + O_2$$

1. Tomar una colonia de cada una de las bacterias de la familia Enterobacteriaceae.
2. Depositarla en el centro de un portaobjetos limpio.
3. Adicionar una gota de peróxido de hidrógeno.
4. Observar la producción de burbuja.

Presión osmótica

1. Siembre con un asa bacteriológica redonda en tubos del caldo nutritivo con NaCL de la siguiente manera:

CN con NaCL		
1 %	**6.5 %**	**15 %**
E. coli	*E. coli*	*E. coli*
S. aureus	*S. aureus*	*S. aureus*
Bacillus sp	*Bacillus* sp	*Bacillus* sp
Bacteria familia Enterobacteriacea	Bacteria familia Enterobacteriacea	Bacteria familia Enterobacteriacea

3. Incube los CN a 37 ºC /24 a 48 horas.

Lectura

Realice las lecturas de los tubos y estime el crecimiento teniendo en cuenta:

-: sin crecimiento

+: crecimiento escaso

++: crecimiento moderado

+++: crecimiento abundante

Y complete el siguientes cuadro:

	NaCL		
Microorganismo Inoculado	**1%**	**6.5%**	**15%**

Sistema de jarra anaeróbica

La jarra anaeróbica, mediante el uso de compuestos químicos, permite la producción de condiciones anaeróbicas. A medida que se explica la jarra, escriba las diferentes partes (Figura 23).



Figura 23 Jarra de anaerobiosis.
Fuente: manual marca OXOID® del Laboratorio Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

Los compuestos químicos para anaerobiosis: Gas Generating Kit OXOID® (borohidruro de sodio, ácido tartárico y bicarbonato de sodio), o Anaerocult A MERCK® (tierra silícea, hierro en polvo, ácido cítrico, carbonato sódico), o Anaerogen OXOID® (ácido ascórbico).

- Fijan el oxígeno y producen un medio libre de oxígeno (anaerobio).
- Reaccionan con el agua y producen hidrógeno y una atmósfera de dióxido de carbono.
- El catalizador de paladio (algunas jarras aún lo tienen) combina el oxígeno con el hidrógeno y forma agua.

Instrucciones de manejo

1. Humedezca la tira indicadora de anaerobiosis y colóquela dentro de la jarra.
2. Introduzca las cajas y/o tubos.

3. Introduzca el compuesto químico, siguiendo las indicaciones de la casa comercial.
4. Cierre inmediatamente y herméticamente la jarra de anaerobiosis.
5. Cerciórese de que el indicador de anaerobiosis cambie de color, con el fin de confirmar la anaerobiosis creada.
6. Lleve a incubación.

Capítulo 5

Recuento de microorganismos

Objetivo

Determinar la cantidad de microorganismos por unidad de volumen presentes en una muestra dada a través de técnicas básicas.

Introducción

Cuando a los microorganismos se les provee con nutrientes y los factores ambientales requeridos, se activan metabólicamente y crecen. El crecimiento se da en dos niveles. En un primer nivel, las bacterias sintetizan nuevos componentes celulares y aumenta su tamaño, en el otro nivel el número de células incrementa. Esta capacidad para multiplicarse amplía el tamaño de la población por división celular.

Métodos de crecimiento microbiano

El crecimiento de una población microbiana se mide siguiendo los cambios en el número de células o el peso de la masa celular.

Existen diversos métodos para contar el número de células o para estimar la masa celular dependiendo de los microorganismos de que se trate (Jensen, 1968; Jennings, 1995; Madigan et al., 2004).

1. Métodos directos:

- Recuento microscópico directo.

- Recuento en placa: diluciones y siembra.
- Método del número más probable (NMP).
- Filtración.

Otros métodos directos:.

- *Determinación del peso húmedo*: se tara un tubo de centrífuga, se centrifuga el cultivo y se elimina el sobrenadante. Se determina el peso del sedimento.
- *Determinación del peso seco:* el procedimiento inicial es igual al anterior, pero el sedimento se seca antes de ser pesado (105 ºC, durante toda la noche), hasta peso constante. Esta medida suele representar el 10-15 % de los valores de peso húmedo.
- *Determinación del nitrógeno total:* técnica de micro-Kjeldahl.
- *Determinación de un componente característico:* peptidoglucano, ADN, AR, proteínas, ATP, clorofilas en microorganismos fotosintéticos, etc.

2. Métodos indirectos:

- Turbidimetría (ópticos).
- Actividad metabólica.
- Medida de consumo de nutrientes o de producción de algún metabolito por unidad de tiempo. Ejemplos: consumo de oxígeno (QO_2) y consumo de carbónico (QCO_2), determinados por el respirómetro de Warburg. Producción de ácidos.

5.1 Recuento microscópico directo

Objetivo

Realizar conteo directo de microorganismos en cámara de conteo.

Introducción

Este método permite determinar el número de células microbianas, por observación a través del microscopio. La muestra puede utilizarse tal cual, (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento.

Se basa en contar microorganismos en una cantidad conocida de muestra utilizando frotis coloreados, cámaras del tipo de las de contar glóbulos, o las especialmente diseñadas para contar hongos en alimentos como la cámara de Howard.

Se determina el número TOTAL de células presentes (VIABLES Y NO VIABLES) Ocasionalmente se pueden utilizar colorantes que indiquen diferentes estados metabólicos de las células. Por ejemplo en un recuento en cámara de un cultivo de levaduras con azul de metileno, se pueden distinguir las células VIABLES (no absorben el colorante, se verán transparentes) de las NOVIABLES (absorben el colorante y se verán azules).
Para el conteo directo de células bacterianas se utilizan cámaras (cámara de Petroff-Hausser o cámara de Neubauer). Se trata de portaobjetos gruesos con dos cuadrículas separadas por surcos.

Cámara de Neubauer
En la Figura 24 se muestra una de las cuadrículas, que tiene 9 cuadrados de 1 mm^2 de área y una profundidad de 0.1 mm. Los cuadros esquineros están subdivididos en 16 cuadrados secundarios (señalizados con X) y el cuadro central (señalizado con Z) está subdividido en 25 cuadrados secundarios y cada uno de ellos subdividido en 16 cuadrados terciarios.

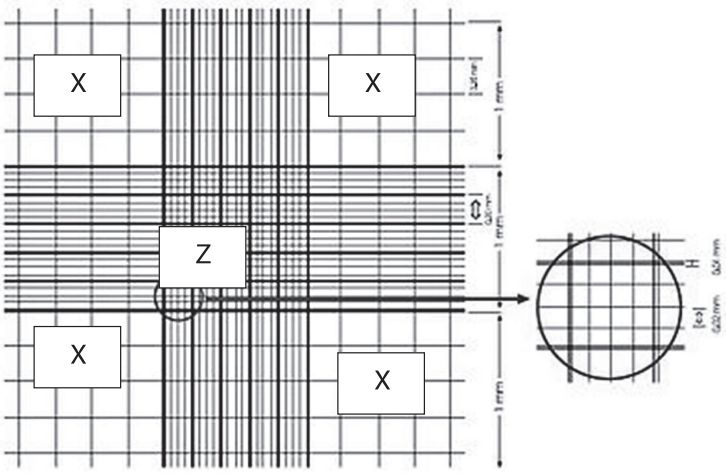


Figura 24. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer.
Fuente: cámara de Neubauer en Wikipedia

Para el recuento de células pequeñas, por ejemplo, para bacterias se tiene en cuenta el cuadrado central de 25 cuadrados secundarios.

Para el recuento de células mayores a 15 µm, tipo esporas de hongos, algas, protozoarios, se realizan en los cuadrados esquineros

Materiales

Cultivo de bacterias en medio líquido de 12 a 24 horas de crecimiento

Cámara de Neubauer

Laminillas de cuarzo

Pipetas Pasteur estériles

Pipeta de 1 ml estéril

Micropipeta

Etanol al 70 %

Tubos con 9 ml de formaldehído al 37 % en NaCl al 0.85 %

Procedimientos

Recuento microscópico directo

1. Homogenice el cultivo.
2. Realice diluciones 1/10 (tome 1.0 ml de la suspensión bacteriana y viértala sobre los 9 ml de formaldehído al 37 % en NaCl al 0.85 %).
3. Agite el tubo y tome con una pipeta Pasteur o con una micropipeta (40-50 µl) la muestra de la dilución.
4. Coloque la laminilla de cuarzo y cargue por capilaridad el volumen requerido, depositando suavemente la muestra en el borde de la laminilla o ranura.
5. Se debe depositar muestra en las dos cuadrículas de la cámara.
6. Enfoque en menor aumento para ubicar la cuadrícula y pase al objetivo de 40x.
7. Cuente 5 cuadrados del cuadrado central, que contiene 25 cuadrados secundarios, tal como se muestra en laFigura 25.

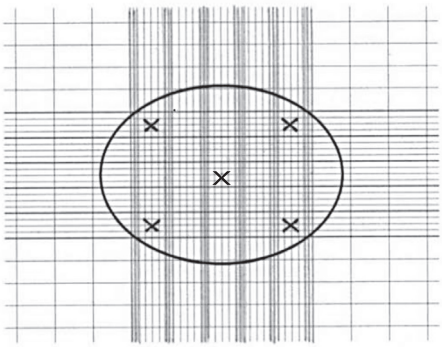


Figura 25. Esquema de la cuadrícula central de la cámara de Neubauer.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

8. Para obtener el número de microorganismos contados en los 5 cuadrados, tenga en cuenta la siguiente fórmula:

$$\frac{\textit{Número de células}}{\textit{ml}} = \frac{\text{promedio del número de células x 5 cuadrados}}{\text{Factor de dilución x } 10^{-4}\ \text{cm}^3}$$

El valor 10^{-4}cm^{3}corresponde al volumen que contiene los 5 cuadrados contados.

5.2 Método de recuento en placa

Objetivos

- Determinar el número de bacterias viables en muestras de aguas, suelos o alimentos.
- Adquirir destrezas en el método de recuento en placa.

Introducción

El enfoque más corriente para aislar y ponderar microorganismos en diferentes hábitats consiste en la técnica de recuento en placa. Este método lo introdujo Robert Koch y posteriormente ha sido evaluado por numerosos investigadores (Brierley, Jewson & Brierley, 1928; Warcup, 1955a, 1955b; Taylor, 1962; Jensen, 1968; Grigorova & Norris, 1990; Parkinson &Coleman, 1991; APHA, 2004).

Fundamento

El método de recuento en placa es un procedimiento cuyo objeto consiste en calcular el número de bacterias vivas que existe en una muestra.

Las colonias pueden surgir en pares, cadenas, grupos o células únicas, todas ellas englobadas bajo el término de unidades formadoras de colonias (UFC).

Para conteos generales de bacterias y hongos se usan los medios de cultivos: agar placa de conteo (agar Plate Count), agar extracto de malta (hongos).

Preparación de la muestra

Se requiere preparar diluciones de la muestra y para la cuantificación se utiliza la siembra en un medio sólido.

1. Preparación de las diluciones seriadas:

Solución diluyente: las primeras técnicas recomendaban agua, solución salina, solución de Ringer, etc. Finalmente se recomendó la utilización de agua peptonada (ICMSF, 1978), solución salina peptonada o el tampón de fosfatos (APHA, 2004, APHA, AWWA, WEF 2005).

2. Siembra de la muestra:

Para la siembra de las diluciones se utilizan dos métodos:

- *Método de extensión o superficie* (Olsen & Bakken, 1987):consiste en la dispersión uniforme de la alícuota de la dilución sobre el medio sólido (Figura 26).
- *Siembra por vertido en placa o en profundidad*:o incorporación del medio de cultivo sobre la alícuota de la dilución que se ha servido previamente en la caja de Petri vacía (Figura 27).

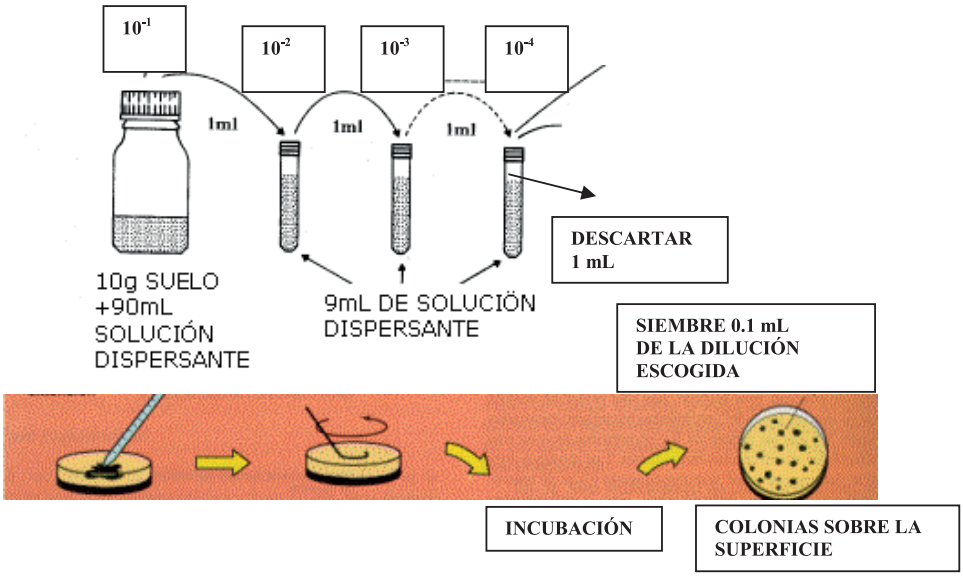


Figura 26.Método de extensión o superficie.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

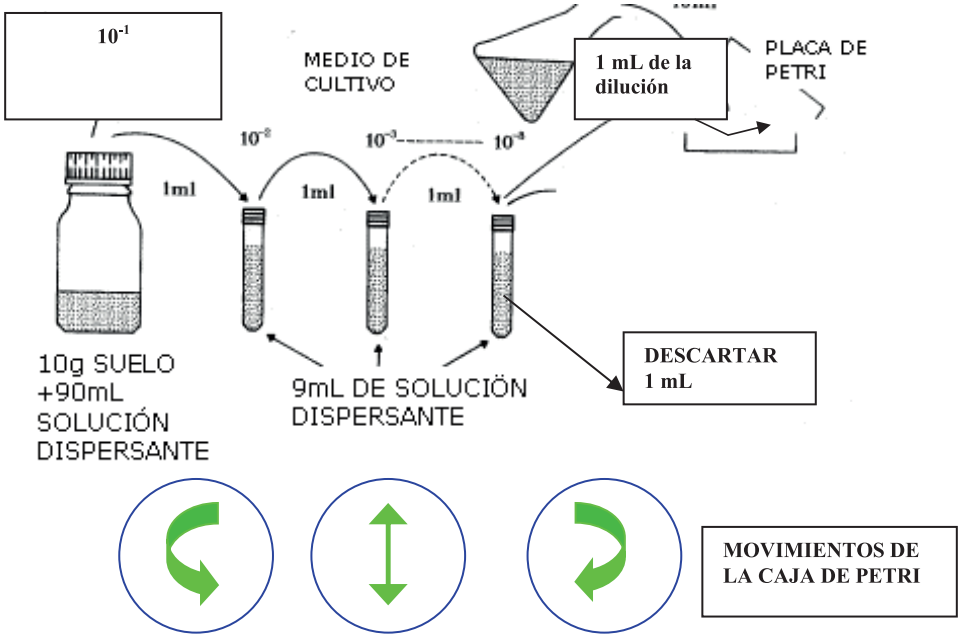


Figura 27. Siembra por vertido en placa o en profundidad.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales

Frascos con 90 ml de solución salina al 0.85 %

Tubos de ensayo con 9 ml de solución salina al 0.85 %

Cajas de Petri con medio de cultivo agar Plate Count Merck®) (composición del medio PCA:(g/l): peptona de caseína 5.0, extracto de levadura 2.5, D-glucosa 1.0, agar-agar 14.0, agua destilada 1000 ml. PH 7.0± 0.1)

Asas de Drigalsky o rastrillos estériles

Pipetas estériles de 1, 5 y 10 ml

Pesasustancias

Gradillas

Balanzas

Espátulas

Pipeteadores

Mecheros

Muestras de aguas, suelo, compost.

Procedimiento

Diluciones y siembra en superficie
(Véase Figura 26).

Preparación de las diluciones:

1. Marque los tubos y las placas de Petri.
2. Pese 10 gramos de la muestra sólida o mida 10 ml de la muestra líquida.
3. Transfiera a un frasco con 90 ml de solución salina, y homogenizar (el tiempo de homogenizar dependerá del tipo de muestra por analizar). Este paso da lugar a la dilución 10^{-1}.
4. Pipetee 1 ml de la primera dilución (10^{-1}) y deposite en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-2}).
5. Agite la dilución anterior (10^{-2}), tome 1 ml y deposítela en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-3}).

6. Agite la dilución anterior (10^{-3}), tome 1 ml y deposítela en un tubo que contiene 9 ml de la solución diluyente (este paso da lugar a la dilución 10^{-4}).

Cada vez que se prepara una dilución en necesario homogeneizarla adecuadamente para lograr una distribución de los microorganismos en todo el volumen de dilución. Esto se logra por agitación (si es un frasco se agita haciendo un movimiento de inversión durante 25 veces, si es un tubo puede emplearse un vortex).

Siembra de la muestra

Una vez preparadas las diluciones, se siembra dentro de los 15 minutos siguientes.

Método de extensión o superficie (Olsen &Bakken, 1987):

1. Coloque 0.1 ml de cada dilución (empezando con la dilución más alta, que previamente se le ha extraído un ml, en este caso dilución 10^{-4}), en placas de Petri que contienen 15 ml del medio solidificado (utilizar dos a tres placas de Petri por dilución).
2. Para que la muestra quede lo más extendida posible y uniforme en la superficie del medio, se hace girar la placa de manera rotatoria, a la vez que se extiende la muestra con el rastrillo.
3. Incube las placas de Petri (la temperatura dependerá del tipo de muestra) por 48-72 horas. Sacar de la incubadora y realizar el recuento con la ayuda del cuentacolonias.

Siembra por vertido en placa o profundidad

1. De las diluciones preparadas previamente, se procede de la dilución mayor a la menor, y se deposita 1 mL de cada dilución en placas estériles, vacías, por duplicado.
2. Posteriormente, se agrega a cada placa 15 a 20 mL del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y termostatizado a 45ºC en baño o estufa cuidando de no volcar agar fuera de la placa o sobre la tapa de la misma.
3. Se agita suavemente moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular, horario y antihorario y hacia delante y atrás (Figura 27).

Lectura:

El recuento se realizará en las placas que tengan entre mayor a 30 y menor a 300 colonias.

Cálculo del número de unidades formadoras de colonias en la muestra procesada (UFC):

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml o g}} = \frac{\text{promedio número de colonias en las placas de Petri}}{\text{dilución que fue usada para la siembra}}$$

Ejemplo:

En las dos placas de Petri de la dilución 10^{-4} tuvimos un promedio de 50 colonias:

$$\frac{50}{10^{-4}} = 50 \times 10^{4} = 500000 = 5 \times 10^{5} \text{ U.F.C. / g o ml de muestra}$$

Una vez hecho el recuento y los cálculos, complete el siguiente cuadro:

Placa de Petri	**Número de colonias**	**U.F.C./g o ml**
Caja número 1		
Caja número 2		

5.3 Método del número más probable (NMP)

Objetivos

- Estimar el número de microorganismos, aplicando la técnica del número más probable.
- Adquirir destrezas en el método del número más probable.

Introducción

El fundamento del número más probable o el método de tubos múltiples o de extinción de muestras por diluciones, se basa en la presencia o ausencia de microorganismos en una serie de diluciones consecutivas de la muestra, con la interpretación de los resultados como un estimativo de la probabilidad del número de microorganismos en una tabla estadística.

Por consiguiente, solo es una estimación estadística de la concentración de microorganismos viables en una muestra. Es un concepto estadístico derivado de la teoría de probabilidades aplicada a la numeración de microorganismos bajo ciertas condiciones.

Hay varias modalidades de siembra (medio de cultivo líquido)APHA, 2004, 2005:

- Técnica con 10 tubos y cada tubo con 10 ml de muestra.
- Técnica con 5 tubos y cada tubo con 10 ml de muestra.
- Técnica con 15 tubos y en cada 5 tubos con 10 ml, 1.0 ml, 0.1 ml de muestra.
- Siembra de diluciones decimales de la muestra en (agua, solución salina o agua peptonada) en dos, tres o cinco tubos (Figura 28).

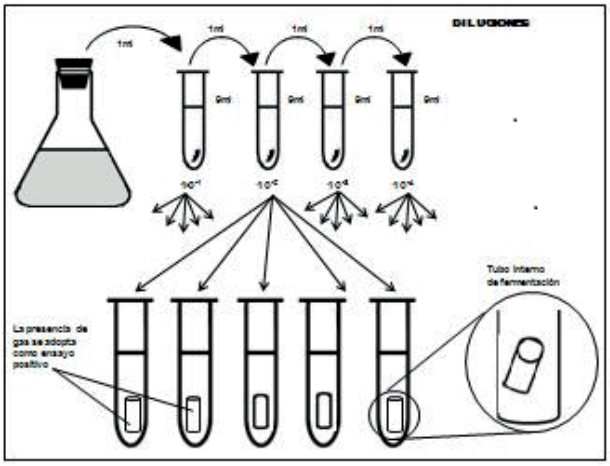


Figura 28. Método del número haciendo uso de 5 tubos por dilución.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

En el caso de una muestra de agua se debe tener en cuenta:

- *Cuando se analiza agua potable(aguas naturales y efluentes)* para determinar si su calidad cumple con las normas de los organismos gubernamentales, se utilizan 5 tubos de 10 ml de muestra en cada tubo o 10 tubos con 10 ml de muestra en cada tubo.
- *Cuando se analiza agua no potable,*se utilizan cinco tubos con diluciones decimales de la muestra de agua (10, 1, 0.1 ml).
- *Otras muestras:* esta técnica también se puede utilizar para el análisis de aguas saladas, lodos, sedimentos y fangos.

Criterios de lectura

La lectura del NMP depende del medio de cultivo utilizado y de los microorganismos investigados. Son parámetros frecuentes:

- Producción de gas en una reacción positiva, se observan las burbujas de gas en el tubo de Durham.
- Cambio de color, turbidez, formación de películas.
- Transformación del medio que sea detectable mediante prueba química.

Resultados

Una vez determinada la positividad de los tubos sembrados, los tubos con las replicaciones se colocan de izquierda a derecha de mayor a menor concentración (dilución más baja a la más alta).

La combinación de los resultados positivos configura un código que se busca en una tabla de probabilidad.

Los resultados se expresan como número más probable por 100ml (NMP/100 ml)

Número más probable para la identificación de coliformes

El grupo de coliformes está formado por todas las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, Gram negativas, no formadoras de esporas y con forma bacilar que fermentan la lactosa, produciendo gas y ácido en 48 horas a 35 ºC. Constituyen solo una parte de la microbiota total del tracto gastrointestinal.

La prueba se realiza en tres etapas que se denominan prueba presuntiva, prueba confirmativa y prueba complementaria o completa.

Materiales

Frasco de dilución de 90 ml de agua peptonada al 0.1 %

Tubos de ensayo con 9 ml. de agua peptonada al 0.1 %

Pipetas estériles de 1 y 5 ml o micropipetas

9 tubos con 10 ml de caldo Brila con tubo de fermentación (campana Durham) para la prueba presuntiva y 9 tubos para la prueba confirmativa

Agua triptona

Cajas con agar eosina azul de metileno (EMB comercial)

Reactivo de Kovacs

Incubadora a 35 ºC

Balanza

Gradillas

Espátulas

Asa de siembra

Mecheros

Muestra de agua

Procedimiento

Nota: observar si los tubos de caldo lactosado están con turbidez o burbujas en la campana de Durham antes de inocularlo.

a. ***Prueba presuntiva***

1. Mezclar y medir 100 ml de la muestra en una probeta estéril.
2. Hacer diluciones de la muestra.
3. Transfiera 1.0 ml de cada dilución, iniciando desde la dilución 10^{-3} continuando con las diluciones 10^{-2}y10^{-1}a 2 tubos de caldo lactosado.

4. Incubar los tubos a 35ºC durante 24 – 48 horas.
5. Evalué los tubos positivos para turbidez y producción de gas y anote el resultado.
6. Registre el número de tubos positivos y halle el número más probable de coliformes totales según la tabla de NMP.

b. ***Prueba confirmativa***

1. De cada tubo positivo (que presente gas) en caldo lactosado de la prueba de coliformes totales, inocular con asa un tubo con caldo lactosado y un tubo con agua de triptona.
2. Incubar a 44 ºC durante 24 horas.
3. Observar la formación de gas en caldo lactosado.
4. Efectuar prueba de indol sobre el agua de triptona.
5. Los tubos con producción de gas y reacción de indol positiva, se tienen en cuenta como coliformes fecales.

c. ***Prueba total***

1. Resembrar de los tubos que presentaron gas en la prueba confirmativa en cajas con agar EMB e incubar a 35 ºC durante 24 horas.
2. Tomar una o más colonias típicas y hacer pruebas bioquímicas para la caracterización de *E coli.*

Tabla 4. Número más probable con dos tubos por dilución

Número significativo	NMP	Límites de confianza (95 %)
000	0.0	
001	0.5	0.076-3.3
010	0.5	0.076-3.3
011	0.9	0.14-6.0
020	0.9	0.14-6.0
100	0.6	0.091-4.0
101	1.2	0.18-7.9
110	1.3	0.20-8.6
111	2.0	0.20-13
120	2.0	0.30-13
121	3.0	0.45-20
200	2.5	0.38-16
201	5.0	0.76-33
210	6.0	0.91-40
211	13.0	7.0-86
212	20.0	3.0-130
220	25.0	3.8-160
221	70.0	11-460
222	110.0	17-730

Medios de cultivo

Caldo- Lauril triptosa: (Merck®)

Triptosa	20 g
Lauril sulfato de sodio	0.1 g
Lactosa	5 g
Fosfato de hidrógeno dipotasico (K_2HPO_4)	2.75 g
Fosfato de dihidrógeno potasico (KH_2PO_4)	2.75 g

NaCL	5 g
Agua destilada	1000 ml
PH 6.8± 0.1	

Caldo lactosa-peptona: (Merck®)

Peptona de caseina	5 g
Peptona de harina de soja	3 g
Lactosa	10 g
NaCL	5 g
Púrpura de bromocresol	0,01 g
Agua destilada	1000 ml
PH 7.2± 0.1	

Caldo Brila (caldo de bilis verde brillante lactosa) Merck®

Peptona	10 g
Lactosa	10 g
Verde brillante	0.0133 g
Bilis de buey desecada	20 g
Agua destilada	1000 ml
PH 7.2± 0.1	

5.4 Filtración por membrana

Objetivo

Adquirir conocimientos sobre el manejo del sistema de filtración por membrana.

Introducción

La técnica de filtración por membrana (v**éanse** figuras 29 y 30) consiste en hacer pasar un volumen conocido de muestra liquida a través de un filtro de

membrana que tiene un tamaño de poro de 0.45 µm. Los microorganismos son retenidos sobre el filtro, ya que son de mayor tamaño que los poros del filtro de membrana. El filtro de membrana que contiene los microorganismos se pone entonces en contacto con el medio de cultivo que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Después de la incubación, las colonias son contadas y se calcula la concentración de estas en la muestra original del agua.

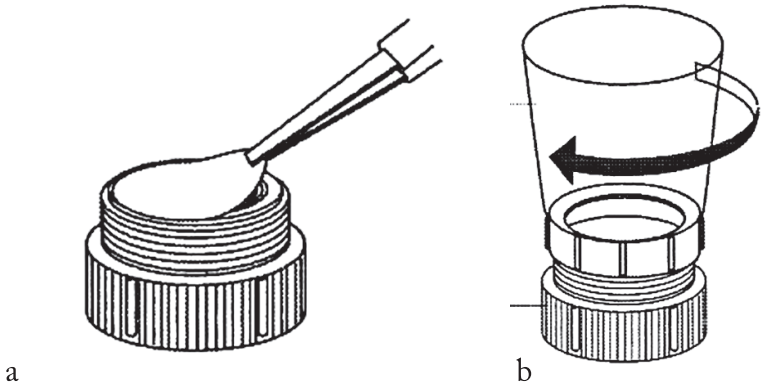


Figura 29. Filtración por membrana (a) Forma de colocar la membrana (b) colocación del embudo sobre la base.
Fuente: manual del equipo MarcaBarnant ® del Laboratorio Grupo Biología Ambiental

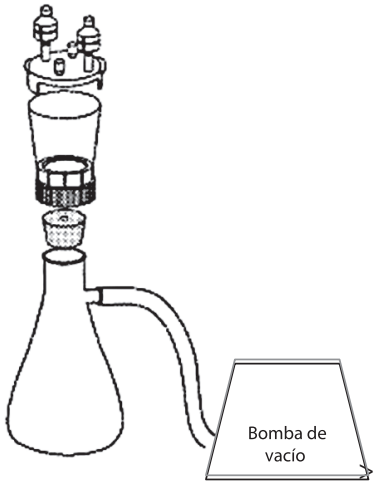


Figura 30. Sistema de filtración completo.
Fuente: manual del equipo Marca Barnant ® del Laboratorio Grupo Biología Ambiental

Materiales

Cajas de Petri con agar EMB o Cromocult

Membranas de 0,45 µm

Pinzas

Probeta de 100 ml estéril

Alcohol al 70 %

Equipo de filtración estéril con bomba de vacío

Muestra de agua

Procedimientos

1. Desenrosque el embudo de la base y coloque la membrana con el retículo hacia arriba haciendo uso de la pinza previamente desinfectada en alcohol (Figura 29a).
2. Enrosque nuevamente el embudo en la base.
3. Homogenice la muestra de agua y mida 100 ml en una probeta estéril.
4. Coloque los 100 ml de muestra en el embudo.
5. Aplique vacío hasta que la muestra se haya filtrado.
6. Cierre el vacío y desenrosque el embudo y retire con la pinza estéril la membrana con mucho cuidado.
7. Coloque la membrana con el retículo hacia arriba en el medio de cultivo.
8. Incube el medio de cultivo invertido a 35 °C por 22-24 horas
9. Cuente el número de colonias sobre la membrana e informe como UFC/100 ml de muestra

5.5 Turbidimetría (curva de crecimiento)

Objetivos

- Adquirir conocimientos para distinguir las diferentes fases de la curva de crecimiento.

- A partir de los datos obtenidos en el laboratorio, realizar las gráficas correspondientes en papel milimetrado y semilogarítmica.

Introducción

El crecimiento se ha definido como un aumento en la masa en una población. La duplicación de un cultivo bacteriano sigue los principios básicos de una reacción de primer orden con relación al número de células existentes. Las suspensiones bacterianas dispersan la luz, al igual que cualquier partícula pequeña suspendida en agua (efecto Tyndall). La dispersión de la luz es, dentro de ciertos límites, proporcional a la masa del cultivo.

Con el fin de evaluar el comportamiento de un cultivo bacteriano en el tiempo, se construyen las curvas de crecimiento, que son la representación gráfica de algún parámetro que mida el crecimiento equilibrado en función del tiempo. Además sirve para evaluar la cantidad de cualquier componente del sistema como ADN, ARN o proteínas.

A menudo, el crecimiento bacteriano se describe mediante otros parámetros entre los cuales el más frecuente es el tiempo de duplicación o tiempo de generación, que es el tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células.

La relación que existe entre el número de células y las generaciones de un cultivo creciendo en forma exponencial, puede deducirse matemáticamente de la manera siguiente:

x = número de bacterias al tiempo 0
y = número de bacterias al tiempo t
t = tiempo en crecimiento exponencial

Al tiempo 0 y = x

Después de:

1 generación $y = x.2$

2 generaciones $y = (x.2)\ 2 = 2^2\ x$

3 generaciones $y = (2^2\ x)\ 2 = 2^3\ x$

n generaciones y = 2^n x (Ecuación 1)

Para calcular n = (número de generaciones). Resolviendo la ecuación (1) para nse tiene:

$$\log y = \log x + n \log 2$$

Si se sustituye en la ecuación anterior log 2 por su valor 0.3010, se tiene que 1/0.3010 = 3.3

$$n = 3.3 \log y/x$$

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de x a y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

$$G= t/n$$

Espectrofotómetro

Este aparato es de uso habitual en cualquier laboratorio de microbiología o bioquímica. Mide la densidad óptica (DO), es decir, la absorbancia (una medida de la luz transmitida a través de la suspensión).

Nefelómetro

Es un aparato similar al anterior, pero el dispositivo sensor está situado en ángulo recto respecto de la dirección de la luz incidente, y lo que se mide es la luz dispersada directamente por la preparación. Posee mayor sensibilidad que el espectrofotómetro.

Espectrofotometría

La luz es de doble naturaleza, corpuscular y ondulatoria. Con base en su carácter ondulatoriola luz se comporta como una onda y cumple las leyes que rigen los movimientos ondulatorios: es reflejada, difractada, transmitida etc., está formada por un componente eléctrico y otro magnético, es decir, es electromagnética. Estos componentes son vectores perpendiculares entre sí. Con base en la naturaleza corpuscular, se considera que esta está formada por pequeños “corpúsculos” energéticos que se mueven en el espacio generando las ondas.

Espectro electromagnético

Se denomina espectro de un rayo luminoso al conjunto de radiaciones monocromáticas que forman ese rayo cuando ya han sido separadas.

Rango visible

Es el rango de radiaciones con longitudes de onda entre 400 y 700 nm, conforma el denominado rango visible humano.

Leyes que rigen la absorción de radiaciones electromagnéticas

La absorción de luz por una solución depende de la potencia de la radiación incidente (Po). A mayor potencia incidente, mayor será la potencia transmitida (Pt). La relación entre la potencia transmitida y el incidente se denomina transmitancia(T). La transmitancia se expresa con relación a 1 o a 100.

$$T = \frac{Pt}{Po} \quad \text{o} \quad \%T = \frac{Pt}{Po} \text{x}100$$

Se ha definido otra variable que es de mucha utilidad, que se denomina absorbancia.Cuando un rayo luminoso monocromático incide sobre un medio, este es absorbido siempre y cuando corresponda a su longitud de máxima absorción.

$$A=2-\log \%T$$

A medida que se explica el espectrofotómetro, escriba las diferentes partes del equipo en la Figura 31.

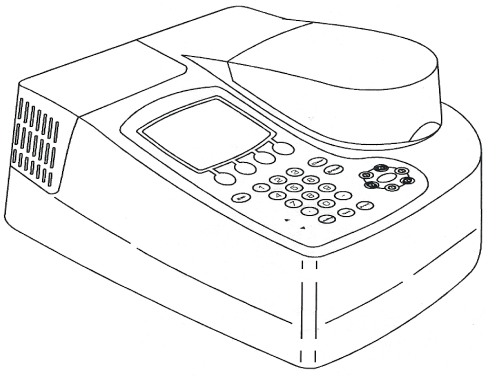


Figura 31. Espectrofotómetro.
Fuente: manual del equipo marca Genesys® del Laboratorio del Grupo de Investigación Biología Ambiental UPTC

Materiales

Cultivo en BHI de *E. coli* cepa de referencia de 24 horas de crecimiento

Caldo BHI comercial

Pipetas de 5 ml estériles

Espectrofotómetro

Parafilm®

Cubetas

Incubadora

Procedimiento

Nota: el equipo debe ajustarse a **600 nm**

Preparación de las diluciones seriadas a partir de la suspensión bacteriana en BHI de E. coli de 24 horas de crecimiento:

1. Adicione 4 ml de caldo BHI estéril en 4 tubos marcados (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16).
2. Coloque 4 ml de Cultivo en BHI de *E. coli* de 24 horas de crecimiento en el tubo marcado como 1/2, mezcle y tome 4 ml de este tubo y deposítelo en el tubo marcado 1/4, y a continuación realice las dos siguientes diluciones.
3. La lectura en el espectrofotómetro se realiza llevando el equipo a cero de absorbancia y 100 % de transmitancia con la cubeta blanca (BHI estéril).
4. Realice la lectura de las 4 diluciones y anote el valor obtenido en la siguiente tabla:

Diluciones	Absorbancia	Transmitancia
1:2		
1:4		

Diluciones	Absorbancia	Transmitancia
1:8		
1:16		

5. Una vez realizadas las lecturas de los diferentes tiempos de crecimiento, realice la curva.

Curva de crecimiento a partir de 50 ml de BHI con preinóculo al 1% de E.coli

1. A 50 ml de caldo BHI estéril adicione el preinóculo de la *E. coli* al 1%. Mezcle
2. Tome de los 50 ml del BHI y rellene una cubeta y realice la lectura en el espectrofotómetro
3. Lleve el caldo de BHI a la incubadora a 37°C.
4. Realice lecturas mezclando previamente el BHI antes de servir la cubeta a los 20, 40 minutos, 1h, 1 h 20 minutos, 1 h 40 minutos, 2h, 2 h 20 minutos, 2 h 40 minutos, 3 h.

Nota: en los intervalos de tiempo en que no se estén realizando lecturas, el BHI debe mantenerse en la incubadora a 37°C.

5. La lectura en el espectrofotómetro se realiza llevando el equipo a cero de absorbancia y 100 % de transmitancia con la cubeta blanca (BHI estéril).
6. La lectura se anotan en la siguiente tabla:

Tiempo	Absorbancia	Transmitancia
0		
20 min		
40 min		

Tiempo	Absorbancia	Transmitancia
1 hora		
1 hora 20 min		
1 hora 40 min		
2 horas		
2 horas 20 min		
2 horas 40 min		
3 horas		

7. Una vez realizadas las lecturas de los diferentes tiempos de crecimiento, realice la curva.

Capítulo 6

Control del crecimiento microbiano

6.1 Factores físico-químicos sobre el proceso de crecimiento de microorganismos

Objetivo

Reconocer la influencia de factores físicos sobre el proceso de crecimiento de bacterias y hongos.

Introducción

El calor y otros agentes físicos se suelen utilizar para esterilizar objetos, como lo demuestra el uso que tiene el autoclave en todos los laboratorios de microbiología. Los cuatro agentes físicos empleados con más frecuencia son calor, filtración, radiación ultravioleta y radiación ionizante (Prescott et al., 1999; Talaro, 2005).

Definiciones (OMS 2005)

- *Antiséptico*: sustancia que inhibe el crecimiento microbiano, pero no necesariamente las mata. Suele aplicarse a las superficies corporales (piel, mucosas). Ejemplos: mercuriales, nitrato de plata, solución de yodo, alcoholes
- *Bactericida:* cualquier agente físico o sustancia o mezcla de sustancias químicas capaz de matar algún tipo de bacterias

- *Bacteriostático:* agente que inhibe el crecimiento y reproducción de algunos tipos de bacterias.
- *Desinfectante*: sustancia o mezcla de sustancias químicas que mata microorganismos, pero no necesariamente esporas. Suelen aplicarse a superficies u objetos inanimados como superficies, utensilios etc. Ejemplos: cloro, hipoclorito, compuestos clorados, soda caustica, sulfato de cobre, compuestos de amonio cuaternario etc.
- *Esterilización*: proceso que mata o elimina todas las clases de microorganismos, esporas de bacterias y hongos y partículas virales.
- *Funguicida*: agente químico o físico con capacidad para matar hongos
- *Fungistático*: agente químico o físico que puede impedir o detenerle crecimiento de algunos hongos

Factores que tienen que ser considerados a la hora de aplicar agentes químicos o físicos para el control de microorganismos

- *Concentración del agente químico*: mientras más concentrado esté el agente químico, más rápido se destruirán los microorganismos.
- *Intensidad del agente físico*: cuanto más intenso es el agente físico (calor o radiación), más rápidamente mata a los microorganismos.
- *Tiempo de exposición*: a mayor tiempo de exposición, mayor es el número de microorganismos destruidos.
- *Temperatura:* a mayor temperatura, se acelera la destrucción de los microorganismos.
- *Número de microorganismos:* mientras mayor sea el número de microorganismos, más tiempo se requiere para destruirlos.
- *Clase de microorganismo*: las células bacterianas vegetativas (las que están metabólicamente activas) son más susceptibles que las esporas.
- *Estado fisiológico de las células*: mientras más viejos sean los microorganismos, más rápido se destruyen.
- *Naturaleza del medio ambiente*: algunos ambientes desfavorecen la destrucción rápida de los microorganismos, como por ejemplo los medios viscosos.

Métodos físicos

a. Calor

1. *Esterilización por calor húmedo*: Ebullición, Autoclave

2. *Esterilización por calor seco:* Flameado, Incineración, Horno

3. *Pasteurización*

b. Filtración

c. Bajas temperaturas: Refrigeración, Congelación, Liofilización

d. Desecación

e. Presión osmótica

f. Radiaciones electromagnéticas:

- *Ionizantes:* rayos gamma, rayos X, haces de electrones de alta energía o rayos beta o catódicos
- *No ionizantes*: luz ultravioleta, microondas.

Calor

Como el calor es tan eficaz para destruir los microorganismos, es esencial disponer de una medida precisa de su eficacia termodestructiva.

- Inicialmente, esta eficacia se expresaba con el **punto de muerte térmica** (**PMT)**, la temperatura más baja a la que una suspensión microbiana se destruye en 10 minutos. Como el PMT implica que una determinada temperatura es inmediatamente letal a pesar de las condiciones ambientales.
- **(TMT) tiempo de muerte térmica**. Es el tiempo más corto necesario para destruir todos los organismos de una suspensión microbiana, a una temperatura específica y en condiciones definidas. Sin embargo, esta destrucción es logarítmica y. en teoría, no es posible "destruir completamente" los microorganismos de una muestra, incluso aumentando el tiempo de calentamiento.

- T**iempo de reducción decimal (*D*) o valor *D***: es el tiempo necesario para destruir el 90% de los microorganismos o esporas en una muestra a una temperatura específica. El valor *D* se escribe normalmente con un subíndice, que indica la temperatura que se aplica.
- El **valor *z*:** es el aumento de temperatura necesario para reducir *D* a 1/10 de su valor, o en un ciclo logarítmico cuando se representa log *D* frente a la temperatura.
- Otro método para describir la eficacia del calentamiento es el **valor *F*:** es el tiempo, en minutos y a una temperatura determinada (normalmente, 121.1 ˚C), necesario para

Métodos químicos

Son compuestos que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos. Incluyen sustancias usadas como conservantes, antisépticos y antibióticos que se utilizan para el tratamientos de enfermedades infecciosas en humanos, animales y plantas.

Los conservantes son usados en alimentos, productos farmacéuticos, cosméticos para inhibir el crecimiento de microorganismos. Ejemplos: propionato de calcio, benzoato de sodio, formaldehído , nitrato, dióxido de azufre,

a. Fenol y compuestos fenólicos (fenol al 5%, hexilresorcinol, hexaclorofenol)
b. Alcoholes (etanol al 50-70%, isopropanol al 50-70%)
c. Halógenos Tintura de yodo (2% I_2 en 70% alcohol), cloro, hipoclorito de sodio
d. Metales pesados y sus compuestos (nitrato de plata, sulfato de cobre, cloruro de mercurio, marthiolate)
e. Colorantes (cristal violeta, verde de malaquita)
f. Detergentes aniónicos, catiónicos, anfóteros, enzimáticos
g. Compuestos de amonio cuaternario (sales de amonio cuaternario)
h. Ácidos y álcalis **(ácido sulfúrico, ácido nítrico, hidróxido sódico, hidróxido potásico)**
i. Aldehídos, Glutaraldehído (formaldehído al 8%)
j. Quimioestabilizadores gaseosos (óxido de etileno, beta propiolactona, formol)

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Suspensiones bacterianas de un bacilo Gram negativas de la Familia Entrerobacteriaceae y bacilo Gram positivo

Suspensiones de mohos y levaduras

Cepas controles (*E. Coli* y *S. aureus*) en caldo nutritivo con una concentración de10^8 -10^9 **células/ml**

Caldo nutritivo (CN)

Caldo Sabouraud (CS)

Baño serológico

Horno de aire caliente a 175 ºC

Autoclave

Procedimientos

Métodos físicos

Calor:

Esterilización por calor húmedo: ebullición

1. Servir una asada de la suspensión bacteriana o fúngica en caldo nutritivo/ caldo Saboraud respectivamente y someterla al siguiente procedimiento:

Suspensión microorganismo inicial	**Tiempo**			
	5 min	**Más** 10 min (tiempo total: 15 min)	**Más** 15 min tiempo total: 30 min)	Repique en CN o CS estéril **(X*)** después de cada tiempo de ebullición
CN con bacilo Gram negativa	**X (*)**	**X (*)**	**X (*)**	Dos asadas
CN con bacilo Gram positivo	**X (*)**	**X (*)**	**X (*)**	Dos asadas
CS con un hongo filamentoso	**X (*)**	**X (*)**	**X (*)**	Dos asadas
CS con una levadura	**X (*)**	**X (*)**	**X (*)**	Dos asadas
Total de tubos por microorganismo para incubar	3 tubos			

2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 ºC/24-48 horas y CS 28 ºC por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor húmedo: esterilización (121 ºC, 15 libras de presión, 15 minutos)

1. Coloque la suspensión bacteriana del bacilo Gram positivo y de un hongo filamentoso por 15 minutos en el autoclave. Luego tome dos asadas de la suspensión bacteriana o fúngica en un CN o CS estéril respectivamente.
2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 ºC/24-48 hora y CS 28 ºC por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor seco: flameado

1. Tome una asada de la suspensión bacteriana o fúngica y esterilice el asa en el mechero (parte baja de la llama) y luego introduzca el asa en un CN o CS estéril respectivamente.

2. Incubar los tubos de CN repicados a 37 ºC/24-48 hora y CS 28 ºC por 5 días respectivamente.

Esterilización por calor seco: horno (estufa de aire caliente (1 hora/170-180 ºC)

1. Tome una asada de la suspensión bacteriana o fúngica y deposítela en un CN o CS estéril respectivamente.
2. Lleve la suspensión bacteriana o fúngica a la estufa por una hora/175 ºC.
3. Una vez transcurrido este tiempo, tomar una asada de esta suspensión y colocarla en otro CN o CS estéril respectivamente.
4. Incubar los tubos de CN repicados a 37 ºC/24-48 horas y CS 28 ºC por 5 días respectivamente.

Radiaciones electromagnéticas: luz ultravioleta

1. Tome 4 cajas de AN y márquelas de la siguiente forma: control, caja número 1, 2, 3. A continuación divídalas en dos partes.
2. Tome 4 cajas de AS y márquelas de la siguiente forma: control, caja número 1, 2, 3. A continuación divídalas en dos partes.
3. Marque cada una de las partes de la caja de AN control con *E. Coli* y *S. aureus*.
4. Marque cada una de las partes de la caja AS control con el género del hongo filamentoso y levadura.
5. Introduzca un escobillón estéril dentro de cada emulsión bacteriana / emulsión de hongo filamentoso y levadura y rótelo contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo, todo bajo condiciones asépticas.
6. Siembre en cada una de las partes con el microorganismo correspondiente.
7. Someta las cajas a la luz ultravioleta de la siguiente manera:

Placa de Petri	Tiempo	Lectura (*)
Control	0 seg	
5	5 min	
6	30 min	
7	40 min	

Nota:en la cabina de flujo laminar, remueva la cubierta de la caja, colóquela al lado y cúbrala con la lámpara de luz ultravioleta.

6. Incube las placas a 37 ºC por 24 a 48 horas.

Lectura:

1.Realice las lecturas de las cajas y los tubos y estime el crecimiento teniendo en cuenta:

-: sin crecimiento

+: crecimiento escaso

++: crecimiento moderado

+++: crecimiento abundante

y complete el siguientes cuadro:

2.complete los cuadros que están a continuación

Microorganismo inoculado	**Ebullición**			**Autoclave**	**Flameado**	**Horno**
	5 min	15 min	30 min			

Agente físico	**Mecanismo de Acción**	**Usos**
Ebullición		
Pasteurización		
Autoclave	Desnaturalizando proteínas y afectando todos los componentes celulares	
Flameado		
Incineración		
Horno	Oxidación de las proteínas	Material de vidrio, instrumentos de metal o aceites y polvos que soporten esas altas temperaturas
Refrigeración		

Agente físico	Mecanismo de Acción	Usos
Congelación		
Liofilización		
Presión osmótica	Deshidrata e inhibe el crecimiento bacteriano o fúngico	
Rayos gamma	Ioniza el agua y otras moléculas para formar radicales que pueden romper las hebras de ADN.	Guantes, suturas, catéteres, jeringas e incluso placas de Petri. También está aceptado su uso para disminuir la carga microbiana en alimentos.
Rayos X	Ioniza el agua y otras moléculas para formar radicales que pueden romper las hebras de ADN	Guantes, suturas, catéteres, jeringas e incluso placas de Petri. También está aceptado su uso para disminuir la carga microbiana en alimentos
Haces de electrones de alta energía o rayos beta o catódicos		
Luz ultravioleta Incluye longitudes de onda entre 100-400 nm	Su actividad microbicida depende de la longitud de onda, tiempo de exposición, material que debe atravesar. Siendo las longitudes de 260-270 nm .	
Microondas		
Filtración	Retiene a los microorganismos en la superficie	Esterilizar soluciones, especialmente en aquellos casos en que no se pueda realizar esterilización por calor.

6.2 Desinfectantes, antisépticos y antibióticos

Objetivo

Reconocer la influencia de los factores químicos sobre el proceso de crecimiento de bacterias.

Introducción

Los antimicrobianos son sustancias químicas orgánicas e inorgánicas, naturales o sintéticas, con capacidad para matar o inhibir a los microorganismos. Dentro de estos se encuentran los desinfectantes, los antisépticos y los antibióticos.

Los antibióticos son productos del metabolismo secundario microbiano, que presentan acción letal sobre otros microorganismos. Incluyen agentes antibacterianos, agentes antivirales, agentes antifúngicos y agentes antiparasitarios (antiprotozoos y antihelmintos). Su función consiste en dar ventaja al microorganismo productor para que pueda colonizar ambientes con más eficacia que sus competidores. Algunos géneros bacterianos capaces de producir antibióticos son *Sterptomyces* y *Bacillus* y hongos como *Penicillium.*

Materiales

Asa bacteriológica redonda y recta

Suspensiones en BHI de 12-24 horas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* con una concentración de 10^8 -10^9 **células/ml**

Escobillones estériles

Agar nutritivo (AN)

Caldo nutritivo (CN)

Agar Mueller Hinton

Discos de papel filtro estériles impregnados con hipoclorito de sodio (5 %), jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso

0.5 ml de hipoclorito de sodio (5 %), jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso

Discos impregnados con antibióticos

Pinzas

Pipetas de 1 ml

Procedimiento

Desinfectantes, antisépticos

Siembra del microorganismo sobre placas de AN con el químico incorporado

1. Verter en el fondo de una caja de Petri vacía y estéril 0.5 ml de hipoclorito al 5 %, jabón líquido para manos, jabón que se utiliza para la limpieza de los materiales de laboratorio, isodine y un desinfectante para el piso. Una caja por sustancia.
2. Adicionar 15 ml del AN fundido (45-50 ºC) a cada caja y homogenizar suavemente.
3. Dividir la placa en 4 sectores y sembrar en estría los dos microorganismos.
4. Marcar las cajas e incubar en posición invertida a 37 ºC por 24-48 horas.

Técnica de discos impregnados con desinfectantes, antisépticos sobre placa con siembra masiva del microorganismo

1. Introducir un escobillón estéril dentro de la emulsión bacteriana o fúngica y rotarlo contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo, todo bajo condiciones asépticas.
2. Sembrar masivamente con el escobillón sobre la superficie del medio.
3. Tomar con pinzas estériles los discos de papel filtro impregnados con las diferentes sustancias y escurrirlos.
4. Colocar cada uno de los discos dejando una distancia uniforme entre ellos (aprox. 2 cm) (Figura 32).

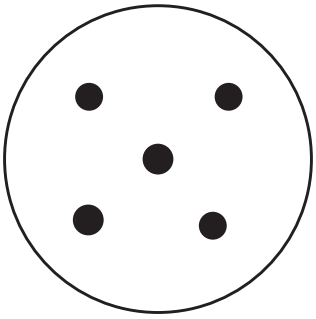


Figura 32. Distribución de los discos.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

5. Presionar los discos ligeramente sobre el medio para asegurar el contacto, marcar las cajas e incubar en posición invertida a 37 ºC por 24-48 horas.
6. Observar crecimiento y diámetro de las zonas de inhibición.

Antibióticos (antibiograma)

1. Sembrar masivamente con el escobillón impregnado previamente con el microorganismo sobre la superficie del medio agar Mueller Hinton.
2. Colocar los discos dejando una distancia uniforme entre ellos (aprox. 2 cm) con las pinzas estériles (Figura 31).
3. Presionar los discos ligeramente sobre el medio para asegurar el contacto, marcar las cajas e incubar a 37 ºC por 48 horas.
4. Observar crecimiento y diámetro de las zonas de inhibición

Lectura:

Realice las lecturas de las cajas y complete los siguientes cuadros:

Microorganismo Inoculado	**Desinfectantes y antisépticos**				
	Hipoclorito de sodio (5 %) (HS)	**Jabón líquido de manos (J)**	**Jabón limpieza materiales de laboratorio (JL)**	**Isodine (I)**	**Desinfectante (D)**

Microorganismo Inoculado	Antibióticos				
	Antibiótico 1	Antibiótico 2	Antibiótico 3	Antibiótico 4	Antibiótico 5

Agente químico	Mecanismo de Acción	Usos
Fenol al 5%		
Hexilresorcinol, hexaclorofenol	Desnaturalizan proteínas y rompen las membranas celulares	Antisépticos a bajas concentraciones, desinfectantes a altas concentraciones
Etanol (50-70%)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico usado en piel
Isopropanol (50-70%)	Desnaturaliza proteínas y solubiliza lípidos	Antiséptico usado en piel
Tintura de yodo		
Cloro (Cl_2) gas	Forma ácido hipocloroso (HClO), un fuerte agente oxidante	Desinfección en general y en particular para agua potable
Hipoclorito de sodio		

Agente químico	Mecanismo de Acción	Usos
Metales pesados y sus compuestos		
Metales pesados y sus compuestos :timerosal (merthiolate)		
Cristal violeta		
Sales de amonio cuaternario		
Detergentes		
Ácidos y álcalis		
Aldehídos: Formaldehído (8%)	Reacciona con grupos-NH_2, -SH y -COOH	Desinfectante, mata endosporas
Óxido de etileno	Agente alquilante	Desinfectante usado para esterilizar objetos sensibles al calor como goma y plásticos

Capítulo 7

Hongos: formas filamentosas y levaduras

Objetivos

- Describir las colonias macroscópicas de hongos.
- Practicar las diferentes formas de siembra.
- Elaborar montajes en frescos.
- Identificar las estructuras importantes en la reproducción asexual de los hongos.

Introducción

Los hongos provienen de la palabra griega (*mykes:* seta). Son microorganismos quimioorganotrofos o heterotrófos, e ingieren su alimento por absorción. Su pared está hecha de un polisacárido llamado quitina, pero también puede contener celulosa. No son móviles, pero en algunos casos sus esporas sí lo son; pueden ser haploides, homocarióticos, heterocarióticos, dicarióticos o diploides, etc.

El nombre de hongos se ha designado a organismos que se parecen morfológicamente entre sí, pero que no están filogenéticamente relacionados y por tanto forman un grupo heterogéneo de seres vivos (Bruns, White & Taylor, 1991). En contraste, los hongos comúnmente llamados verdaderos, son un grupo monofilético formado por organismos eucarióticos y heterótrofos

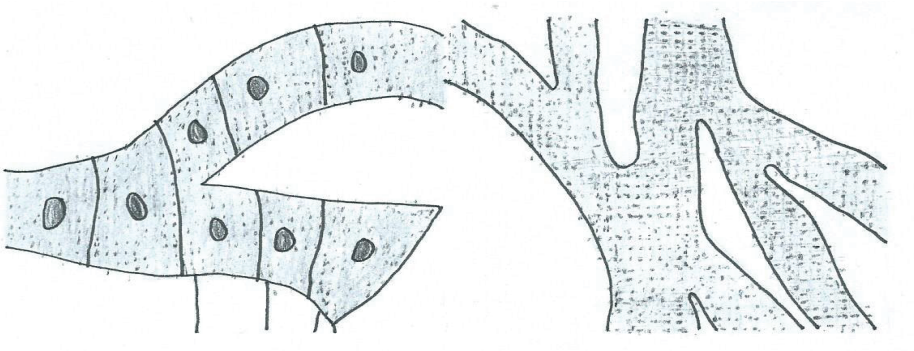
que se nutren por absorción, presenta crecimiento apical y tiene quitina en su pared celular (Jennings, 1995; Kevin, 2005; Maheshwari, 2005; Ferrera-Cerrato & Alarcón, 2007).

Para estudios en el laboratorio se dividen en tres grupos importantes:

- Hongos filamentosos o mohos.
- Hongos levaduriformes.
- Setas

Hongos filamentosos

Los mohos son hongos filamentosos, cada filamento aislado se llama hifa. Cada filamento crece fundamentalmente en el ápice, por extensión de la célula terminal. Las hifas crecen formando bolas compactas que colectivamente se conocen como micelio o talo. El micelio puede ser septado o aseptado o cenocítico (Figura 33).



a b

Figura 33. Tipos de hifas: a. Hifa septada, b. Hifa aseptada.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Tipos de micelio

Micelio vegetativo, porción del micelio que se extiende en el sustrato del medio de cultivo y tiene como función la absorción del agua y los nutrientes.

Micelio aéreo o micelio reproductor, es la porción que se proyecta sobre el sustrato.

Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares. Normalmente son células ovales o cilíndricas.

Morfología macroscópica

Es esencial que la descripción se base en cultivos, de 1 a 3 semanas de edad.

Textura

- *Cremoso:*
  Blando de consistencia (levaduriforme).
- *GRANULAR:*
  Más grueso que polvoriento.
- *POLVORIENTO:*
  Como harina, polvo, talco.
- *ATERCIOPELADA:*
  Como terciopelo o pana.
- *ALGODONOSA:*
  Lanosa.

El orden de jerarquía de la característica que debe tomarse en cuenta al observar una colonia es: *granular* o *polvorienta* tiene prioridad sobre *aterciopelada,* aunque sea granular o polvorienta en pequeña proporción.

Color

- *Colores brillantes:* azul, verde, amarillo.
- *Dematiáceos:* castaño, gris o negro.
- *Pigmentos difusibles al medio.*

Morfología microscópica

Típicamente, los hongos se reproducen asexual y sexualmente, formando esporas en estructuras reproductoras características, con base en las cuales se separan los diferentes filos.

Reproducción sexual o fase perfecta o teleomorfa o meiospórico

La reproducción sexual la hacen a través de los siguientes pasos:

1. Un núcleo haploide de una célula donante (macho) penetra el citoplasma de una célula receptora (hembra).
2. Se fusionan los núcleos para formar un núcleo zigótico diploide.
3. Por meiosis, el núcleo diploide origina cuatro núcleos haploides, algunos de los cuales pueden ser recombinantes genéticos.

De este proceso de reproducción sexual, resultan las esporas sexuales, las cuales son usualmente más resistentes al calor que las esporas asexuales, y presentan latencia, es decir, ellas solo germinan cuando son activadas ya sea por un calentamiento suave o por ciertas sustancias químicas (Figura 34).

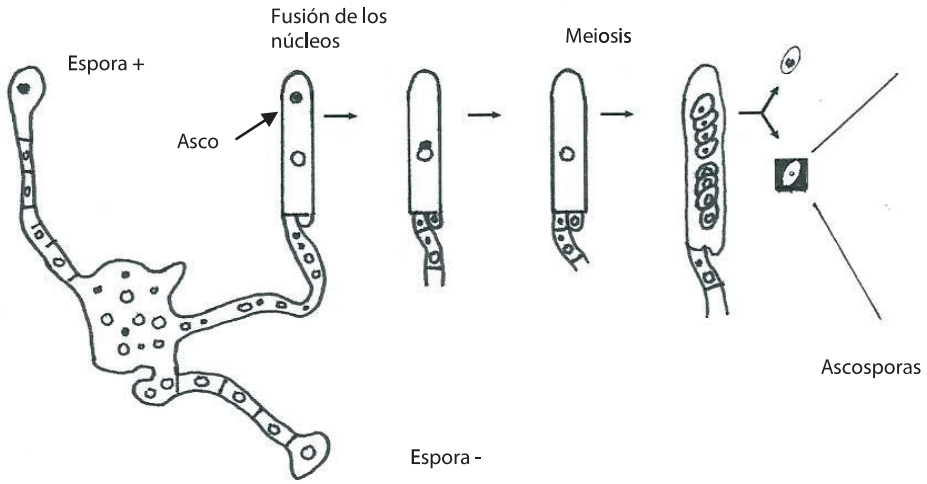


Figura 34. Ejemplo de la reproducción sexual.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Reproducción asexual o fase imperfecta o anamorfa

Los procesos asexuales implican división de los núcleos y formación de nuevos hongos sin participación de gametos y sin fusión nuclear. También se denomina multiplicación vegetativa. Este tipo de reproducción se da a partir de **micelio vegetativo** y del **micelio aéreo** (Figura 35).

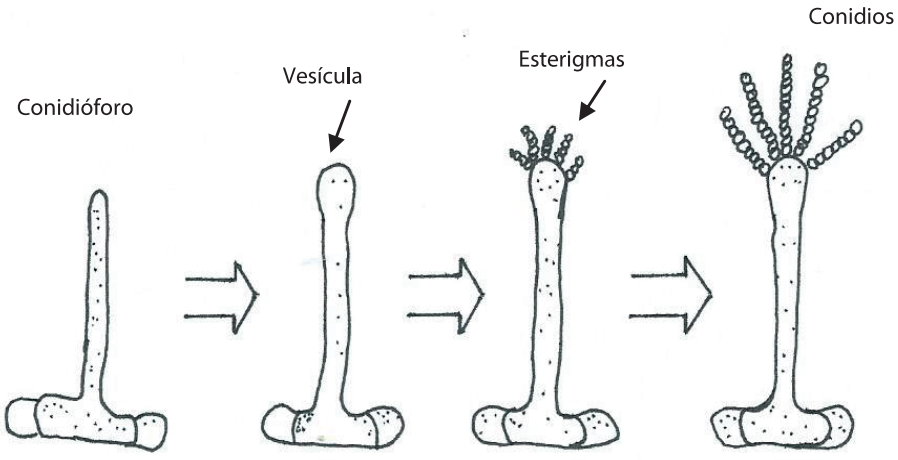


Figura 35. Ejemplo de la reproducción asexual.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

La reproducción asexuada se lleva a cabo por diferentes mecanismos que incluyen:

1. Esquizogénesis, o fisión, o bipartición.
2. Gemación.
3. Formación mitótica de esporas o esporulación seguida de germinación de las esporas.
4. Fragmentación de hifas o formación de conidios.

Estas esporas no presentan latencia, es decir ellas pueden germinar cuando dispongan de humedad aún en ausencia de nutrientes.

1. Esquizogénesis, o fisión o bipartición:

Se observa únicamente en hongos unicelulares. Consiste en la elongación y formación de un tabique transversal en las células y la invaginación de la membrana, dando por resultado dos células exactamente iguales. Ejemplo, algunos hongos levaduriformes: *Schizosaccharomyces* sp.

2. Gemación:

Da lugar a las blastosporas. El protoplasma de las células forma a partir de la pared un pequeño crecimiento externo, llamado brote o yema. Luego de la

formación de una yema o célula hija, por evaginación de la membrana, resultan dos células (madre e hija), de diferente tamaño. El brote puede separarse de la célula madre o quedar unido a ella, y si se forman nuevos brotes, llegan a constituirse pequeñas cadenas de células o seudomicelios.Esta reproducción se puede observar en diversos hongos, especialmente levaduras. Ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 36).



Figura 36. Levaduras en gemación.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

De las hifas aéreas se originan y se extienden por la superficie del micelio cuerpos de fructificación especializados que dan lugar a una variedad de esporas o conidios.

3. Formación mitótica de esporas:

Las esporas se forman a veces en cualquier sitio del micelio, separadas unas de otras, o pueden quedar agrupadas, dispuestas de manera constante y característica por cada grupo de hongos, constituyendo cuerpos fructíferos denominados esporóforos o esporangios, dentro de los cuales se producen las esporas.

Esporas:

Por su origen, disposición, agrupamiento, número de células, estructura y otros caracteres, las esporas reciben nombres muy diversos como esporangiosporas, conidiosporas, clamidosporas, artrosporas, zoosporas, aplanosporas, picnidiosporas, entre otros términos.

- *Tamaño:* microscópico, aunque de dimensiones muy diversas.

- *Forma:*puede ser esférica, hemisférica, cilíndrica, ovoide, poliédrica, de huso, de hoz u otra.
- *Aspecto externo de su pared:*son lisas, estriadas, verrugosas, punteadas o aciculadas.
- *Color*: con coloraciones amarillas, rojizas, anaranjadas, verdes, azules o negruzcas.
- *Número de células:* pueden ser unicelulares, bicelulares o pluricelulares**.**
- *Esporangiosporas:* son esporas que se forman dentro de una estructura en forma de saco, denominada esporangio. La hifa que porta el esporangio se denominaesporangióforo(del griego *Phoros*: "que sostiene"). Este tipo de esporulación es característico de Zygomicetos (Figura 37).
- *Conidiosporas:* son esporas delgadas que se encuentran en grupos o solas sobre hifas especializadas llamadas conidióforos**.** Algunos autores llaman conidiosporas a todas las esporas asexuales.
- *Clamidosporas:*esporas esféricas u ovoides de pared gruesa que se forman dentro de las hifas somáticas. Son más resistentes al calor y a la desecación que las otras esporas asexuales.
- *Astrosporas:*son esporas de paredes delgadas que se forman por fragmentación de las hifas.

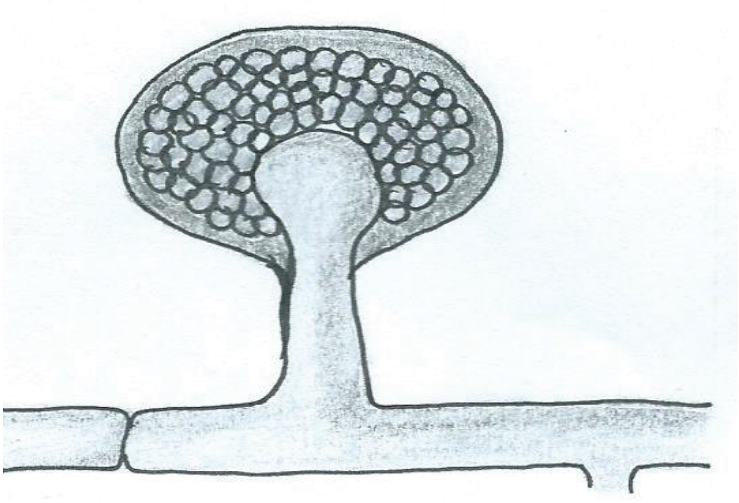


Figura 37. Formación de esporas (*Mucor*).
Fuente: Aura Lizarazo Forero

4. Fragmentación de hifas o formación de conidios

Los conidios se forman de un elemento preexistente, pues en la parte terminal o intercalar de una hifa se configura un conidio después de la constitución de un tabique. El conidio es una mitospora (de origen mitótico) no móvil, no se forma dentro de un saco, se desprende fácilmente de la célula que da origen y no se crea por segmentación del citoplasma. El segmento especializado de la hifa que sostiene la cabeza de fructificación que tiene los conidios, se llama conidióforo. Los conidióforos pueden ramificarse en segmentos secundarios denominados métulas, que, a su vez, forman segmentos productores de conidios: las fiálides (ejemplo, *Penicillium*, véase Figura 38).

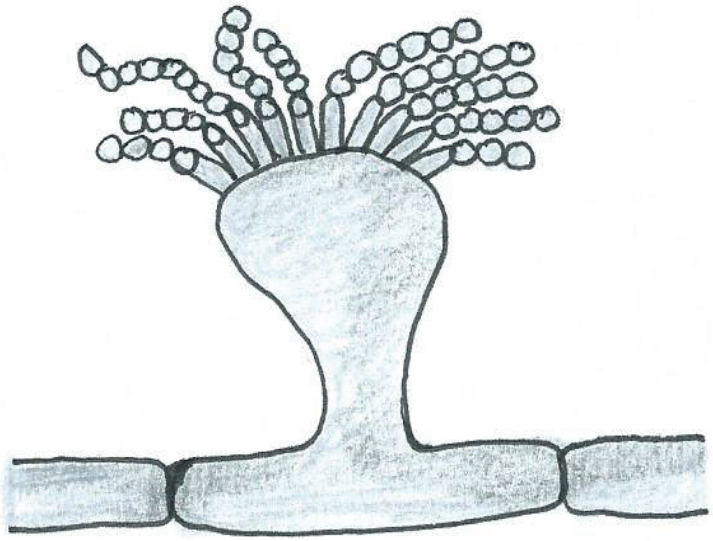


Figura 38. Formación de conidios (*Penicillium*).
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Si los conidiostoman el color azul al hacer una lámina con el azul de lactofenol, se llaman hialoconidios (ejemplo, *Fusarium*, véase Figura 39).

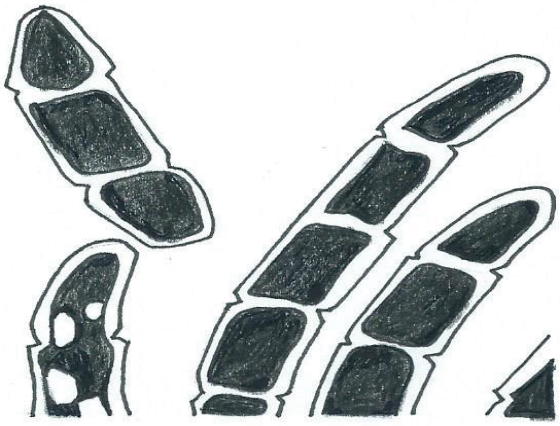


Figura 39. Formación de conidios (*Fusarium*).
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Si los conidios tienen el color café son faeconidios(ejemplo, *Curvularia*, véase Figura 40).

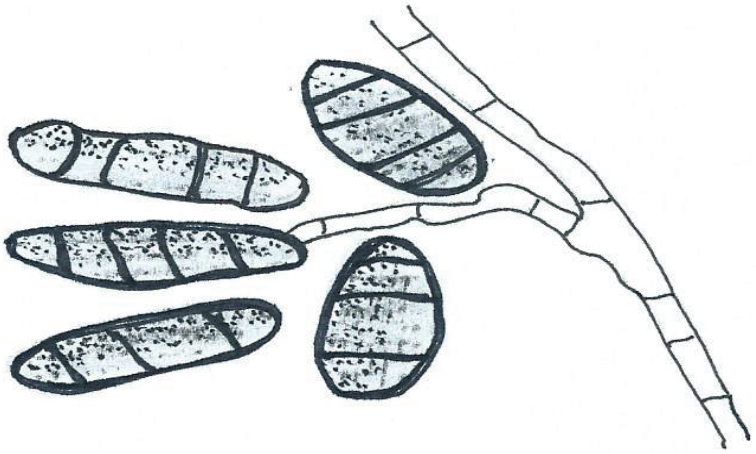


Figura 40. Formación de conidios (*Curvularia*).
Fuente: Aura Lizarazo Forero.

Según el número de células que tenga un conidio, se llama:

- *Ameroconidio*: si tiene una sola célula (sin septo).
- *Didimoconidio*: si tiene dos células (un solo septo).

- *Dictioconidio*: si tiene septos transversales y horizontales.
- *Fragmoconidio*: si tiene septos horizontales.

Del micelio vegetativo se forman tres tipos de esporas o conidios:

- *Blastoconidios:*espora de reproducción asexual, que se origina por gemación, como la de las levaduras y algunos hongos filamentosos. Ejemplo, *Torulopsis*, *Kloeckera*, y *Candida,* dentro de las levaduras. *Monilia* y *Cladosporium,* dentro de los hongos filamentosos**.**
- *Clamidioconidios (clamidosporas):* se forman a partir de células preexistentes en la hifa, que se engrosa y a menudo se agranda. Las clamidoconidias pueden encontrarse dentro de la hifa (intercalar), junto a uno de sus lados (sésil) o en su extremo (terminal).
- *Artroconidios*: también se forman a partir de células preexistentes en las hifas, que se agrandan y engrosan. Cuando maduran, estos conidios se liberan por la lisis de las células adyacentes de la hifa. Ejemplo, *Geotrichum***.**

Materiales y reactivos

Portaobjetos

Cubreobjetos

Asa micológica

Microscopio

Esteroscopio

Azul de lactofenol

Tubos y cajas de medio Sabouraud

Tubos y cajas medio PDA (agar dextrosa patata)

Muestras de verduras, frutas, etc., enmohecidas

Muestras tomadas del ambiente

Azul de lactofenol

microcultivos

Pinzas

Cinta transparente

Procedimientos

1. Exposición al ambiente

Exponga las cajas de Sabouraudo PDA durante 20 minutos en el lugar indicado previamente. Marque las cajas especificando lugar, hora, fecha. Incube entre 28-30 grados centígrados hasta que se observe crecimiento (hacer seguimiento por 5 días).

2. Recuento microscópico directo de levaduras

Para realizar este procedimiento los estudiantes deben revisar el capítulo 5

3. Siembra

- *Tipos de siembra*

Siembra en tubo:

1. Flamee el asa micológica.
2. Destape el tubo de medio de cultivo.
3. Introduzca el asa micológica y enfríela en el medio haciendo una canal.
4. Tome con el asa ya fría un inóculo de una colonia fúngica.
5. Destape nuevamente el tubo estéril, introduzca el asa y coloque el inóculo en el canal.

Siembra en caja de Petri:

1. Flamee el asa micológica.
2. Enfríe el asa en un extremo de la caja de Petri con medio estéril.
3. Tome el inóculo de colonia fúngica.
4. Coloque el inóculo en el centro de la caja.
5. Incube a temperatura de 25-30 ^{o}C los tubos y cajas e incube por 5 días.

Teniendo en cuenta las indicaciones previas, siembre en la caja de Petri o tubos a partir de los alimentos enmohecidos. Incube a 25-30 grados centígrados, hasta que se observe crecimiento (aproximadamente 5 días).

3. Microcultivo

1. Siembre utilizando el montaje (Figura 39).
2. Una vez que haya realizado su siembra, adicione agua estéril y lleve a incubación a temperatura ambiente de 4-8 días.

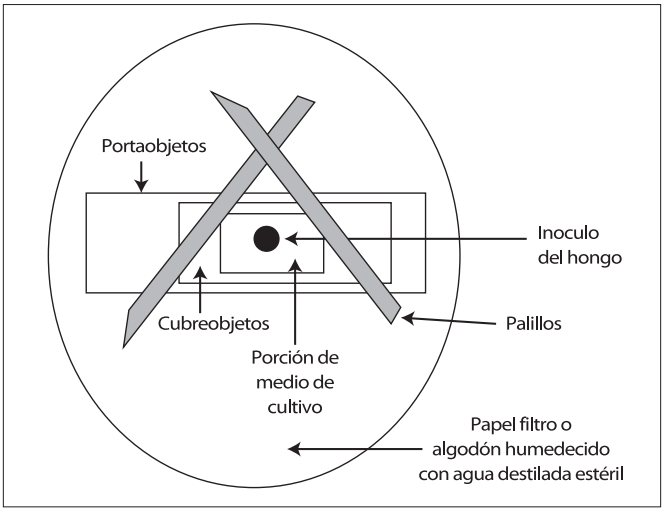


Figura 39. Montaje del microcultivo (vista desde la base).
Fuente: Aura Lizarazo Forero

4. Morfología macroscópica

Describa la morfología macroscópica de los diferentes cultivos que se han aislado de acuerdo con los parámetros anteriormente explicados.

5. Morfología microscópica

Para la observación de hongos, se utilizan generalmente líquidos de montaje, como por ejemplo agua (hongos acuáticos), KOH o azul de lactofenol.

- *Hongos miceliales*

Montaje entre portaobjeto y cubreobjeto:

1. Tome una lámina y agréguele una gota de azul de lactofenol.
2. Flamee el asa micológica.

3. Destape el cultivo cerca al mechero y enfríe el asa.
4. Tome un inóculo pequeño.
5. Lleve el inóculo a la gota de azul de lactofenol.
6. Separe el inóculo con ayuda de otra asa o con un cubreobjeto.
7. En forma inclinada coloque una laminilla sobre el montaje evitando la formación de burbujas.

Montaje directo o por impronta con cinta transparente:

1. Tome una lámina y agréguele una gota de azul de lactofenol.
2. Corte una tira de 5 cm de cinta transparente y tómela de los extremos.
3. Presione levemente la parte central de la cinta sobre la muestra del hongo que está sobre el alimento.
4. Transfiera o pegue la cinta sobre la lámina, pegándola primero de un extremo y luego del otro, cuidando de que quede bien estirada.

- *Hongos levaduriformes*

Repita los pasos del procedimiento Montaje entre portaobjeto y cubreobjeto, pero utilizando el asa bacteriológica redonda, exceptuando el paso 6.

Observación microscópica:

1. Realícelas en 10X y 40X.
2. Haga dibujos con base en lo que está observando, compare con las ayudas didácticas aportadas por el docente para identificar las estructuras y complete el siguiente cuadro:

Hongo número	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	
		Reproducción asexual	Género
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			

7.1 Estructuras vegetativas

Objetivo

Adquirir destreza para la identificación de las estructuras vegetativas.

Introducción

Algunos hongos forman en los micelios y en las hifas estructuras especiales de gran interés que es importante conocer (Herrera & Ulloa, 1998).

- Plecténquimas (del gr. *plektós*: trenzado, entrelazado, y ***énchyma***: relleno).
- Prosénquima (del gr. *prós*: cerca, junto a, hacia, y *énchyma*: relleno).
- Seudoparénquima (del gr. *pseudos*: falso, y *paránchyma*: un tejido de las plantas superiores).
- Estroma (del gr. *stroma*: alfombra, colchón, almohadilla).
- Esclerocios (del gr. *sklerós*: duro).
- Rizoides (del gr. *rhiza*: raíz, y *eídes*aspecto) y estolones (del lat. *stolo, stolonis:* retoño, renuevo).
- Haces o cordones miceliales o rizomorfos (del gr. *rhiza*: raíz, y *morphé*: forma).
- Vainas de micorrizas (del gr. ***mýkes:*** hongo, *rhiza*: raíz).
- Apresorios (del lat. *appresorium:* presionar, comprimir).
- Haustorios (del lat. *haustorium:* extraer, devorar).
- ***Plecténquimas:*** término general que se utiliza para designar a todos los tipos de tejidos fúngicos. Los dos tipos más comunes prosénquima y seudoparénquima.

- *Prosénquima:*las hifas que lo componen se disponen paralelamente unas a otras, entrelazándose o anastomosándose, pero conservando su individualidad, y fácilmente se pueden reconocer los elementos hinfales individuales (Figura 41).

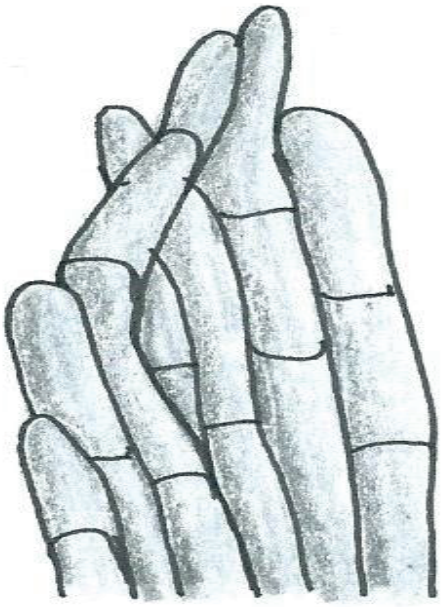


Figura 41. Prosénquima.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- *Seudoparénquima***:** está formada por hifas íntimamente unidas y aún soldadas por una sustancia intersticial. Las hifas han perdido su individualidad y recuerdan un verdadero tejido (Figura 42).

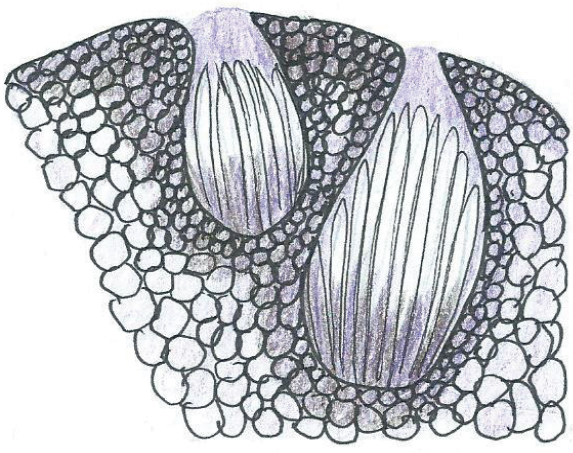


Figura 42. Pseudoparénquima.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Estroma:*** es una masa compacta de hifas somáticas, constituida de plecténquima, de formas diversas, sobre la cual o dentro de la cual se producen comúnmente hifas fértiles que generan órganos reproductores (véase Figura 43).

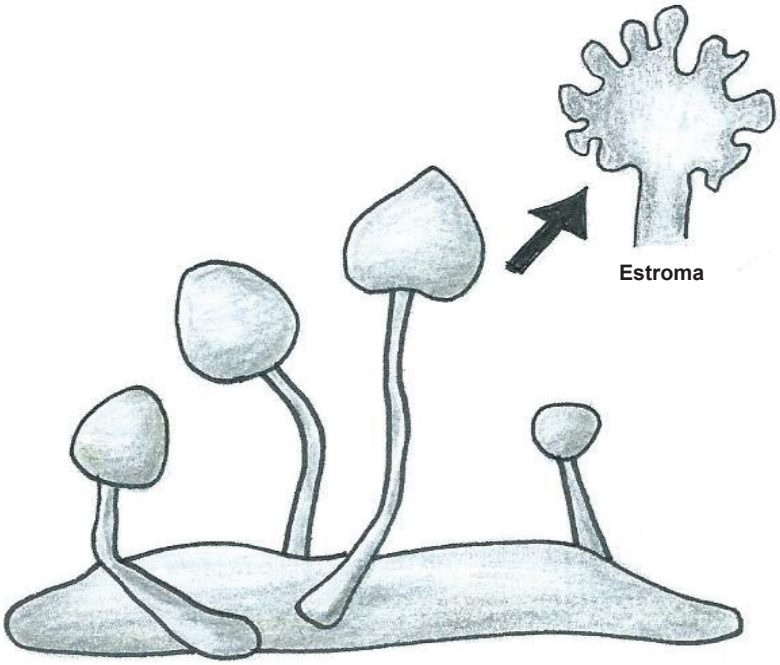


Figura 43. Estroma originado por germinación de un esclerocio.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Esclerocios:*** masas redondeadas duras, compactas y negruzcas de naturaleza pseudoparenquimática, con una corteza firme, frecuentemente quitinizada y médula, llenas de sustancias de reserva y empleadas por el hongo para la supervivencia en condiciones desfavorables, que se forman en diversos sitios del micelio de algunos hongos. Según las especies, alcanzan desde el tamaño de una cabeza de alfiler hasta varios centímetros (Figura 44).



Figura 44. Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum.*
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Rizoides:***están formadas de hifas ramificadas, a veces con aspecto de roseta, y que adquiere la apariencia de raicillas. Sus funciones son la fijación del micelio al sustrato y la absorción de sustancias nutritivas (Figura 45).
- ***Estolones:*** son hifas vegetativas aéreas y no ramificadas que conectan dos grupos de rizoides (Figura 45).

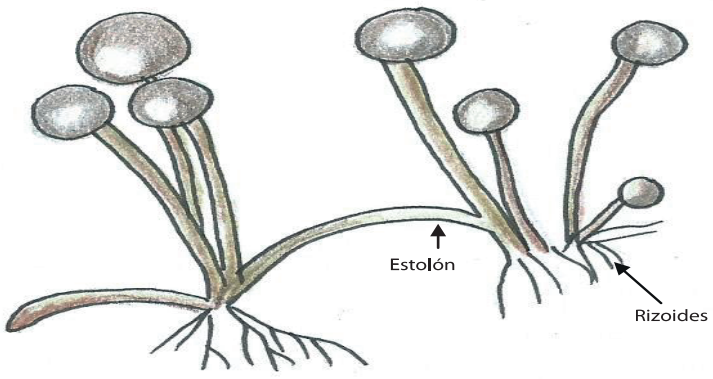


Figura 45. Rizoides y estolones **(***Rhizopus*).
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Haces o cordones miceliales o rizomorfos:***son cordones de micelios muy compactos, gruesos y resistentes. Capaces de alcanzar varios metros de longitud, con un grosor de 1 mm, generalmente oscuro. Funcionan como órganos de absorción y conducción de sustancias nutritivas (Figura 46).



Figura 46. Rizomorfos de *Armillariella mellea.*
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Vainas de micorrizas:***órgano compuesto por la asociación simbiótica entre las hifas de algunos hongos y las raíces de plantas vasculares. Es una especie de manto fúngico que los hongos ectomicorrizas forman en torno a las raíces de estas plantas (Figura 47).

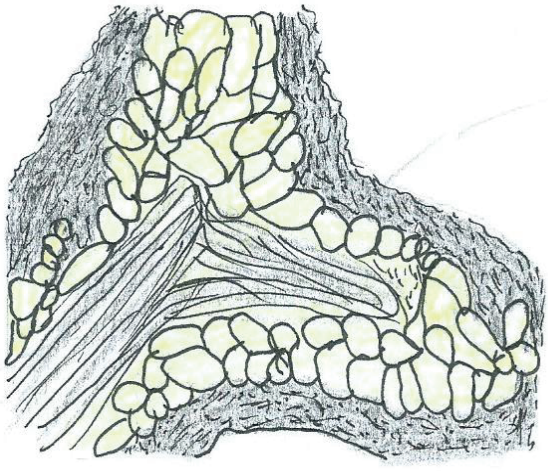


Figura 47. Micorriza. Corte longitudinal de raíz de pino por *Pisolithus tinctorius* mostrando el manto micorrícico y la red de Harting.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Apresorios:*** hinchamiento aplanado que se forma en el tubo de germinación de una espora o en una hifa vegetativa, y que se adhiere a la superficie del hospedante antes de penetrarlo con una hifa infectiva que se origina de dicho hinchamiento, característico de hongos fitopatógenos (Figura 48).

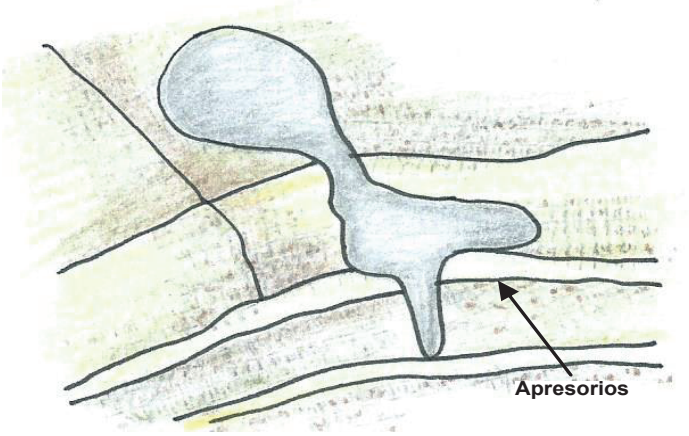


Figura 48. Apresorios de *Pythium* sp.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

- ***Haustorios:*** órgano absorbente con paredes muy delgadas, que se origina de la hifa de un hongo parásito y que penetra en una célula hospedante. Los haustorios son formados principalmente por parásitos obligados que absorben sustancias nutritivas del hospedante (Figura 49).

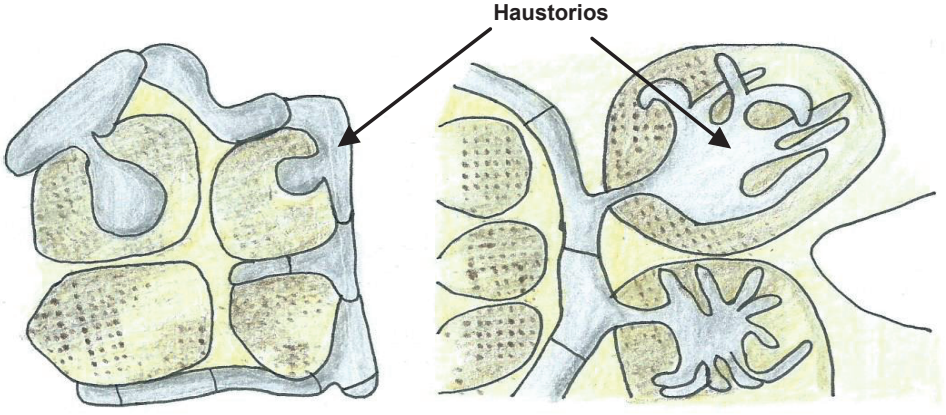


Figura 49. Haustorio de una roya en células de pino.
Fuente: Aura Lizarazo Forero

Materiales y reactivos

Montajes de estructuras vegetativas

Esclerocios

Muestras de plantas con lesiones por hongos

Procedimiento

Observación microscópica

1. Observe los preparados en 10X y 40X.
2. Haga dibujos con base en lo que está observando, compare con las ayudas didácticas aportadas por el docente, para identificar las estructuras.

7.2 Efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y esporulación de los hongos

Objetivo

Demostrar el efecto que tienen el medio de cultivo, la temperatura y la luz, sobre el crecimiento y esporulación de hongos.

Materiales y reactivos

Portaobjetos

Cubreobjetos

Asa micológica

Microscopio

Esteroscopio

Incubadoras graduadas a 15,28 Y32 ˚C

Cámara con luz negra

Azul de lactofenol

Cajas con medio PDA (agar dextrosa patata), malta-sal agar (MSA) cajas con agar agua (AA)

Aislados de *Aspergillus* spp

Azul de lactofenol

Procedimiento

1. Siembre el hongo en cada medio de cultivo e incube a 15 ºC, temperatura ambiente, 28 ºC, y 32 ºC y en la cámara provista con luz negra.
2. Tomar registro de crecimiento y esporulación cada 2 y 8 días.

7.3 Aislamiento de hongos del suelo

Objetivo

Evaluar las poblaciones de hongos del suelo

Introducción

Los hongos junto con las bacterias realizan importantes servicios en el suelo, relacionados con la degradación de compuestos orgánicos e inorgánicos, inmovilización o retención de nutrientes, dinámica del agua, ciclos biogeoquímicos y la supresión de enfermedades. Las hifas de los hongos unen físicamente las partículas del suelo, creando agregados estables que ayudan a aumentar la infiltración y retención del agua. Son los que mayormente contribuyen a la biomasa del suelo constituyendo alrededor del 70 por ciento del peso seco, la formación de redes, generación de enzimas y metabolitos les permite degradar compuestos de alto peso molecular, como la celulosa y las ligninas presentes en materiales orgánicos de origen vegetal. Muchos de los metabolitos secundarios de los hongos son ácidos orgánicos, por lo que ayudan a aumentar la acumulación de materia orgánica rica en ácidos húmicos, que son unos de los principales componentes de las sustancias húmicas, las cuales son los constituyentes principales del humus.

Están presentes en el suelo con estructuras especializadas para los períodos de dormancia, las cuales incluyen esporangióforos, conidias, oosporas, ascosporas, basidiosporas, clamidosporas y esderocios.. Un solo hongo individual puede incluir muchos cuerpos fructíferos esparcidos por un área de aproximadamente 27 metros (https://extension.illinois.edu/soil/index.html).

El micelio fungal también puede estar metabólicamente inactivo en el suelo porque éste tiene un extenso efecto fungistático que se conoce como fungístasis del suelo. Esta ocurre en la mayor parte de los suelos excepto en

algunos profundos, altamente ácidos y predominantemente fríos. La adición de materiales orgánicos de fácil descomposición anula la fungístasis del suelo. Eliminado este efecto las esporas fungales y otros propágulos germinan y el micelio fungal empieza de nuevo el crecimiento activo.

La fungistasis del suelo parece estar asociada con la actividad microbiana, ya que la esterilización la elimina. Pero la naturaleza de los agentes fungistásticos sin embargo aún está por identificarse

El estudio de los hongos del suelo utilizando métodos cuantitativos y cualitativos ha sido muy difícil. Las técnicas tradicionales de aislamiento con diluciones o suspensiones del suelo en cajas de Petri cubiertas con un agar apropiado tienen un valor limitado en muchos aspectos. Estos análisis pueden dar sólo información general acerca de las especies presentes y su distribución. Pero es difícil distinguir las colonias que provienen de esporas o de hifas que estén en el suelo o de propágulos inactivos que germinan cuando son puestos en medios apropiados (Dix y Webster, 1995).

Materiales

Frascos y tubos para las diluciones de la muestra

Recipientes con 100 ml de agua destilada estéril

Agua destilada estéril

Balanza

Peachimetro

Micropipetas

Cajas de Petrí estériles

Portaobjetos y cubreobjetos

Incubadora a 28°C

Agar de Martín, Agar agua, agar Saboraud, agar Czapek-Dox, agar PDA

Violeta de genciana

Azul de lactofenol

Ácido acético

Muestras de suelos: rizosfera, suelo total

Recipientes plásticos transparentes

Procedimiento

Observación directa

1. Pese 150 g de suelo
2. Colóquelo en un recipiente plástico
3. Sumerja dos portaobjetos limpios en una solución de agar agua (AA) para que se cubran con una película fina y delgada
4. Introdúzcalo los portaobjetos en el suelo del recipiente dejando afuera una pequeña porción
5. Cubra el recipiente con un plástico transparente, perfórelo para permitir la entrada del aire e incúbelo a temperatura de 28C por una semana.
6. Al cabo de este tiempo remueva los portaobjetos con cuidado, tratando de mantenerlos inclinados para no dañar unas de las caras, que será teñida.
7. Posteriormente déjelos secar o fíjelos al calor
8. Limpie suavemente una de las caras y remueva todas las partículas grandes de suelo.
9. Después de que estén limpios, sumérjalos en ácido acético durante 1 a 3 minutos
10. Remueva el exceso de ácido acético.
11. Tiña con violeta de genciana durante 5 a 10 minutos
12. Lávelos con agua
13. Séquelos al aire y observa al microscopio (10X, 100X)
14. Realice esquemas

Aislamiento y crecimiento de hongos en medios de cultivo

1. Tome 10 g de suelo (Medir pH)
2. Suspéndalo en 100 mL de agua destilada estéril
3. Realice diluciones de 10^{-2}y 10^{-3}
4. Vierta 1 mL de cada una de las diluciones en dos cajas de petri estéril
5. Adicione 15 ml de agar Martín en dos cajas y 15 rnL de agar Czapek-Dox en las otras dos cajas (temperatura del agar de 40°C)
6. Mezcle bien

7. Deje solidificar
8. Incube a 28°C durante 8 días.

Suspensiones de suelo en cajas de Petri

1. Pese 0.005 a 0.015 g de suelo y dispérselo en 15 ml de agar Saboraud, cierre y marque las cajas
2. Tome con un asa estéril una pequeña cantidad de suelo y póngala en la base de una caja de Petrí estéril vacía
3. Agréguele una gota de agua destilada estéril y macérelo
4. Adicione 10 ml de agar PDA fundido
5. Mezcle
6. Deje solidificar
7. Incubar de 28°C durante 8 días.
8. Subcultive los hongos que se desarrollan de los fragmentos del suelo

Contenido de la humedad del suelo

1. Pese 10 g de suelo
2. Póngalo en una estufa a 60°C por 48 horas
3. Cuando la muestra esté seca pásela en una balanza analítica
4. El contenido de humedad del suelo se calcula por la diferencia de peso entre el suelo húmedo y el seco

Lectura

Una vez que se han formado colonias visibles, se seleccionan para el recuento de colonias **las cajas que tengan de 15 a 150 colonias.** Calcule el número de hongos por gramo de suelo seco: dividiendo el número promedio de colonias por caja entre el peso seco del suelo en gramos.
Realice morfología macroscópica y microscópica.

7.4 Aislamiento de hongos acuáticos

Objetivo

Aislar e identificar especies de hongos de muestras de aguas

Introducción

Los hongos pueden encontrarse siempre que exista materia orgánica no viviente, aunque algunas especies son patógenas y otras parasitarias. El agua corriente no contaminada de los arroyos tienen una proporción relativamente grande de especies que constituyen los auténticos hongos acuáticos. Especies que poseen zoosporas flageladas y gametos, pertenecientes a los Chytridiomycota, Oomycota, Hyphomicetos y hongos del suelo.

El agua moderadamente contaminada puede portar células o esporas de los tres tipos, aunque presenta normalmente menos hongos acuáticos verdaderos e Hyphomicetos acuáticos mientras que los hongos del suelo son más numerosos.

Materiales

Frascos con 90 ml de solución peptonada

Tubos tapa rosca con 9 ml agua peptonada.

Medios de cultivo agar Czapek-Dox

Micropipetas

Incubadora a 28ºC

Mecheros

Muestras de aguas

Rastrillos

Procedimiento

1. Realizar las diluciones de acuerdo al grado de contaminación de la muestra

2. Sembrar por duplicado en los medios de agar Czapek-Dox

3. Incubar las cajas a 28ºC por 3, 5 y 7 días.

4. Realizar recuento

5. Realizar montaje con azul de lactofenol de las colonias fúngicas

Capítulo 8

Interacciones o relaciones microbianas

Objetivo

Evaluar las relaciones entre bacterias y hongos.

Introducción

Interacciones dentro de la misma población microbiana

Interacciones positivas

cooperación o protocooperación o sinergismo: existe una simbiosis pero no es obligatoria. ejemplos: mixobacterias, el intercambio genético. sintrofismo: es una variante del sinergismo, en el que una especie efectúa un proceso metabólico y otra utiliza el producto final, pero a su vez libera un nutriente esencial para la primera ejemplos: degradación de moléculas complejas como hidrocarburos cíclicos o pesticidas.

Interacciones negativas

competencia: es una condición en la que dos especies compiten por nutrientes esenciales. una cantidad inadecuada de carbono suele ser la razón más habitual de la mayor parte de casos de competición en el suelo. el signo que distingue la competición es la exclusión competitiva. la exclusión competitiva impide que

dos poblaciones ocupen el mismo nicho ecológico. si dos organismos intentan ocupar el mismo nicho, sólo uno lo conseguirá. ejemplos: acumulación de algunos productos metabólicos (ácidos grasos de bajo peso molecular y sulfuro de hidrógeno), genes que codifican proteínas

Interacciones entre poblaciones microbianas diferentes

Nombre de la interacción	Efecto de la interacción	
	Sobre la población a	Sobre la población b
Simbiosis o mutualismo	efecto positivo	efecto positivo
Parasitismo	efecto positivo	efecto negativo
Comensalismo	sin efecto	efecto positivo
Neutralismo	sin efecto	sin efecto
Amensalismo o antagonismo	sin efecto o efecto positivo	efecto negativo
Predación o depredación	efecto positivo	efecto negativo

Simbiosis: supone una asociación muy cercana entre dos organismos:

Mutualismo: relación simbiótica en que ambos organismo se benefician

Parasitismo: cuando la relación simbiótica puede tener un efecto dañino para uno de los miembros del par. Cada grupo importante de la comunidad del suelo tiene parásitos en sus células. Los parásitos son más pequeños que los hospederos y causan enfermedades o daño local. En esta relación un organismo vive dentro o encima de otro (huésped). el parásito se alimenta de las células, el tejido o el fluido de otros organismos.

Comensalismo: Sólo un microorganismo de la relación simbiótica se beneficia de la interacción, mientras que el otro no se ve afectado o beneficiado. Un organismo modifica el medio para el beneficio del otro sin que se afecte en sí mismo.

Algunas relaciones de este tipo implican:

- Modificación del ambiente ej los aerobios pueden consumir todo el 02 ya que no resulta necesario para los anaerobios para su proliferación
- Los microorganismos pueden excretar compuestos que ayudan a otros organismos a crecer ej. producir polisacáridos que aumentan la adhesión, a la vez que puede producir un exceso de factores de crecimiento que son excretados al ambiente.
- Un microorganismo puede proporcionar a otro un habitad favorable ej las bacterias crecen en las algas
- Un microorganismo puede ayudar a otro de forma inadvertida a dispersarse ej las bacterias móviles puede transportar virus.

Neutralismo: dos especies viven juntas pero no tienen interacciones benéficas o perjudiciales. Son dos microorganismos que se comportan de forma totalmente independiente entre sí. Ninguno de los dos afecta el otro, de manera que no hay interacción directa entre ellos. El neutralismo puede estar ocasionado por una separación física, espacial o temporal.

Amensalismo: Una es suprimida, mientras la segunda no se ve afectada. Un microorganismo puede tener relaciones amensalistas con un grupo y comensalistas con otro. La producción de antibióticos o toxinas es uno de los mejores y más claros ejemplos de amensalismo.

Sinergia: se trata de las asociaciones de provecho mutuo para ambas especies, pero su cooperación no es imprescindible para su existencia o para desencadenar alguna reacción. Los herbicidas suelen degradar sinérgicamente. Así, un microorganismo puede degradar una parte de un herbicida, mientras que otro puede degradar la otra. El metabolismo y la descomposición de la lignina también pueden considerarse un proceso sinérgico.

P***redación o depredación*** es el ataque de un organismo a otro. Los predadores microbianos son esencialmente necrotrofos, pero han desarrollado modificaciones estructurales o de conducta para capturar, o mejorar el contacto con sus fuentes vivas de nutrientes.

Existen numerosos ejemplos de microorganismos procariotas y eucariotas parásitos de otros eucariotas, incluyendo muchos patógenos.

Ejemplos de mutualismo, comensalismo y parasitismo

Patrón simbiotico	Tipo de interacción	Factores suministrados por las plantas	Factores suministrados por las bacterias
ciclo del nitrógeno	**mutualistica** exosimbiotico	• compuestos orgánicos	• convertir compuestos nitrogenados en formas utiles para la plantas
bacteria *rhizobium*-planta (nodulación de raíces)	**mutualistica** endosimbiotico	• los favonoides de la planta induce a la bacteria a producir factores *nod* • provee lectinas que une los factores *nod* a la iniciación de la nodulación • forma un tubo de infección para guiar a la bacteria • forma nódulos donde los bacteroides fijan nitrógeno • suministra compuestos orgánicos para los bacteroides • proporciona la globina de la **leghemoglobina**	• produce factores nod que inicia la nodulación en las raíces de las plantas • los bacteroides fija nitrógeno para suministrar compuestos nitrogenados a la planta • proporciona la hemina de la **leghemoglobina**
bacteria *agrobacterium*-planta (tumores en forma de agallas)	comensalismo ?	las plantas responde a las hormonas codificadas para la transferencia de adn bacteriano (t-dna) para formar un tumor que produce **opinas** que puede ser usado como fuente de carbono por las bacterias	• el plásmido **ti** (inducción del tumor) responde a los compuestos fenolicos de la planta haciendo un puente a través del cual es transferrido el **t-dna** a la planta • suministra genes que codifica las enzimas para el catabolismo de **opinas** (aa modificados) fabricados por las plantas
patógenos de plantas-plantas	**parasitismo**	• las plantas suministra a los pátogenos de planta un huesped para infectar • las proteínas **r** de las plantas reconoce las proteínas bacterianas inyectadas y activa una respuesta (hipersensibilidad) que limita la dispersión de bacterias en la planta	• las bacterias suministra proteinas **hrp** que forma un sistema de secreción tipo iii que inyecta proteínas tóxicas en las células de las plantas • algunas de estas proteínas puede ser reconocida por proteínas **r** (factores avirulentos) • las harpinas (**hrp**) ayuda en la estimulación de la respuesta hipersensible

aa. aminoácidos

Interacciones entre microorganismos- invertebrados

Asociación simbiotica	**Localización de la bacteria simbiotica**	**Aportes de la bacteria**	**Aportes del huesped**
bacteria-*riftia (gusano)* (**mutualistica**)	endonsimbiotica	• oxida sulfato para producir energía • fijan co_2 reducen nitrato a amonio	• sustrato para la actividad bacteriana la protege del amb
vibrio fischeri (bacteria)-euprymna (calamar) (**mutualistica**)	exosimbiotica	• produce luz (protege al calamar de los predadores)	• aminoácidos • oxígeno • la protege del ambiente
photorhabdus (bacteria bioluminiscente)-heterorhabditis (nemátodo entomopatógenos) y presa (una larva) (**mutualistica)**	exosimbiotica	• suministra cisteína, lisina al nemátodo • mata y destruye la larva para ayudar en la reproducción del nemátodo	• introduce a la bacteria dentro de la larva, que es fuente de nutrientes
buchnera (enterobacteria)- áfido (insectos fitopatógenos) (**mutualistica**	endonsimbiotica	• suministra aminoácidos al áfido	• azúcares y otros compuestos orgánico • protege del ambiente
wolbachia (bacteria)--drosophila (**parasitismo mutualismo**)	endonsimbiotica	• incompatibilidad en la fertilidad • fomenta la persistencia de la bacteria en la población del insecto	• nutrientes • protege del ambiente

Materiales

Cajas de agar PDA y agar nutritivo

Tubos de caldo saboureaud con cultivo de *Trichoderma harzianum*

Tubos de caldo saboureaud con cultivo de *Fusarium oxysporum*

Tubos de caldo saboureaud con cultivo de *Rhizotonia solani*

Tubos de caldo nutritivo de *Pseudomonas aurefaciens* y de *E. coli*

Aplicadores

Pipetas de 1 ml

Procedimiento

1. Realice una siembra masiva del *Fusarium* en el medio de saborureaud y en cada uno de los anillos 0.2 ml de *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *E. coli*.
2. Incube a 30ºC por 48-72 horas. (ver dibujo 1)
3. Tome un agar nutritivo y siembre en estría horizontal la *Pseudomonas* y E. coli en estría perpendicular a la estría anterior (ver figura 2).
4. Incube las cajas **a 35ºC por 48 horas.**

Lectura

Estas técnicas pueden ser cualitativas o pueden cuantificarse midiendo en cm el tamaño del halo de inhibición o la distancia que ocupa el espacio entre las colonias o siembras (en el caso de las estrías).

Capítulo 9

Virus

Objetivo

Demostrar la transmisión mecánica de virus fitopatógenos

Introducción

Las enfermedades causada por virus es muy característica en cuanto a que el patógeno se incorpora a sí mismo en el metabolismo de la célula hospedadora. Después de infectar una célula vegetal viva, el virus se libera de su cubierta proteica e introduce su material genético en el interior del hospedador. El genoma viral se traduce y duplica, ensamblándose numerosas partículas virales nuevas, que utilizan el ácido nucleico y las proteínas recién sintetizadas. El movimiento de los virus desde el lugar de infección a células vecinas se realiza vía simplasto a través de plasmodesmos modificados para permitir el paso de grandes moléculas (como las nucleoproteínas virales), previa inducción de proteínas de movimiento (MPs). Una vez en el floema, la velocidad de movimiento al resto de la planta se incrementa notablemente.

Materiales

Especies afectadas por virus: hojas de tabaco atacadas por el virus del mosaico de tabaco(TMV) o cigarrillos elaborados, hojas de frijol con mosaico dorado (BGMV)

Plantas sanas de (tabaco, tomate, frijol) a las cuales se les ha eliminado la yema terminal

Aplicadores estériles

Tubos de ensayo

Gasa estéril

Solución amortiguadora de K_2HP0_4 al 0,01 M, pH 7,5

Agua destilada estéril

pipetas; vasos de precipitado

Procedimiento

1. Tome pequeños trocitos del material afectado en donde los síntomas sean características y pese 10 g
2. Colóquelo en un mortero y macérelos con unas gotas de K_2HP0_4 al 0,01 M
3. Añada K_2HP0_4 al 0,01 M 25 ml para virus TMV y 100 ml para virus BGMV
4. Filtre la suspensión a través de gasa y almacene el filtrado en refrigerador
5. Con la ayuda de un aplicador empapado en el extracto, proceda a frotar suavemente las hojas de plántulas de tabaco, tomate y frijol
6. Observe el desarrollo de síntomas a los 7 a 14 días después de la inoculación

Capítulo 10

Protozoos

Objetivo

Identificar especies de protozoos patógenos de muestras de aguas

Introducción

Los protozoos o protozoarios (del griego πρῶτος "primero" y ζῷον "animal") son organismos **microscópicos, unicelulares eucariotas,** que carecen de pared celular. Por lo general son incoloros y móviles. Se distinguen de las bacterias por su tamaño (5 a 500 μm de diámetro), que es mayor, de las levaduras y otros hongos por su movilidad y ausencia de una pared celular y de los mohos viscosos por la falta de formación de cuerpos de fructificación. Viven en ambientes húmedos o directamente en medios acuáticos, ya sean aguas saladas o aguas dulces y se pueden encontrar desarrollándose en habitas aéreos por ejemplo la superficie de los árboles. Son heterótrofos, fagótrofos, depredadores o detritívoros, a veces mixótrofos (parcialmente autótrofos). Se han encontrado cerca de 30.000 especies. Como depredadores, cazan algas, bacterias, microhongos unicelulares o filamentosos y otros protozoos. Desempeñan un papel como **herbívoros y como consumidores** en la articulación del proceso de descomposición de la cadena alimentaria y en el control de biomasa y la población bacteriana. Al comer bacterias, los protozoos liberan el exceso de nitrógeno que luego pueden ser utilizados por las plantas y otros miembros de la red alimenticia. Como componentes del micro- y de la meiofauna, son una fuente importante del alimento para los microinvertebrados. De esta forma, el

papel ecológico de protozoos en la transferencia de la producción bacteriana y algácea a los niveles tróficos sucesivos es importante (Cavalier-Smith, 2006)

Algunas especies de protozoos son parásitos y pueden vivir solo en líquidos corporales de organismos como gusanos, grillos y seres humanos. Algunos viven en tejidos de plantas. Casi todos los animales y el hombre pueden ser infectados con algún tipo de protozoo durante alguna época de su vida. El lugar usual para este tipo de infecciones es el intestino, también puede entrar en la sangre y ser transportado a otras partes del organismo de huésped. Algunos de ellos causan enfermedades humanas como la disentería amebiana, la malaria y la enfermedad del sueño Africana.

La reproducción puede ser asexual por bipartición y también sexual por isogametos o por conjugación intercambiando material genético. En este grupo encajan taxones muy diversos con una relación de parentesco remota, que se encuadran en muchos filos distintos del reino Protista, definiendo un grupo parafilético, sin valor en la clasificación de acuerdo con criterios cladísticos.

La clasificación de Honigberg et al 1964, trata a los protozoos como un sólo filo dividido en cuatro clases basadas sobre todo en el modo de locomoción. Debido a que todas estas formas se desarrollan por evolución convergente, las clases son en realidad complejos grupos polifiléticos:

Rizópodos o sarcodinos (*Rhizopoda*).

Entamoeba histolytica (disentería amibiana)

Giardia lamblia (giardiasis)

Naegleria gruberi, Naegleria. fowleri (Meningoencefalitis)

Cryptosporidium parvum, Cryptosporidium muris (criptosporidiosis)

Balantidium coli (Balantidiasis)

Acanthamoeba spp. (Meningoecefalitis)

Ciliados *(Ciliophora)*

Paramecium

Flagelados o mastigóforos (*Mastigophora)*.

Euglenas

Esporozoos o Apicomplexa *(Sporozoa)*.

Plasmodium

Dranculus mediensis

La amibiasis es una importante causa de morbilidad y mortalidad, particularmente entre los infantes. La infección se establece, en general, en el colon; con formas más severas en el hígado y el cerebro.

La giardiasis es una enfermedad diarreica severa causada por el protozoa *Giardia lamblia*. El trofozoito, forma móvil o estado vegetativo de crecimiento del organismo, establece la infección en el intestino delgado y después de un período de crecimiento se enquista, en respuesta al sistema inmunológico y a los cambios en el intestino del huésped.

El *Naegleria fowleri* causa la meningoencefalitis amébica primaria. El trofozoito tiene acceso a través de los senos nasales la amiba migra a través del nervio olfatorio al cerebro y sus meninges, estableciendo una infección generalmente fatal.

La Criptosporidiosis Infecta la célula epitelial del tubo digestivo en mamíferos y seres humanos, causa enteritis y diarrea, siendo la tercera o cuarta causa de diarrea infecciosa después de los rotavirus y *E. Coli.*

Materiales

Muestras de aguas

Portaobjetos y cubreobjetos

Micropipetas

Microscopios

Lugol

Cultivo de protozoarios y helmintos intestinales

Medio de Boeck y Drbohlav modificado:

Este medio comprende una base sólida de huevo y una capa superficial de solución de Locke. Permite el desarrollo y mantenimiento de casi todos los protozoarios intestinales

Solución de Locke modificada (capa superficial)

Cloruro de sodio	8 g
Cloruro de calcio	0.2 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Cloruro de magnesio	2 g
Fosfato de sodio	0.01 g
Bicarbonato de sodio	0.4 g
Fosfato de potasio	0.3 g
Agua destilada	1.000 mL

Procedimiento

Cultivo de protozoarios y helmintos intestinales

1. Verter 0.5 ml de la muestra a cada tubo del medio de cultivo.
2. Mezclar la muestra con el líquido superficial del tubo, evitando al máximo las burbujas de aire.
3. Incuban los tubos a 37ºC por 24 horas
4. Con una pipeta estéril, pasar una o dos gotas del sedimento a un portaobjetos y cubrir con un cubreobjeto. Las amibas se desarrollan en la parte inferior del cultivo, o sobre la superficie inclinada, cerca del fondo.
5. Los tubos que no muestren trofozoitos o muy pocos para que puedan identificarse, se subcultiva. Con una pipeta estéril, se pasa aproximadamente la mitad del sedimento a un nuevo tubo del medio de cultivo.
6. Tanto los cultivos iniciales como las resiembras se incuban a 37ºC durante 48 horas y se procede a la observación microscópica (10 y 40x)

Examen microscópico directo:

1. Coloque una gota del agua contaminada y cubra con una gota de lugol, mezcle.
2. Cubra con una laminilla y examine al microscopio (10 y 40x)

Referencias

APHA. (2004). Chapter 1 Standard Methods. Reddy R. Graham T. E. Laird D. T. Maturin L. J. Arnold E. In H. M. Wehr & J.F. Frank (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Health Association.

APHA. (2004). Chapter 2 Laboratory Quality Assurance and Safety. Davis G. L. Hickey P. J. Bulthaus M. In H. M. Wehr & J.F. Frank (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Health Association.

APHA. (2004). Chapter 4 Media and Dilution Water Preparation. Lair D. T. Gambrel-Lenarz S. A. Scher F. M. Graham T. E. Reddy R. Maturin L. J. In H. M. Wehr & J.F. Frank (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Health Association.

APHA. (2004). Chapter 6 Microbiological Count Methods. Davidson P. M. Roth L. A. Gambrel-Lenarz S. A. Bruhn J. In H. M. Wehr & J.F. Frank (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Health Association.

APHA. (2004). Chapter 7 Coliform and Other Indicator Bacteria. P. M. Davidson, L. A. Roth, S. A. Gambrel-Lenarz, J. Bruhn. In H. M. Wehr & J.F. Frank (Ed.). Standard Methods for the Examination of Dairy Products. (17a Ed.). Washington, D. C. American Public Health Association.

APHA, AWWA, WEF. (2005). Chapter 9 Nitrifying bacteria. Standard Methods for the examination of water and Wastewater. 21ª Edition. In A. D. Eaton, L. S. Clesceri, E. W. Rice, & A. E. Greenberg (Ed.).

Atlas, M. R. (2006). *Handbook of Media for the Examination of Food*. Louiswille, USA: University of Louiswille, CRC Press.

Avers, J. CH. (1981). Biologia Celular. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. México, D. F.

Bailey, W. R. (2009). *Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Brierley, W. B., Jewson, S. T. &Brierley, M. (1928). The Quantitative Study of Soil Fungi. *Proc. 1 st. Int. Congr. Soil Sci., 3,* 48-71.

Bruns, T. D., White, T. J. & Taylor, J, W. (1991). Fungal Molecular Systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst., 22,* 525-564.

Cavalier-Smith, T. (2006). «Protozoa: the most abundant predators on earth». *Microbiology Today* Nov 06, 166-169.

Dix, NJ., Webster, J. (1995). Fungal ecology. Universidad de Michigan: Editor Chapman & Hall, 1995

Ferrera-Cerrato, R. & Alarcón, A. (2007). *Microbiología agrícola: micro y macrofauna, control biológico, planta microorganismo*. México, D. F.: Trillas.

Grigorova, R. & Norris, J. R. (1990). *Methods in Microbiology-Techniques in Microbial Ecology.* Vol.22. NY: National Academic Press.

Harvey, A. R., Champe, C. P. A. & Fisher, D. B. (2008). *Lippincott´s Illustrated Reviews: Microbiología.* (2nd Ed.). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

Heritage, J., Evans, E.G.V. & Killington, R. A. (1996). *Introductory Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.

Herrera, T. & Ulloa, M. (1998). *El reino de los hongos: micología básica y aplicada*. (2nd Ed.). México, D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura de México.

Honigberg, B. M., Balamuth, W., Bovee, E. C., Corliss, J. O., Gojdics, M., Hall, R. P., Kudo, R. R., Levine, N. D., Loeblich, A. R., Jr., Weiser, J. & Wenrich, D. H. (1964). «A Revised Classification of the Phylum Protozoa». *Ournal Protozool* 11, 7-20.

ICMSF. (1978). Microorganisms in Foods 1. The Significance and Methods of Enumeration. (2ª Ed.). Toronto: University of Toronto, National Academy Press.

INSHT. (s.f.). *Cabinas de seguridad biológica.* Recuperado de http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/NTP/Ficheros/201a300/ntp_233.pdf

Jennings, D. H. (1995). *The Physiology of Fungal Nutrition*. Cambridge: Cambridge University Press.

Jensen, V. (1968). The Plate Count Technique. In Gray &D. Parkinson (Ed.). *The Ecology of Soil Bacteria*. Liverpool: Liverpool University Press.

Jones, C.W. (1982). Bacterial Respiration and Photosynthesis. Whashington, D.C.: ASM.

Kevin, K. (2005). *Fungi: Biology and Applications*. San Francisco: John Wiley & Sons.

Krulwich, T.A. (1990). *Bacterial Energetics*. London: Academic Press.

Lammert, M. J. (2007). *Techniques in Microbiology. A Student Handbook*. Upper Saddle River, NJ: Prentice-Hall.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. &Parker, J. (2004). *Brock's Biology of Microorganisms,* (10th Ed.). Madrid: Prentice-Hall.

Maheshwari, R. (2005). *Fungi Experimental Methods in Biology*. London: CRC Press.

Maier, R. M. (2009). *Environmental Microbiology*. Arizona: Elsevier Academic Press.

McFaddin, F. J. (1980). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.*Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Merck, E. (1996). *Manual de medios de cultivo*. Darmstadt, Alemania: Merck.

Neidhart, F. C., Ingraham, J.L. & Schaechter, M. (1990). Physiology of the Bacterial Cell: a Molecular Approach. Massachusetts: Sinauer Associates, Sunderland.

Olsen, R. A. & Bakken, L. R. (1987). Viability of Soil Bacteria: Optimization of Plate-counting Technique and Comparison between Total Countand Plate Counts within Different Size Groups. *Microb. Ecol. 13*, 59-74.

OMS. (2005). *Manual de bioseguridad en el laboratorio.* OMS. 3ª ed.Catalogación por la Biblioteca de la OMS. ISBN 92 4 354650 3. Atlanta.

Parés, R. & Juárez, A. (1996). *Bioquímica de los microorganismos*. Barcelona: Reverté.

Park, T. K. (2005). *Foundations in Microbiology.* (15th Ed.). New York: MccGraw- HiII.

Parkinson, D. & Coleman, C. D. (1991). Microbial Communities, Activity and Biomass. *Agric. Ecosystems. Environ. 34,* 3-33.

Perry, J. J. & Staley, J. (1999). *Microbiology: Dynamics and Diversitty*. (2th Ed.). Philadelfia: Hareourt College Publishers.

Pollack, A. R., Findlay, L., Mondschein, W. & Modesto, R. R. (2005). *Laboratory Exercises in Microbiology.* (2ndEd.). USA: John Wiley & Sons.

Prescott, L. M., Harley, J. P. & Klein, D. A. (1999). *Microbiology*. (4th Ed.). Wisconsin:McGraw-Hill.

Salyers, A. S. & Whitt, D. D. (2001). *Microbiology. Diversity, Disease and the Environment.*Maryland: Fitzgerald Science Press.

Scamardella, J. M., (1999). «Not plants or animals: a brief history of the origin of Kingdoms Protozoa, Protista and Protoctista». *Int Microbiol* 2 (4), 207-16.

Scharlau Chemie. (2011). *Handbook Microbiological Culture Media*, (11ª Ed.). Sharlau Chemie.

Talaro, P. K. (2005). *Foundations in Microbiology*, (5th Ed.). New York: McGraw-Hill.

Taylor, J. (1962). The Estimation of Numbers of Bacteria by Tenfold Dilution Series. *J. Appl. Bacteriol., 25,* 54-61.

Tortora, G. J. (2010). *Microbiology and Introduction*. New Jersey: Pearson Benjamin Cummings.

Universidad de Almería. (s.f.). *Estructuras vegetativas*. Recuperado de http:/www.ual.es/GruposInv/myco-ual/vegetat.htm

Warcup, J. H. (1955a). Isolation of fungi from Hyphae present in Soil. *Nature,1975*, 953.

Warcup, J. H. (1955b). On the Original of Colonies of Fungi Developing on soil Dilution Plate. *Trans. Br. Mycol. Soc. 38,* 298-301.

Wheelis, M. L. (2008). *Principles of Modern Microbiology*. USA: Jones and Bartlett Publishers.

Páginas Webs

https://extension.illinois.edu/soil/index.html

Índice de figuras

Figura 1. Uso del mechero

Figura 2. Manipulación de tubos taparroscas

Figura 3. Manipulación de cajas de Petri

Figura 4. Cabina de bioseguridad clase I

Figura 5. Cabina de bioseguridad clase II

Figura 6. Cabina de bioseguridad clase III

Figura 7. Forma cocos

Figura 8. Agrupaciones de los cocos

Figura 9. Forma bacilos

Figura 10. Agrupación de los bacilos

Figura 11. Aspectos y extremos de los bacilos

Figura 12. Formas helicoidales

Figura 13. Forma filamentosa

Figura 14. Coloración de cápsula con tinta china

Figura 15. Coloración de esporas

Figura 16. Microscopio óptico

Figura 17. Elevación

Figura 18. Borde

Figura 19. Consistencia mucoide

Figura 20. Autoclave

Figura 21. Técnica de siembra por agotamiento o estría

Figura 22. Aspecto después de la incubación de la técnica de siembra por agotamiento o estría

Figuras 23. Tipos de siembra en tubo

Figuras 24 y 25. Esquema de la cámara de Neubauer

Figura 26. Jarra de anaerobiosis

Figura 27. Método de extensión o superficie

Figura 28. Siembra por vertido en placa o en profundidad

Figura 29. Esquema de la cuadrícula de la cámara de Neubauer

Figura 30. Filtración por membrana

Figura 31. Sistema de filtración completo

Figura 32. Espectrofotómetro

Figura 33. Distribución de los discos

Figura 34. Tipos de hifas

Figura 35. Ejemplo de la reproducción sexual

Figura 36. Ejemplo de la reproducción asexual

Figura 37. Levaduras en gemación

Figura 38. Formación de esporas (*Mucor*)

Figura 39. Formación de conidios (*Penicillium*)

Figura 40. Formación de conidios (*Fusarium*)

Figura 41. Formación de conidios (*Curvularia*)

Figura 42. Montaje del microcultivo (vista desde la base)

Figura 43. Prosénquima

Figura 44. Pseudoparénquima

Figura 45. Estroma

Figura 46. Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*

Figura 47. Rizoides y estolones **(***Rhizopus*)
Figura 48. Rizomorfos de *Armillaria mellea*
Figura 49. Colonización en pino por *Pisolithus tinctorius*
Figura 50. Apresorios de *Pythium* sp.
Figura 51. Haustorio de una roya en células de pino

Índice de tablas

Tabla 1. Reacciones de la bacteria durante la coloración de Gram
Tabla 2. Tabla de resultados
Tabla 3. Nutrientes en la naturaleza y en los medios de cultivo
Tabla 4. Número más probable con dos tubos por dilución

La versatilidad microbiana hace que los microorganismos jueguen un rol importante en la conservación del medio ambiente, la salud y la industria. Ellos constituyen también excelentes sistemas modelo para el estudio de la genética molecular y la fisiología celular. De igual forma, el conocimiento de nuevas técnicas, como la tecnología del ADN recombinante, ha revolucionado tanto la investigación como la aplicación práctica en todas las áreas de la microbiología.

Dado el importante valor que representa esta disciplina, he desarrollado este Manual fundamentos y técnicas básicas en microbiología, con el cual pretendo poner a disposición de los usuarios los conocimientos esenciales y actualizados de los procedimientos básicos utilizados en microbiología; asimismo, este libro constituye una herramienta para el manejo de técnicas que permitan despertar en el estudiante el deseo de conocer e investigar más allá de lo adquirido durante el curso.

El texto está dirigido a estudiantes de ciencias básicas, ciencias agrícolas, ingenierías, e incluye temas tales como: medidas de bioseguridad, preparación de medios de cultivo, técnicas de esterilización, siembra e identificación de microorganismos, fisiología, control del crecimiento microbiano y antibiosis.

Docente asociada a la Escuela de Ciencias Biológicas. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC-Tunja). Coordinadora Grupo Biología Ambiental. Sus líneas de investigación están enfocadas en el componente suelo-agua-aire. Microbiología de suelos agrícolas, suelos ácido sulfatados y suelos de alta montaña e interacciones-suelo-planta. Biocontrol y Bioinoculantes. Microbiología de aguas residuales, aguas naturales y potables. Aerobiología fúngica y bacteriana.

Uptc
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia
EDITORIAL UPTC
Dirección de Investigaciones
ISBN: 978-958-660-234-1
9 789586 602341