

Prólogo

El presente documento es una versión mejorada y ampliada del *Manual de prácticas de laboratorio: microbiología general y aplicada* (2012), la cual incorpora nuevas unidades temáticas y la descripción gráfica de cada uno de los procedimientos abordados.

El texto de *Métodos analíticos de microbiología general y aplicada* es la herramienta de trabajo de laboratorio de las asignaturas de Microbiología General, Microbiología Agrícola, Microbiología Ambiental y Microbiología de Alimentos que se imparten en los programas académicos de Biología, Ingeniería Agronómica, Ingeniería Ambiental y Sanitaria e Ingeniería Pesquera de la Universidad del Magdalena.

La fundamentación teórica de los diferentes temas que se abordan en el presente texto permite tener una idea más clara de los propósitos y procedimientos de la microbiología en los distintos campos de aplicación. Por consiguiente, el estudiante podrá desarrollar competencias profesionales que le harán posible estudiar los microorganismos presentes en agua, suelos y alimentos, como también aprovechar su actividad metabólica en pro de solucionar problemas de ambientes contaminados.

Agradezco a la Universidad del Magdalena, en especial a la Vicerrectoría de Investigación, por hacer posible la publicación de esta obra en la Editorial Unimagdalena, contribuyendo al fortalecimiento de la academia y a la investigación de toda la comunidad universitaria que pueda hacer uso de este texto.

Alcances

Al finalizar cada sesión de laboratorio, el estudiante estará capacitado para:

- Reconocer, aislar e identificar diferentes microorganismos.
- Aplicar las técnicas y procedimientos para el análisis microbiológico en diferentes muestras.

Normas de bioseguridad

1. Utilizar una bata de laboratorio, la cual debe colocarse antes de ingresar al laboratorio y deberá estar siempre abrochada.
2. Evitar el uso de sandalias o zapatos abiertos durante la realización del laboratorio, con el fin de prevenir accidentes mecánicos.
3. Evitar el uso de aparatos de distracción durante la realización de la práctica. Cuando se requiera la utilización de aparatos electrónicos como teléfonos celulares, esta deberá ser autorizada por el docente o encargado del laboratorio.
4. No se deben guardar ni consumir alimentos y bebidas dentro del laboratorio. No fumar.
5. Emplear guantes, gorros y tapabocas cuando en las prácticas sean requeridos.
6. La mesa debe estar libre de todo objeto no útil para desarrollar el trabajo, y al final debe dejarse limpia y libre de material o equipo ajeno a su funcionamiento normal.
7. Trabajar en la mayor parte posible bajo estrictas normas de asepsia.
8. Durante las prácticas se deberán mantener las más estrictas normas de esterilidad. Las asas de siembra deben ser esterilizadas a la llama del mechero antes y después de su uso.
9. Los cultivos microbianos deben manipularse al lado del mechero. Al extraer una muestra (inóculo) desde un tubo de ensayo, este deberá mantenerse en posición horizontal para evitar la entrada de microorganismos contaminantes. Será preciso además flamear la boca del tubo a la llama del mechero antes y después de retirar el inóculo respectivo. Al retirar los tapones desde la boca del tubo, esto debe hacerse con ayuda de la palma

de la mano y el dedo meñique. Por ningún motivo dejar el tapón de algodón sobre el mesón.

10. Esterilizar el material contaminado antes de desecharlo.
11. Depositar los desechos que se produzcan durante la práctica en las canecas respectivas según corresponda a material biológico (caneca roja), ordinario no reciclable (caneca verde), reciclable papel-cartón (caneca gris) y material reciclable plástico (caneca azul).
12. Marcar debidamente las muestras que representen un riesgo biológico. Así mismo, los cultivos de microorganismos deberán rotularse antes de llevarlos a incubar.
13. Lavarse las manos antes y después de concluir una práctica.
14. Informar inmediatamente cualquier accidente al encargado del laboratorio.

Glosario

Agar agar: sustancia solidificante. Es un polisacárido que se obtiene de algunas especies de algas y que la mayoría de los medios de cultivos sólidos contienen. La palabra “agar” es utilizada comúnmente para llamar a los medios de cultivos sólidos.

Aislamiento: procedimiento mediante el cual se separan los microorganismos desde cualquier muestra o ambiente en un medio de cultivo.

Ambiente *indoor*: término que usualmente aplica al aire de ambientes interiores no industriales (colegios, clínicas, bibliotecas, restaurantes, oficinas, etc.) parcialmente cerrados.

Ambiente *outdoor*: término que se refiere al ambiente exterior (campo de fútbol, jardines, mercados, zonas industriales, rellenos sanitarios, etc.), es decir, ambientes no encerrados.

Antibióticos: sustancias producidas por algunas bacterias u hongos o fármacos sintéticos que inhiben o matan el crecimiento de los microorganismos.

Asas de siembra: instrumento elaborado en una mezcla de metales (platino, acero, aluminio y nicromo) que se emplea para transportar los inóculos y realizar las siembras de los microorganismos.

Asepsia: es la ausencia de microorganismos en ambientes, instrumentos de laboratorios y muestras biológicas. Esta se logra con un buen procedimiento de esterilización.

Batería bioquímica: es el conjunto de medios de cultivos o sustratos específicos que se emplean para la identificación bioquímica de las bacterias.

Caldo: medio de cultivo líquido.

Cepa: población de células genéticamente idénticas derivadas de una única célula. También se definen como el conjunto de especies bacterianas que comparten al menos una característica.

Colilert: es un sustrato definido empleado para la determinación de coliformes y *Escherichia coli* presentes en muestras de agua.

Colonias: conjunto de células microbianas formadas en la superficie de un medio de cultivo sólido. Las colonias presentan variaciones en aspectos de la morfología como la forma, los bordes, la elevación, la textura y la coloración.

Contaminación: es la alteración de un cultivo puro microbiano por la presencia de otro microorganismo. También hace referencia a la presencia de microorganismos infecciosos en muestras de alimentos, medicamentos, agua para consumo y ambientes limpios.

Cultivo axénico: es un cultivo conformado por una sola especie proveniente de una sola célula bacteriana. Se puede decir que un cultivo axénico es un cultivo puro.

Cultivo mixto: es un cultivo conformado por dos o más células bacterianas de diferentes especies.

Desinfección: es el procedimiento físico o químico mediante el cual se busca eliminar o inactivar los microorganismos presentes en un área, superficie, objeto o instrumento. La desinfección se logra con el uso de sustancias químicas llamadas desinfectantes, como el alcohol antiséptico, solución de hipoclorito de sodio, peróxidos, yoduros, etc., que actúan de manera bacteriostática.

Diluciones seriadas: es un procedimiento mediante el cual se busca disminuir la concentración gradual de microorganismos presentes en una muestra. La dilución parte de un volumen conocido de la muestra (solución madre) y se lleva a un tubo de ensayo que contiene un volumen exacto de agua peptonada 0,1% o agua destilada estéril, y a partir de este se lleva a otro tubo con igual volumen hasta donde se logre definir la concentración más baja o concentración deseada.

Fermentación: es el proceso metabólico que realizan los microorganismos como bacterias y hongos en condiciones anaeróbicas. Consiste en transformar un compuesto orgánico, por ejemplo un azúcar (glucosa), en otro compuesto orgánico, como ácidos orgánicos (ácido fórmico, cítrico, succínico, etc.), alcoholes (butanol, etanol, etc.) y gases (CO_2 y CH_4).

Esterilización: es el proceso mediante el cual se matan o eliminan los microorganismos presentes en cualquier objeto o ambiente. La esterilización se realiza a través de mecanismos físicos como el tratamiento térmico con calor directo (fuego), calor húmedo (autoclaves) y calor seco (estufas); radiación (luz UV), filtración (filtros de 0,22-0,45 μm) y procedimientos químicos empleando reactivos como ácidos, alcoholes, aldehídos y fenoles.

Incubación: se refiere al proceso mediante el cual los organismos o microorganismos crecen bajo condiciones controladas de temperatura. Por lo general, la incubación de los cultivos bacterianos en el laboratorio se realiza a una temperatura de 35-37 °C durante 24 horas.

Infección: es la introducción y multiplicación de un microorganismo patógeno en un organismo huésped al cual le genera un daño o trastorno. Las infecciones pueden ser locales o sistémicas, causadas por bacterias, hongos, virus y protozoos.

Inóculo: suspensión de microorganismos presentes en una muestra biológica (tejidos, órganos, sustancias de secreción, etc.) o en muestras de alimentos, agua, suelos o ambientes. También se conoce como inóculo la pequeña cantidad de muestra que contiene los microorganismos que se depositan en un medio de cultivo o que son transferidos a un huésped.

Medios de cultivos: son preparados sólidos o líquidos estériles que contienen todos los nutrientes necesarios y en la cantidad adecuada para el desarrollo de los microorganismos.

Número más probable (NMP): técnica cualitativa que se emplea para estimar la densidad del crecimiento bacteriano. Se fundamenta en la determinación de la presencia o ausencia de diluciones consecutivas de características particulares de microorganismos presentes en muestras de agua o suelo.

Patógeno: agente biológico que tiene la capacidad de causar enfermedad o daño en un organismo huésped. Entre los microorganismos patógenos más agresivos se encuentran las bacterias, los virus y los hongos.

Sensidiscos: discos de papel que contienen un antibiótico de concentración conocida. Se emplean para determinar la sensibilidad o resistencia de un microorganismo frente a un antibiótico a través de técnicas semicuantitativas como los antibiogramas por difusión en agar por discos.

Tinción: es la acción de teñir las células microbianas mediante la aplicación de sustancias químicas conocidas como colorantes. Según la cantidad de colorantes que se emplean, las tinciones pueden ser simples o compuestas. Buscan dar realce y definición a la forma y agrupación de las células.

Torunda: herramienta que se emplea para la toma de muestras microbiológicas (inóculos) en organismos vivos o monitorear superficies planas e irregulares, como también para la realización de siembras masivas en placas de agar. Las torundas también se conocen como hisopos.

Siembras microbiológicas: procedimiento que consiste en introducir un inóculo en un medio de cultivo con el fin de iniciar un cultivo microbiano. Las siembras se realizan con ayuda de un asa, a través de diferentes métodos como punción, estrías, extensión en superficie, etcétera.

Unidades formadoras de colonias (UFC): es la unidad de medida de la técnica de recuento directo en placa. Se emplea para contar el número de colonias de bacterias o células fúngicas aisladas a partir de muestras de suelo, agua o alimentos. Las UFC están conformadas por el número mínimo de células viables que dan lugar a una colonia que se obtienen de una serie de diluciones. Las UFC se miden en unidades de volumen (UFC/mL) o masa (UFC/g).

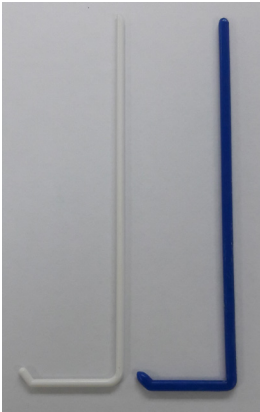
Xenobiótico: compuesto químico complejo que no existe en la naturaleza sino que ha sido diseñado por el hombre. Es de difícil degradación y tiende a permanecer mucho tiempo en el suelo o cuerpos de agua.

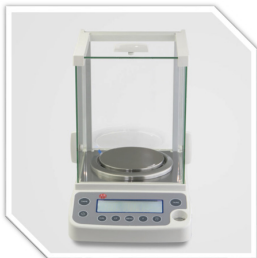
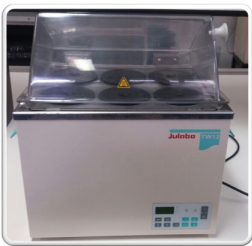
Elementos y equipos de uso frecuente en el Laboratorio de Microbiología

En esta sección se describen las herramientas de trabajo y los equipos de mayor uso en el Laboratorio de Microbiología, de manera que el estudiante pueda tener una idea clara sobre las funciones y el manejo de estos elementos (tabla 1).

Tabla 1. Descripción de elementos y equipos de mayor uso en el Laboratorio de Microbiología

Asa bacteriológica recta		Se utiliza para la toma de inóculos y posterior siembra en medios de cultivos sólidos en forma recta o inclinada (pico de flauta). Es el instrumento ideal para realizar siembras por punciones o picaduras.
Asa bacteriológica redonda		Se utiliza para la toma de inóculos y posterior siembra en medios de cultivos líquidos y sólidos. Es el instrumento ideal para realizar siembras de estría por agotamiento. El aro debe estar completamente cerrado y no puede medir más de 3 mm de diámetro.

Asa de Digrafsky		Se emplea para extender las muestras sobre la superficie de una placa de Petri con medio de cultivo sólido. Puede ser en forma de L o triangular. Es muy útil para la obtención de colonias a través de la técnica del recuento directo en placa.
Asa fúngica		Se emplea para extraer las muestras de mohos presentes en muestras vegetales, como también para la toma de inóculos de cultivos fúngicos y llevarlos a placas con medio de cultivo a través de la siembra por punción.
Autoclave horizontal automático		Equipo de esterilización automático. El proceso se da por acción de calor húmedo: al calentar el agua en la bóveda del equipo, se genera vapor a una temperatura de 121 °C y una presión de 15 lb. El ciclo de esterilización tarda quince minutos, destruyendo las células microbianas vegetativas y esporas de resistencias.

Autoclave tipo olla semiautomático		Esterilizador eléctrico a vapor. El proceso se da por acción de vapor a una temperatura de 121 °C y 15 lb de presión durante quince minutos.
Balanza analítica		La balanza es el instrumento que mide la masa de una muestra expresada en kilogramos, gramos o miligramos. Es útil en el laboratorio de microbiología para pesar medios de cultivos, reactivos y muestras de alimentos y suelo.
Bandeja Quanti-Tray		Estas bandejas son útiles en los análisis microbiológicos del agua por la técnica del sustrato definido Quanti-Tray. Contienen 48 pozos grandes y 48 pozos pequeños, donde queda depositado el volumen de agua que se va a analizar.
Baño de María		Este equipo se emplea para el calentamiento uniforme de algunas muestras de alimentos, como también para temperar o disolver sustancias nutritivas como los medios de cultivos y algunas tinciones.