



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES E INGENIERÍA

MATERIAL DIDACTICO

MANUAL DE PRACTICAS DE MICROBIOLOGÍA BÁSICA

AUTORES:

Dra. Mónica Bonilla Salinas

Departamento de Biotecnología,
División de Ciencias Biológicas y de la Salud,
UAM-Iztapalapa

Dra. Silvia Pajares Moreno

Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática,
Unidad Académica de Biodiversidad y Ecología Acuática,
Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

Dr. Juan Gabriel Vigueras Ramírez

Dr. Juan Carlos Sigala Alanís

Dra. Sylvie Le Borgne

Departamento de Procesos y Tecnología,
División de Ciencias Naturales e Ingeniería,
UAM-Cuajimalpa

ISBN: 978-607-28-0975-8

Diciembre 2016

MATERIAL DIDÁCTICO

ISBN:

978-607-28-0975-8

Tipo de publicación:

Docencia – Manual de Prácticas de Laboratorio

Fecha:

Lunes 12 de diciembre de 2016

Título del trabajo:

Manual de Prácticas de Microbiología Básica

Nombre de la Licenciatura:

Ingeniería Biológica

Nombre de la UEA:

Microbiología

Autores:

Dra. Mónica Bonilla Salinas¹, Dra. Silvia Pajares², Dr. Gabriel Vigueras, Dr. Juan Carlos Sigala, Dra. Sylvie Le Borgne

Adscripción:

Departamento de Procesos y Tecnología
División de Ciencias Naturales e Ingeniería
UAM-Cuajimalpa

¹ Adscripción actual: Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-Iztapalapa

² Adscripción actual: Laboratorio de Ecología Microbiana Acuática, Unidad Académica de Biodiversidad y Ecología Acuática, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dra. María de los Dolores Reyes Duarte, como coordinadora de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM-Cuajimalpa, por su interés y apoyo durante la realización de este Manual de Prácticas de Microbiología Básica.

A Abigail Hernández Vázquez, Ingrid Hernández Martínez, Jazmín López Tovar, alumnas de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM-Cuajimalpa y a Patricia Amador Lemus, alumna de la Licenciatura en Biología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN, por su apoyo en la realización de algunas figuras.

A Karina Maldonado Ruiz Esparza y Fátima Hernández Martínez, egresadas de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM-Cuajimalpa, por haber revisado la primera versión de este Manual y sugerido prácticas adicionales.

A los alumnos, ex alumnos y egresados de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la UAM-Cuajimalpa que, con sus comentarios durante la realización de las prácticas, permitieron enriquecer este Manual.

Los autores

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE CUADROS	5
PRESENTACIÓN.....	6
INSTRUCCIONES GENERALES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA	8
LISTA DEL MATERIAL QUE CADA EQUIPO NECESITA ADQUIRIR PARA LAS SESIONES PRÁCTICAS	11
PRÁCTICA 1 - OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS EN CULTIVOS Y MUESTRAS AMBIENTALES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA	12
PRÁCTICA 2 - ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL, PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y ASEPSIA.....	19
PRÁCTICA 3 - INOCULACIÓN DE MEDIOS SOLIDOS Y AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS.....	29
PRÁCTICA 4 - TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM.....	38
PRÁCTICA 5 – RECUENTO EN PLACA DE BACTERIAS TOTALES Y BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS..	45
PRÁCTICA 6 - CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	52
PRÁCTICA 7 - PRUEBAS BIOQUÍMICAS	58
PRÁCTICA 8 – AGENTES ANTIMICROBIANOS Y ANTIBIÓTICOS.....	68
PRÁCTICA 9 - MICROCULTIVOS Y OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE HONGOS FILAMENTOSOS	76
PRÁCTICA 10 – ECOLOGÍA MICROBIANA: LA COLUMNA DE WINOGRADSKY.....	83
BIBLIOGRAFÍA CITADA Y ADICIONAL	89
PÁGINAS WEB DE INTERÉS.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Tamaño de los microorganismos	12
Figura 1.2.	El microscopio óptico compuesto	13
Figura 1.3.	Partes del microscopio de campo claro	18
Figura 2.1.	Métodos de control microbiano	19
Figura 2.2.	Material de laboratorio de Microbiología	20
Figura 2.3.	Autoclave	21
Figura 2.4.	Fotografía de colonias de bacterias y hongos formadas sobre agar sólido en caja Petri	22
Figura 3.1.	Agar	29
Figura 3.2.	Técnica de siembra por extensión con varilla de vidrio	32
Figura 3.3.	Toma de muestra en condiciones de asepsia	33
Figura 3.4.	Técnica de siembra por estrías	34
Figura 4.1.	Tinción de Gram	38
Figura 4.2.	Pared de las bacterias Gram negativas y Gram positivas	39
Figura 4.3.	Preparación de un frotis	40
Figura 4.4.	Esquemas de pared celular de bacterias	43
Figura 5.1.	Técnica de dilución y cuenta en placa	45
Figura 6.1.	Fases de la curva de crecimiento bacteriano	52
Figura 6.2.	Turbidimetría	53
Figura 7.1.	Designación de taxones	58
Figura 7.2.	Pruebas que permiten diferenciar algunos bacilos Gram negativos	59
Figura 8.1.	Resistencia de los microorganismos al calor	68
Figura 8.2.	Descubrimiento accidental por Fleming de la acción antibacteriana de la penicilina producida por una colonia de <i>Penicillium</i>	69
Figura 8.3.	Estriado de cajas Petri para la determinación de la CMB	72
Figura 9.1.	Estructuras de hongos filamentosos	76
Figura 9.2.	Preparación de microcultivo	79
Figura 9.3.	Observación de microcultivo	80
Figura 10.1.	Comunidades microbianas, gremios y poblaciones	83
Figura 10.2.	Columna de Winogradsky	84

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 2.1.	Descripción morfológica de microorganismos en cajas de Petri con diferentes tratamientos	27
Cuadro 3.1.	Descripción morfológica de microorganismos en cajas de Petri con diferentes tratamientos	34
Cuadro 5.1.	Conteo de bacterias totales y bacterias formadoras de esporas en muestras de suelo	49
Cuadro 6.1.	Datos de DO ₆₀₀ obtenidos respecto al tiempo	55
Cuadro 7.1.	Resultados de pruebas de hidrólisis de almidón	64
Cuadro 7.2.	Resultados de pruebas de utilización de hidratos de carbono	64
Cuadro 7.3.	Resultados de pruebas de rojo de metilo	64
Cuadro 7.4.	Resultados de pruebas de catalasa	64
Cuadro 7.5.	Resultados de pruebas de reducción de nitratos	64
Cuadro 8.1.	Preparación de tubos para determinación de CMI	71
Cuadro 8.2.	Resultados de determinación de CMI y CMB para una cepa de <i>E. coli</i> expuesta a dos agentes antimicrobianos diferentes	73
Cuadro 8.3.	Ejemplos de agentes antimicrobianos	74
Cuadro 10.1.	Cambios físicos observados en la columna de Winogradsky a lo largo del tiempo	86
Cuadro 10.2.	Tipos de microorganismos observados en diferentes zonas de la columna de Winogradsky	87
Cuadro 10.3.	Características de bacterias típicas de columnas de Winogradsky	88
Cuadro 10.4.	Reacciones globales llevadas a cabo por distintos microorganismos presentes en columnas de Winogradsky	88

PRESENTACIÓN

Este manual de prácticas de laboratorio cubre el programa de estudios de la Unidad de Enseñanza Aprendizaje (UEA) de “Microbiología” del área de formación básica de la Licenciatura en Ingeniería Biológica de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa. Numerosos procesos y tecnologías derivadas de la Ingeniería Biológica involucran microorganismos, algunos de sus componentes o productos de su metabolismo, por lo que este manual integra conocimientos prácticos básicos para el estudio de microorganismos de manera segura y eficiente.

Las prácticas aquí descritas contemplan el empleo de material, medios de cultivo y equipos básicos utilizado en los laboratorios de microbiología, así como la realización de experimentos sencillos que ilustran el buen manejo de los microorganismos. Los temas abordados en el manual incluyen la microscopía óptica, esterilización, preparación de medios de cultivo, técnica aséptica, inoculación y aislamiento en medio sólido, tinción de Gram, recuento de bacterias en placa, turbidimetría, curva de crecimiento, pruebas bioquímicas, antimicrobianos, observación de hongos filamentosos y columna de Winogradsky. Si bien la práctica de Winogradsky es la última de este manual, se recomienda iniciar con ella para dejar tiempo suficiente a lo largo del trimestre para que se establezcan las diferentes zonas de crecimiento estratificadas en función de la concentración de oxígeno en las columnas.

Cada práctica contiene los siguientes apartados:

- **Introducción:** se presentan algunos antecedentes básicos para el posterior entendimiento y desarrollo del tema.
- **Materiales, reactivos y equipo:** se enlistan los materiales, reactivos y equipos necesarios para realizar la práctica (cantidades por equipo).
- **Métodos:** se explica paso a paso cómo llevar a cabo el experimento.
- **Resultados:** orienta acerca de lo que hay que observar, calcular, reportar y cómo presentar los datos.
- **Discusión:** se enlistan preguntas específicas que permitirán un mejor análisis y discusión de los resultados obtenidos en el reporte de Práctica que entregarán los alumnos.
- **Cuestionario:** se enlistan preguntas generales para ampliar el tema de la práctica. Las respuestas deberán ser incluidas en el reporte después de la Discusión de los resultados.

Durante las sesiones, el profesor deberá estar disponible para resolver dudas acerca del desarrollo de las Prácticas, guiar los alumnos en la interpretación de los resultados y profundizar la información necesaria para discutir los resultados y contestar las preguntas del cuestionario.

Los reportes deberán incluir un marco teórico, describir de manera concisa los experimentos que se llevaron a cabo y los resultados obtenidos, así como discutir los resultados y responder las preguntas del cuestionario. Los requisitos detallados y el formato de los reportes serán indicados por el profesor durante la primera sesión de laboratorio.

Es responsabilidad de los alumnos anotar los detalles del desarrollo de las Prácticas y los resultados obtenidos en una bitácora.

La metodología utilizada en ocasiones es específica para el equipo disponible en nuestro laboratorio, pero cualquiera de estos experimentos puede ser optimizado para equipos similares, para ampliar las sesiones prácticas de otras UEAs de la UAM, así como en cursos de Microbiología general de otras universidades.

INSTRUCCIONES GENERALES EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

Para el desarrollo de las prácticas es conveniente tener en cuenta algunas normas elementales que deben respetarse para la seguridad del estudiante y su entorno.

1. No introducir alimentos ni bebidas al laboratorio.
2. Se deberá lavar meticulosamente las manos con jabón y agua antes de salir del laboratorio.
3. Se debe de recoger el cabello largo para trabajar en el laboratorio, así como tener las uñas cortas, limpias y sin esmalte.
4. No se admitirán visitas que distraigan la atención y pongan en riesgo la seguridad en el trabajo que se realiza.
5. Usar bata blanca bien abotonada.
6. No sacar del laboratorio ningún equipo, medios o cultivos microbianos (a menos que el profesor indique lo contrario).
7. Evitar la acumulación sobre la mesa de trabajo de objetos no relacionados con la práctica de laboratorio.
8. Colocar todos los objetos personales (libros, mochilas, etc.) debajo de la mesa de trabajo.
9. Antes del día de la práctica, debe leerse detenidamente para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica. Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente en una bitácora apenas se conozcan.
10. El orden y limpieza deben persistir en todas las prácticas de laboratorio. En consecuencia, al término de cada sesión práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado.
11. Es necesario limpiar la mesa de trabajo antes y después de cada práctica con alcohol y finalmente agua.
12. Cada equipo será responsable de su zona de trabajo y de su material.
13. Utilizar guantes, lentes, pinzas y propipetas cuando se requiera, para prevenir accidentes.
14. Antes de utilizar un compuesto químico, se debe revisar su etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de manipulación, en particular verificar si se debe manipular dentro de campanas de extracción. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados sin consultar con el profesor.
15. No tocar con las manos, y menos con la boca, los productos químicos.
16. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o forzar sus mecanismos.

17. Las pipetas se usarán con una propipeta en su extremo superior para regular la caída de líquido. Nunca pipetear con la boca.
18. Los productos inflamables (gases, alcohol, éter, etc.) deben mantenerse alejados de las llamas de los mecheros. Si hay que calentar tubos de ensayo con estos productos, se hará a baño María, nunca directamente a la flama. Si se manejan mecheros de gas se debe tener cuidado de cerrar las llaves de paso al apagar la flama.
19. Cuando se manejen productos corrosivos (como ácidos) deberá hacerse con cuidado para evitar que salpiquen el cuerpo o las ropas. Nunca se verterán bruscamente en los tubos de ensayo, sino que se dejarán resbalar suavemente por su pared.
20. Cuando se quiera diluir un ácido, nunca se debe echar agua sobre ellos; al contrario: ácido sobre el agua.
21. Cuando se vierta un producto líquido, el frasco que lo contiene se inclinará de forma que la etiqueta quede en la parte superior para evitar que si escurre líquido se deteriore dicha etiqueta y no se pueda identificar el contenido del frasco.
22. Los medios inoculados deben colocarse en las cámaras de cultivo con su identificación respectiva, ej.: número de equipo, fecha, nombre del medio, naturaleza del espécimen o sustrato del cual se aísla.
23. En caso de accidentes, si se trata de una herida punzocortantes deberán lavarse inmediatamente la herida con agua corriente y jabón, secarse y aplicar algún antiséptico. En caso de quemaduras debe aplicarse sobre la lesión una pomada.
24. Durante las Prácticas, los alumnos deberán colocar los materiales de desecho biológico y objetos contaminados en recipientes habilitados y lugares apropiados como lo indique el profesor. Al final de las sesiones, los alumnos deberán seguir las instrucciones del profesor para la descontaminación, tratamiento, desecho y lavado de los materiales y objetos contaminados. A continuación, se indican algunas pautas generales:
 - Utilizar guantes para manipular los desechos.
 - Los cultivos y sobrenadantes de cultivos serán recogidos en un recipiente que contenga una solución de hipoclorito sódico recién preparada antes de ser eliminados por los desagües.
 - Las pipetas de vidrio, matraces, tubos, tapas, porta-objetos y otros materiales de vidrio contaminados, deberán ser enjuagados con hipoclorito sódico antes de ser lavados.
 - Los cultivos en medios solidos serán recogidos en bolsas de plástico especiales para posteriormente ser esterilizados y descartados.
 - Los materiales de plástico desechables contaminados como puntas de micropipetas, tubos, tapas y otros, deberán ser colocados en bolsas de plástico especiales para posteriormente ser esterilizados y descartados.

- Los materiales de vidrio desechables como cubre-objetos y pipetas Pasteur deberán ser enjuagados con hipoclorito sódico antes de ser desechados en contenedores especiales.

25. Los restos de colorantes deben ser vertidos en los bidones de residuos tóxicos.

LISTA DEL MATERIAL QUE CADA EQUIPO NECESITA ADQUIRIR PARA LAS SESIONES PRÁCTICAS

- 1 caja de guantes
- 1 tapabocas (individual)
- 1 rollo de papel aluminio
- 1 franela y jerga delgada
- 1 rollo de toallas de cocina
- 1 plumón negro indeleble punto fino (individual)
- 1 plumón negro indeleble punto medio (individual)
- 1 cinta masking tape
- 1 tijeras
- 1 encendedor
- 1 paquete de algodón
- 1 paquete de gasas
- 1 bote de plástico para desechos (0.5 - 1 L)
- 1 caja de palillos
- 10 ampolletas de agua inyectable de 1 mL
- 1 bata (individual)

PRÁCTICA 1 – OBSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS EN CULTIVOS Y MUESTRAS AMBIENTALES MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

INTRODUCCIÓN

La invención del microscopio en el siglo XVII permitió por primera vez la observación de los microorganismos, ya que sus dimensiones no nos permiten observarlos a simple vista (**Fig. 1.1**). El uso de este dispositivo es indispensable para el estudio de la morfología y estructura de los microorganismos, así como su reacción a diferentes colorantes, lo cual junto con otros criterios, permitirá su identificación. Todos los microscopios utilizan lentes para aumentar varias veces el tamaño real de la imagen observada y así poder distinguir diferentes estructuras.

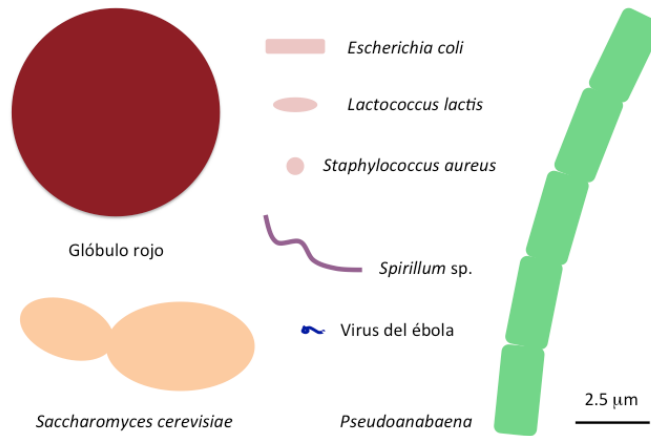


Figura 1.1. Tamaño de los microorganismos.

Existe una gran variedad de microscopios que, según la fuente de iluminación utilizada, se agrupan en:

- **Microscopios ópticos:** La fuente de iluminación es la luz. También se les conoce como microscopios de luz o compuestos, porque constan de dos series de lentes, oculares y objetivos, para formar una imagen. Existen varios tipos de microscopios compuestos: de campo claro, campo oscuro, contraste de fases, interferencia y fluorescencia. El microscopio de campo claro, el que usaremos en esta práctica, es el más utilizado y se llama así porque forma una imagen oscura sobre un fondo claro.
- **Microscopios electrónicos:** La fuente de iluminación es un haz de electrones y las lentes son electroimanes. Existen dos tipos: de transmisión y de barrido.

En el microscopio óptico de campo claro, la luz procedente de la muestra iluminada se enfoca

con uno de los cuatro objetivos, creando dentro del microscopio una imagen aumentada. El ocular aumenta todavía más esta primera imagen (**Fig. 1.2**). El aumento total se calcula multiplicando los aumentos del objetivo y del ocular. Por ejemplo, si se utiliza un objetivo 40x con un ocular 10x, el aumento total de la muestra será 400x. El aumento dependerá de las lentes y podrá incrementarse casi sin límite, sin embargo, la resolución, que depende de las propiedades físicas de la luz, es la que marca los límites de un microscopio, que en el microscopio compuesto es de 0.2 micrómetros.

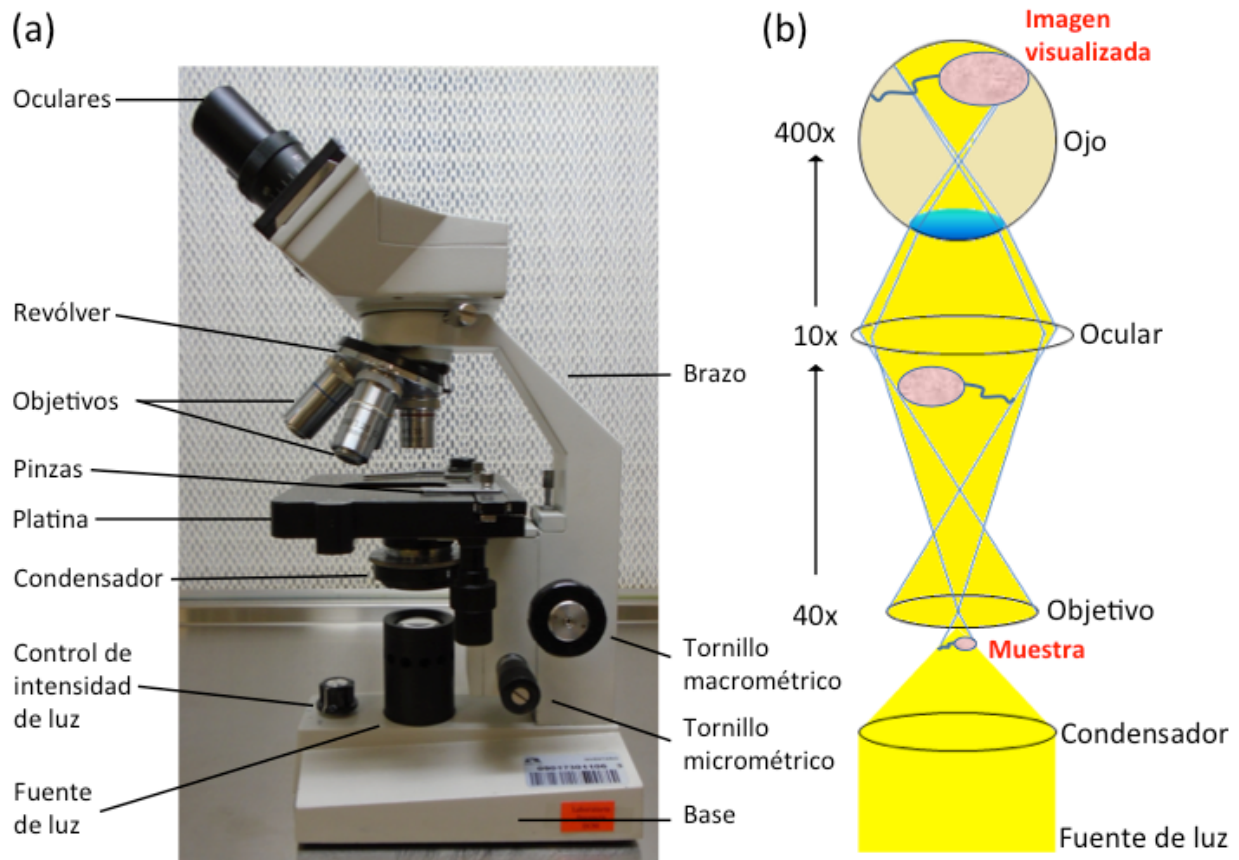


Figura 1.2. El microscopio óptico compuesto. a) Componentes del microscopio óptico compuesto; b) Trayectoria de la luz a través del microscopio compuesto.

OBJETIVOS

Que el alumno conozca las partes del microscopio óptico y los principios básicos para lograr observaciones de microorganismos de preparaciones frescas a partir de diferentes muestras ambientales, utilizando diferentes aumentos.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Microscopio óptico (1 por equipo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

- Cultivos líquidos y sólidos de levaduras, hongos, micro-algas para cada equipo

b) Proporcionados por los alumnos (por equipo)

- 1 encendedor
- 1 plumón negro indeleble punto fino
- 1 rollo de toallas absorbentes
- Agua inyectable (al menos 10 mL)
- Al menos 3 muestras ambientales: suelo, agua de charca, yogurt, fruta contaminada, pan con moho, células epiteliales de la boca, etc.

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 mechero o 1 lámpara de alcohol
- 10 portaobjetos
- 10 cubreobjetos
- 1 frasco gotero con aceite de inmersión
- 1 hoja de papel seda
- 10 pipetas Pasteur estériles
- 1 bulbo para pipetas Pasteur
- 1 asa de siembra
- 3 pisetas (agua destilada, etanol, cloro)

MÉTODOS

1.- Manejo del microscopio óptico

Procedimiento:

1. Transportar el microscopio sujetándolo del brazo con ambas manos, colocarlo en una mesa firme y limpiar las lentes con papel seda.
2. Enchufar el microscopio al transformador y éste a la red. Siempre que no se esté observando por el microscopio hay que apagar la luz.
3. Los portaobjetos y cubreobjetos deben estar limpios y libres de grasa. Lavarlos con detergente y posteriormente con alcohol. Secarlos con una toalla de papel. Marcar cada portaobjeto a ser utilizado con el nombre del microorganismo o muestra a observar.
4. Colocar la preparación sobre la platina de modo que la estructura a observar quede en el orificio central. Subir la platina con el tornillo macrométrico, mirando la preparación desde fuera hasta alcanzar el tope superior para no tocar la preparación con los objetivos.
5. Enfocar con el objetivo de menor aumento (10x) para facilitar el hallazgo de estructuras importantes. Mirando por los oculares, bajar lentamente la platina con el tornillo macrométrico hasta conseguir ver el objeto a observar lo más nítido posible. Ajustar el enfoque con el tornillo micrométrico hasta verlo claramente. Para mejorar la nitidez de la imagen, disminuir la intensidad de la luz cerrando el diafragma de la lámpara.
6. Para observar otros campos en la misma preparación, mover los tornillos de la platina suavemente hacia el campo deseado, siempre observando por el ocular para ubicar campos visuales que pudieran ser interesantes.
7. Para observar la preparación con mayores aumentos, cambiar de objetivo con un simple giro del revólver, sin mover en ningún caso el tornillo macrométrico, y corregir con el tornillo micrométrico.
8. Para utilizar el objetivo de 100x, que es el de mayor aumento, colocar una gota de aceite de inmersión en el centro de la preparación sobre el porta-objeto antes de girar el revólver.
9. Para cambiar de preparación, bajar la platina con el tornillo macrométrico, colocar el objetivo de menor aumento y quitar la preparación. Limpiar con papel seda la lente del objetivo de 100x y colocar la siguiente preparación siguiendo las indicaciones anteriores.
10. Para desconectar el microscopio, primero asegurarse de quitar la preparación, solo limpiar la lente del 100x con papel seda y, en caso necesario, la platina. Apagar y

desenchufar el transformador de la red, tapar el microscopio con su funda y transportarlo sujetándolo del brazo con ambas manos.

2.- Observación de cultivos en fresco

Procedimiento:

1. En condiciones de asepsia, tomar una alícuota de la muestra con ayuda de una pipeta Pasteur para los cultivos líquidos o con un asa de siembra flameada para los cultivos sólidos.
2. Depositar una pequeña gota de la muestra en el centro de un portaobjetos LIMPIO en el caso de cultivos líquidos y, en el caso de cultivos sólidos, colocar primero una gota de agua estéril en el centro del portaobjetos y mezclar la muestra con el agua con ayuda del asa de siembra.
3. Colocar un cubreobjetos LIMPIO sobre la gota e inmediatamente llevar la muestra al microscopio para su observación, según se indica arriba.

3.- Observación de muestras ambientales en fresco

Procedimiento:

1. En condiciones de asepsia, tomar una alícuota de muestra con ayuda de una pipeta Pasteur para las muestras líquidas o con un asa de siembra flameada para las muestras sólidas. En el caso del suelo, diluir 1g de suelo en 9 mL de agua estéril y tomar una alícuota de líquido.
2. Depositar una pequeña gota de la muestra en el centro de un portaobjetos LIMPIO en el caso de cultivos líquidos. En el caso de cultivos sólidos, colocar primero una gota de agua estéril en el centro del portaobjetos y mezclar la muestra con el agua con ayuda del asa de siembra.
3. Colocar un cubreobjetos LIMPIO sobre la gota e inmediatamente llevarlo al microscopio para su observación, según se indica arriba.

RESULTADOS

Reportar las observaciones de las preparaciones en fresco y anotar los datos importantes de la preparación y observación: tipo de muestra, aumento total usado, descripción de lo observado en cada aumento con esquemas, etc.

DISCUSIÓN

Comparar las diferentes preparaciones observadas. Menciona las diferencias que pudiste observar entre diferentes tipos de los organismos eucariontes y procariontes en cuanto a tamaño, forma, movimiento, agrupación etc. y si pudiste observar algún tipo de procariontes.

CUESTIONARIO

1. Localizar y describir brevemente la función de cada una de las partes del microscopio mostrado en la **Fig. 1.3**.
2. Definir índice de refracción, magnificación, poder de magnificación, resolución, poder de resolución, contraste, apertura numérica.
3. ¿Cuál es la función del aceite de inmersión?
4. Explicar brevemente las diferencias entre los microscopios de contraste de fases, campo oscuro y fluorescencia. ¿Cuáles son las principales aplicaciones de cada uno de ellos?
5. Mencionar las principales diferencias entre células eucariotas y procariotas en cuanto a sus componentes estructurales y morfología.
6. Mencionar las diferencias entre Protistas autótrofos y Protistas heterótrofos en cuanto a sus componentes estructurales, morfología y función que cumplen en el ecosistema.

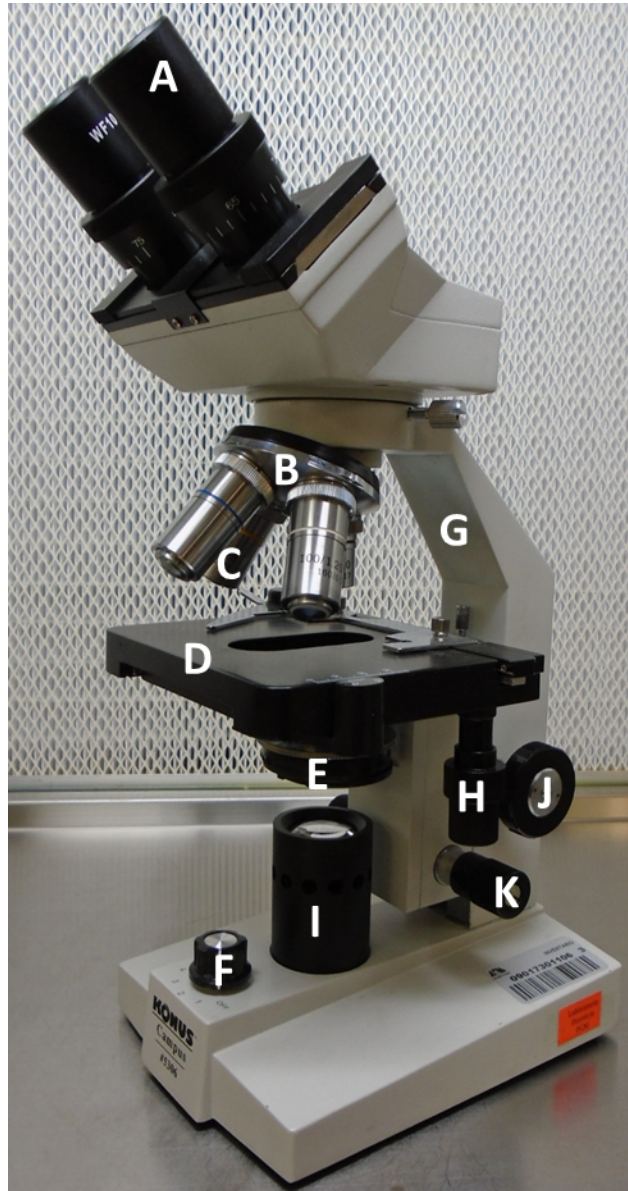


Figura 1.3. Partes del microscopio de campo claro.

PRÁCTICA 2 – ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL, PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y ASEPSIA

INTRODUCCIÓN

El concepto de esterilización en microbiología implica la eliminación de todas las formas vivas. Otras metodologías, como desinfección, pasteurización, etc., conllevan una eliminación parcial de los microorganismos existentes. En el sector salud es muy importante destruir a los patógenos para prevenir su transmisión, mientras que en diversas industrias, incluyendo la alimentaria, es importante eliminar microorganismos para conservar su calidad. Hace aproximadamente 150 años que se comenzaron a utilizar técnicas para controlar el crecimiento microbiano, desde los primeros estudios de Pasteur hasta Chamberland, quien en 1884 inventó la autoclave que se basa en el uso de calor húmedo a presión. Actualmente en los laboratorios se utilizan de manera rutinaria diversos procesos físicos, químicos y mecánicos (Fig. 2.1) para controlar el crecimiento microbiano.

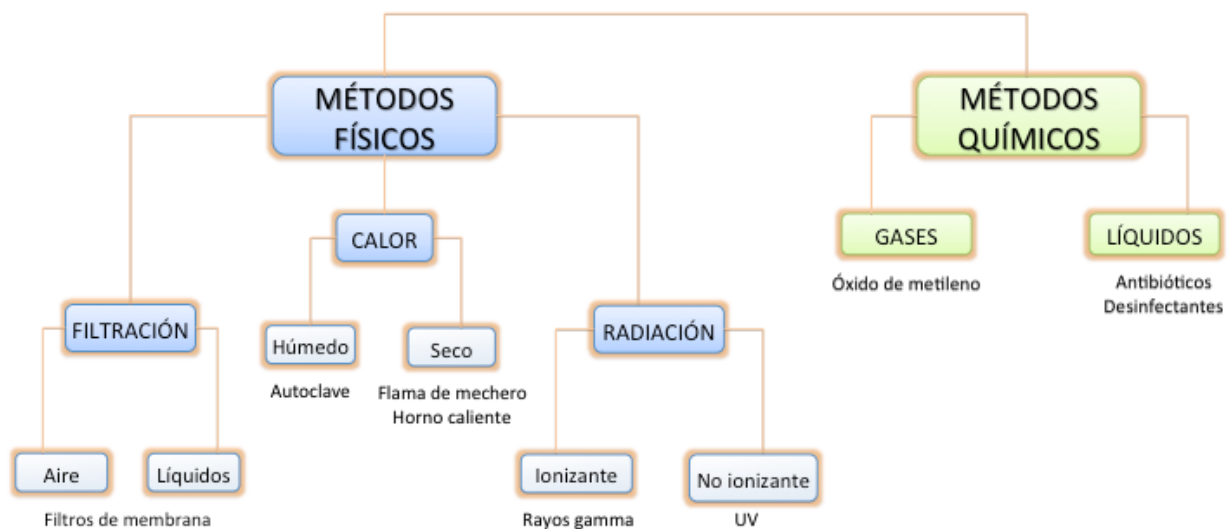


Figura 2.1. Métodos de control microbiano.

El método de esterilización por calor húmedo consiste en el uso de vapor saturado en una autoclave. La autoclave destaca entre los procedimientos más comunes para esterilizar los medios de cultivo y el material de laboratorio (Fig. 2.2). Este equipo utiliza el vapor de agua contenido en una olla cerrada, para elevar la presión en su interior hasta 1 atm y la temperatura hasta los 121°C durante 15 minutos, que es el tiempo adecuado para lograr la destrucción de virus, bacterias, hongos y esporas bacterianas y fúngicas (Fig. 2.3).



Figura 2.2. Material de laboratorio de Microbiología. 1) placas de Petri con medio de cultivo sólido; 2) tubos de ensayo con medio de cultivo líquido (caldo); 3) tubos de ensayo con medio de cultivo sólido; 4) matraz con brazo lateral para turbidimetría; 5) mechero Bunsen; 6) pipetas; 7) microplacas de 96 pocillos; 8) asas de siembra; 9) varilla de vidrio acodada; 10) micropipeta automática; 11) pipeteador manual; 12) puntas de pipeta automática; 13) placas de Petri; 14) Jarra para el crecimiento de microorganismos anaerobios; 15) placas de contacto RODAC; 16) lámina para análisis de superficies.

A finales del siglo XIX, Koch entendió la necesidad de utilizar cultivos puros. El segundo de sus postulados plantea la necesidad de cultivar y aislar los microorganismos de interés en el laboratorio para estudiarlos. Los microorganismos son demasiado pequeños para ser estudiados como individuos por lo tanto se manejan como colonias, que son grupos de células idénticas que derivan del mismo individuo por divisiones sucesivas. La multiplicación de los microorganismos en el laboratorio se logra en ambientes artificiales especiales denominados medios de cultivo. El medio de cultivo constituye el aporte de nutrientes indispensables para el crecimiento de los microorganismos y su composición química o nutricional es muy variada.

Para crecer y obtener microorganismos en cultivos puros, Koch desarrollo varios métodos. El primero de ellos fue el uso de rebanadas de papa como superficies naturales conteniendo los nutrientes necesarios para el anclaje y desarrollo de colonias microbianas. También desarrolló los primeros medios de cultivo sólidos basados en soluciones líquidas de nutrientes, solidificadas con gelatina y posteriormente agar. El agar es una sustancia derivada de un alga marina que se solidifica como la gelatina. Más tarde se inventaron las placas de Petri en las cuales se vacían y solidifican los medios de cultivo (**Fig. 2.4**).



Figura 2.3. Autoclave.

Los medios más comunes son los caldos (medios líquidos), tubos con agar inclinado, tubos con agar y cajas de Petri con agar (medios semi-sólidos y sólidos). Es necesario eliminar a los microorganismos del ambiente que pudiesen interferir con el estudio del microorganismo de interés, lo cual se logra esterilizando los medios antes de usarlos para evitar que los microorganismos presentes en el ambiente puedan desarrollarse en ellos. De la misma manera, es necesario esterilizar los cultivos antes de disponer de ellos para no contaminar el ambiente. Asimismo, en la manipulación de los medios esterilizados es necesario trabajar en condiciones de asepsia para evitar su contaminación.

La manipulación de microorganismos es una actividad de riesgo, por lo que se requiere de la aplicación de medidas de seguridad, de la utilización de áreas restringidas, de la desinfección de las superficies antes y después de trabajar y de la disposición correcta de los desechos biológicos. Las mesas de laboratorio y las estufas, por ejemplo, deben ser desinfectadas periódicamente y las autoclaves deben ser revisados constantemente y manejados adecuadamente para asegurar una esterilización segura y efectiva.

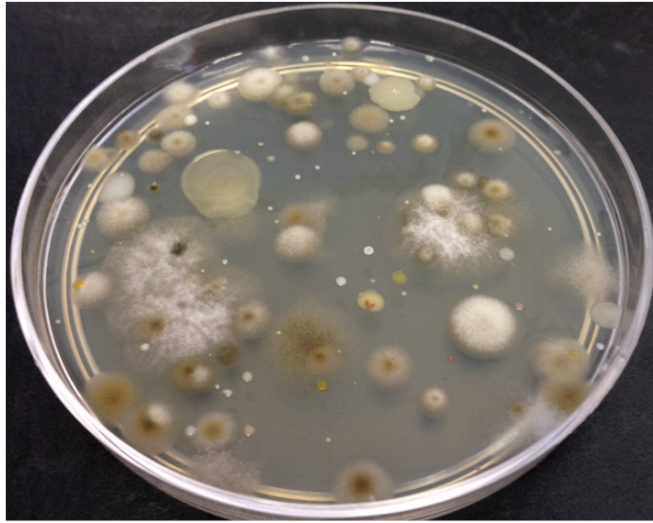


Figura 2.4. Fotografía de colonias de bacterias y hongos formadas sobre agar sólido en caja Petri.

OBJETIVOS

Que el alumno conozca la esterilización por vapor de agua y presión (autoclave), la preparación de medios de cultivo y la importancia de las condiciones de asepsia en el laboratorio.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Autoclave (1 por grupo)
- Balanzas (2 por grupo)
- Parrilla de calentamiento/agitación (1 por equipo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Incubadora con temperatura controlada a 35°C (1 por grupo)
- Baño María a 45-50°C (1 por grupo)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por los alumnos (por equipo)

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio

- 1 rollo de cinta masking tape
- 1 rollo de papel aluminio
- 1 rollo de toallas absorbentes

b) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 espátula
- 1 mechero o 1 lámpara de alcohol
- 2 botellas de vidrio de 250 mL para medio de cultivo con tapa de rosca
- 2 botellas de vidrio de 50 mL para medio de cultivo con tapa de rosca
- 8 cajas de Petri desechables de 60 × 90 mm
- 12 tubos de cultivo de 13 × 100 mm con tapa de rosca
- 1 gradilla para los tubos de cultivo
- 4 pipetas serológicas de vidrio de 10 mL
- 1 pipeteador manual para pipetas serológicas de 10 mL
- 1 probeta 250 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 asa de siembra
- 2 agitadores magnéticos
- 3 pissetas (agua destilada, etanol, cloro)

Los siguientes materiales y reactivos son por grupo:

- Agar PDA (papa y dextrosa) comercial en polvo
- Agar nutritivo comercial en polvo
- Caldo YPD (extracto de levadura, peptona y dextrosa) comercial en polvo
- Caldo nutritivo comercial en polvo
- Cinta testigo para autoclave (1 rollo)
- Pissetas son agua destilada, etanol, cloro
- Guantes de asbesto

MÉTODOS

1.- Uso del autoclave

Procedimiento:

1. Agregar agua destilada hasta cubrir la resistencia de la autoclave.
2. Colocar un tapón de algodón en el extremo opuesto a la punta de las pipetas de vidrio y esterilizarlas dentro de contenedores de acero inoxidable o envueltas en papel aluminio.
3. Cerrar sin apretar los frascos y tubos de cultivo con tapón de rosca.
4. Colocar un tapón de algodón en la boca de los matraces que contengan medios de cultivo y cubrir con un papel aluminio.
5. Cerrar las llaves de seguridad de la autoclave en forma paralela, conectar y encender.
6. Purgar, manteniendo la válvula de presión ABIERTA, hasta que se expulse el aire de la cámara.
7. Cerrar la válvula de presión cuando comience a salir el vapor.
8. Ajustar el botón de temperatura al máximo hasta que se haya alcanzado la temperatura y presión deseada, generalmente 121°C y 1 atm de sobrepresión.
9. Mantener el tratamiento durante al menos 15 min, regulando el botón de temperatura para mantener la presión constante.
10. Al finalizar el tiempo de esterilización, apagar el botón de encendido y dejar enfriar hasta que la presión haya BAJADO totalmente. La aguja del manómetro debe indicar cero.
11. Para abrir la autoclave, primero asegurarse que esté APAGADO, abrir la válvula de presión completamente y luego las llaves de seguridad.

Recomendaciones:

- Debe expulsarse completamente todo el aire de la cámara o ésta no alcanzará los 121°C, incluso aunque llegue a la presión de 1 atm.
- La cantidad de material dentro de la autoclave no deberá exceder 2/3 de la capacidad de la autoclave, pues el vapor necesita circular libremente y entrar en contacto con todos los objetos en la autoclave.
- Utilizar guantes de asbesto para introducir o sacar el material de la autoclave. El interior, la tapa, así como las paredes de la autoclave, están calientes.

2.- Preparación de medios de cultivo y material

Procedimiento:

Cada equipo preparará los siguientes medios de cultivo: 150 mL de agar PDA y de agar nutritivo y 20 mL de caldo YDP y de caldo nutritivo en botellas de vidrio para medio de cultivo.

1. Lavar la cristalería con agua y jabón y enjuagar con agua destilada.
2. Introducir una espátula LIMPIA en el frasco del reactivo para pesar la cantidad deseada de medio de cultivo e inmediatamente CERRAR el frasco. Antes de introducir nuevamente la espátula en otro frasco, limpiar la espátula.
3. Medir el volumen de agua deseado con una probeta. Para volúmenes pequeños usar preferentemente pipetas serológicas.
4. Para los dos caldos:
 - a. Colocar un agitador magnético en el interior del vaso de precipitado conteniendo el volumen deseado de agua y, sobre una base de agitación, agregar lentamente el polvo del medio o los reactivos, agitando hasta disolver. No es necesario calentar.
 - b. Verter 3 mL de cada caldo en 3 tubos de rosca, cerrarlos sin apretar y esterilizar en autoclave.
 - c. Verter el resto del caldo en botellas, cerrarlas sin apretar y esterilizar en autoclave.
5. Para los dos medios con agar:
 - a. Colocar un agitador magnético en el interior de las botellas conteniendo el volumen deseado de agua y, sobre una base de agitación, agregar lentamente el polvo del medio o los reactivos, agitando hasta disolver con calor. Es necesario hervir el medio para lograr la disolución del agar.
 - b. Verter 3 mL de cada agar nutritivo en 3 tubos de rosca, cerrarlos sin apretar y esterilizar en autoclave.
 - c. Cerrar sin apretar las botellas con agar nutritivo y PDA y esterilizar en autoclave.
6. Tubos con medio líquido:
 - a. Una vez esterilizados los tubos con caldo, apretar las tapas y mantenerlos en una gradilla (nunca acostados en la mesa de trabajo, ni en la bata).

7. Tubos con medio sólido:
 - a. Una vez esterilizados los tubos con agar, apretar las tapas, disponerlos en posición inclinada con un ángulo de 45°C para su solidificación. Posteriormente, pasarlos a una gradilla.
8. Cajas de Petri:
 - a. Una vez esterilizados los medios de cultivo con agar, enfriar las botellas en el chorro de agua (teniendo cuidado de no mojar la boca de los frascos) y mantenerlos en un baño María a temperatura de 45–50°C (si se cuenta con un baño), hasta verterlos (para evitar la formación de vapor de condensación en las tapas de las cajas).
9. Limpiar la superficie de trabajo con alcohol, prender mecheros y trabajar cerca de la flama, aproximadamente entre 10–15 cm en el área aséptica, o de preferencia dentro de la campana de flujo laminar. Para verter el medio en las cajas de Petri, abrir las botellas y las cajas en condiciones asépticas y verter aproximadamente 30 mL de medio por caja, tapar y dejar solidificar.
10. Realizar pruebas de contaminación para comprobar la esterilización y manipulación correcta de los medios de cultivo preparados:
 - a. Colocar las cajas de Petri en posición invertida y los tubos con medio líquido y sólido en la incubadora a 35°C durante 24 a 48 horas.
 - b. Revisar los tubos y las cajas para detectar la presencia de contaminantes: aparición de turbidez, nata superficial, depósito de material en el fondo de los tubos con medio líquido o formación de colonias en la superficie de los medios sólidos.

3.– Importancia de las condiciones de asepsia

Procedimiento:

1. Marcar las cajas Petri preparadas con agar nutritivo y PDA de la siguiente manera (4 cajas de cada agar por equipo):
 - a. Caja 1: Puntas de los dedos.
 - b. Caja 2: Hablar frente a la caja.
 - c. Caja 3: Abierta.
 - d. Caja 4: Control
2. Proceder de la siguiente manera alrededor de la flama del mechero o dentro de la campana de flujo laminar (cuando sea necesario –cajas 1 y 2–):

- a. Para la caja 1, tocar suavemente la superficie del agar con las puntas de los dedos.
 - b. Destapar la caja 2 y sostenerla a una distancia de 10 a 15 cm de la boca. Repetir tres veces el trabalenguas “*Tres tristes tigres tragaban trigo en un trigal en tres tristes platos. En tres tristes platos, en un trigal, tragaban trigo tres tristes tigres*”. Tapar de nuevo la caja.
 - c. La caja 3 se dejará destapada durante toda la sesión de laboratorio.
 - d. La caja 4 se conservará sin abrir.
3. Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).
 4. En la siguiente sesión, examinar las cajas y registrar los resultados para cada tipo de medio de cultivo (Cuadro 1).
 5. Regresar las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.

RESULTADOS

Reportar el crecimiento observado en las diferentes cajas de forma cualitativa en el **Cuadro 2.1**: (-) no hay crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) crecimiento regular y (+++) crecimiento abundante.

Realizar la descripción morfológica de las colonias (si es que hay) obtenidas en las cajas con los distintos tratamientos siguiendo las guías proporcionadas en la literatura (Prescott *et al.* 2002; Stanchi *et al.* 2007).

MEDIO DE CULTIVO	Puntas de los dedos	Hablar frente a la placa	Abierta al aire	Control
RESULTADOS	○	○	○	○

Cuadro 2.1. Descripción morfológica de microorganismos en cajas de Petri con diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Debes tocar las cajas de agar con tus manos?
2. ¿Puedes encontrar organismos en el aire?
3. ¿Cuándo trabajas con cultivos microbianos, puedes hablar?
4. ¿Por qué las placas de agar deben mantenerse invertidas durante la incubación?

CUESTIONARIO

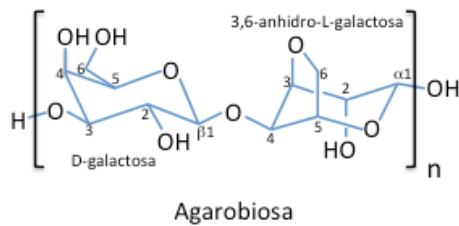
1. Definir los siguientes términos: desinfección, esterilización, sanitización, antisepsia, quimioterapia, germicida, bactericida, bacteriostático, biocida, agar, cultivo puro, cultivo axénico, colonia, medio de cultivo, incubación, contaminación.
2. Enlistar algunos de los factores que pueden alterar la eficacia de un agente antimicrobiano.
3. Explicar por qué el calor es el agente de esterilización más eficaz.
4. Explicar en que difiere la esterilización de medios de cultivo de la pasteurización de productos lácteos.
5. Definir endospora bacteriana. ¿Cómo se eliminan las endosporas bacterianas de un material contaminado?
6. Describe la función de los siguientes materiales: caja Petri, pipeta, probeta, cinta testigo.
7. ¿Cuál es la composición y utilidad de los medios de cultivo utilizados en esta práctica?

PRÁCTICA 3 – INOCULACIÓN DE MEDIOS SÓLIDOS Y AISLAMIENTO DE CULTIVOS PUROS

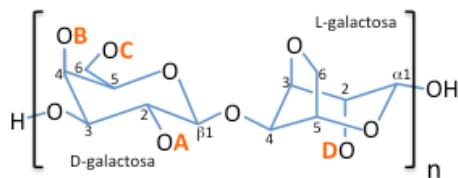
INTRODUCCIÓN

En la naturaleza los microorganismos crecen en poblaciones mixtas, formadas por muchas especies que interactúan entre sí, por lo que para poder aislar microorganismos es necesario obtener cultivos puros a partir de resiembras consecutivas en un medio sólido conteniendo agar, un polisacárido obtenido de algas marinas, como agente gelificante (Fig. 3.1). Esta técnica de aislamiento se utilizó por primera vez en el laboratorio de Koch en 1881 y continúa siendo ampliamente usada en diversas áreas microbiológicas debido a su simplicidad y utilidad.

(a) Agarosa

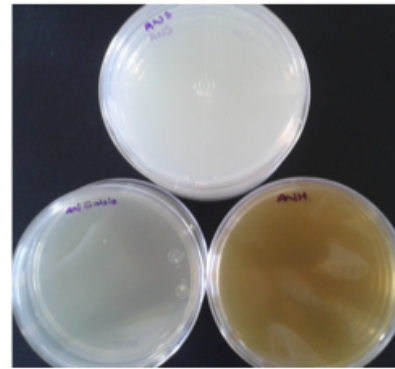


(b) Agarpectina



- A) H, SO₃⁻
- B) H, SO₃⁻, COOH
- C) H, CH₃, SO₃⁻, COOH
- D) H, CH₃, SO₃⁻

(c)



(d)

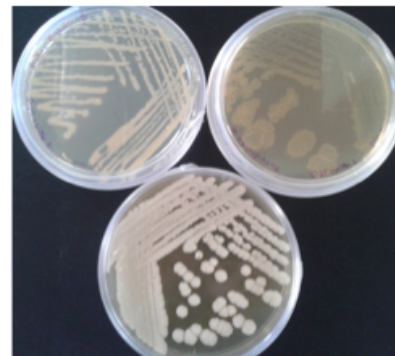


Figura 3.1. Agar. a) y b) Estructura del agar: el agar es una mezcla de dos tipos de polisacáridos, la agarosa (a), presente en mayor proporción (70%) y la agarpectina (b), una mezcla heterogénea de moléculas más pequeñas. c) y d) El agar en microbiología: medios sólidos en cajas Petri (c) y colonias de bacterias y levaduras (d).

En el laboratorio, los microorganismos como bacterias, hongos y algas se cultivan en medios de cultivo para caracterizar su crecimiento, identificarlos y determinar sus actividades metabólicas. Los microorganismos necesitan condiciones fisicoquímicas adecuadas de temperatura, pH, concentración de sales y de oxígeno, además de nutrientes como carbono, nitrógeno, **fósforo**, azufre, minerales y factores de crecimiento, que deben ser suministrados en el medio de cultivo y dependerán de los requerimientos propios de la especie que se desea cultivar.

Los componentes indispensables de un medio de cultivo son agua, nutrientes orgánicos (hidratos de carbono, aminoácidos, etc.), nutrientes inorgánicos (P, N, Mg, S, etc.). Algunos componentes alternativos pueden ser factores de crecimiento (vitaminas), isosmotizantes (NaCl), agente gelificante (agar-agar), tampones, colorantes, indicadores de pH, etc. Existen diferentes tipos de medios de cultivo, que pueden clasificarse según sus componentes químicos, naturaleza física y función. Algunos medios, por su composición, permiten el crecimiento de una gran diversidad de microorganismos. Otros en cambio, se utilizan para la selección de determinados grupos de organismos, o se desarrollan para el estudio de determinadas pruebas fisiológicas o bioquímicas.

OBJETIVOS

Que el alumno aprenda a trabajar en condiciones de asepsia y sea capaz de inocular medios de cultivo sólidos mediante el uso de dos diferentes métodos de inoculación.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

Los equipos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), o por grupo (considerando grupos de 25 alumnos) de acuerdo a lo indicado.

- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Estufa con temperatura controlada a 35°C (1 por grupo)
- Incubadora con agitación orbital y temperatura controlada a 35°C (1 para el profesor)
- Espectrofotómetro (1 para el profesor) (su uso se enseñará a los alumnos en la Práctica 6)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), o por grupo (considerando grupos de 25 alumnos) de acuerdo a lo indicado.

- 24 cajas de Petri con agar nutritivo por equipo
- Cajas de Petri de agar nutritivo con colonias aisladas de muestras de suelo (1 por equipo)
- Cultivos de enriquecimiento saturados en caldo nutritivo (con la mayor cantidad posible de células en fase estacionaria) y diluidos (con una baja concentración de células, y se refleja en una densidad óptica a 600 nm de ~ 0.1) obtenidos a partir de muestras de suelo (1 muestra de cada cultivo por equipo)

b) Proporcionados por los alumnos

Los materiales descritos a continuación son por equipo.

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio
- 1 rollo de toallas absorbentes

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos).

- 2 lámparas de alcohol
- 1 varilla de vidrio acodada (en "L")
- 1 bote con 60–70 perlas de vidrio estériles
- 1 micropipetas automáticas para volúmenes de 20 a 200 μL
- 1 caja de puntas estériles para la micropipeta
- 2 vasos de precipitados de 250 mL (uno para alcohol y otro para depositar las perlas usadas)
- 3 pisetas (agua destilada, etanol y cloro)

MÉTODOS

1.- Siembra en placa por extensión

Procedimiento de siembra por extensión con una varilla de vidrio:

El procedimiento siguiente debe ser realizado en condiciones de asepsia como se muestra en la Figura 3.2.

1. Tomar 100 μ l de cultivo diluido con ayuda de una micropipeta.
2. Colocar esta muestra en el centro de una placa de agar nutritivo.
3. Introducir una varilla acodada de vidrio en un vaso con etanol.
4. Flamear brevemente la varilla empapada en etanol y dejarla enfriar.
5. Extender la muestra uniformemente por la superficie del agar usando la varilla estéril e incubar la placa en una estufa con temperatura controlada a 37°C.
6. Repetir dos veces más para tener un triplicado. Repetir el mismo procedimiento con el cultivo saturado.
7. Incluir una caja Petri control con agar nutritivo y sin colocar cultivo, haciendo el gesto de extender con la varilla estéril
8. Colocar todas las cajas sembradas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).
9. En la siguiente sesión, examinar las cajas y registrar los resultados para cada tipo de medio de cultivo (**Cuadro 3.1**).
10. Regresar las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.



Figura 3.2. Técnica de siembra por extensión con varilla de vidrio.

Procedimiento de siembra por extensión con perlas de vidrio:

El procedimiento siguiente debe ser realizado en condiciones de asepsia.

1. Después de haber colocado en las cajas los 100 μ l de cultivo diluido (3 cajas) y saturado (3 cajas), en cada caja agregar de 8 a 10 perlas de vidrio, cerrar las cajas y colocarlas

una sobre otra. Incluir una caja Petri control con agar nutritivo, sin cultivo y con perlas de vidrio.

2. Agitar las cajas de forma rotatoria sin proyectar las perlititas sobre la tapa de las cajas hasta que el inóculo se distribuya perfectamente sobre el medio (por lo regular es suficiente con 5 minutos).
3. Eliminar las perlas de vidrio en un vaso de precipitados que contenga alcohol.
4. Colocar todas las cajas sembradas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).
5. En la siguiente sesión, examinar las cajas y registrar los resultados para cada tipo de medio de cultivo (**Cuadro 3.1**).
6. Regresar las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.

2.- Siembra por estrías

Procedimiento:

El procedimiento siguiente debe ser realizado en condiciones de asepsia como se muestra en la **Figura 3.3** y siguiendo los pasos ilustrados en la **Figura 3.4**.

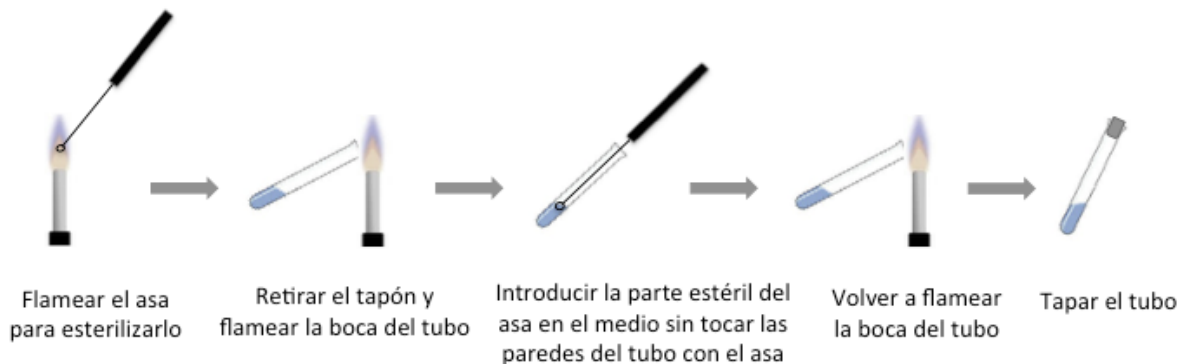


Figura 3.3. Toma de muestra en condiciones de asepsia.

1. Esterilizar el asa de siembra a través de la flama y dejarla enfriar por unos segundos.
2. Tomar una muestra de cultivo líquido diluido con ayuda del asa de siembra.
3. Extenderla a partir de un punto en la periferia de una placa de medio sólido en tres sectores de la placa formando estrías o líneas sobre la superficie, siguiendo un patrón definido.
4. Esterilizar el asa de siembra y enfriarla en el agar entre cada sector.
5. Repetir dos veces más para tener un triplicado.

6. Repetir el mismo procedimiento con el cultivo líquido saturado y con colonias aisladas de una caja de Petri.
7. Incluir una caja Petri control con agar nutritivo, estriando con el asa sin haber tomado cultivo. Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento).
8. En la siguiente sesión, examinar las cajas y registrar los resultados para cada tipo de medio de cultivo (Cuadro 3.1).
9. Regresar las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.

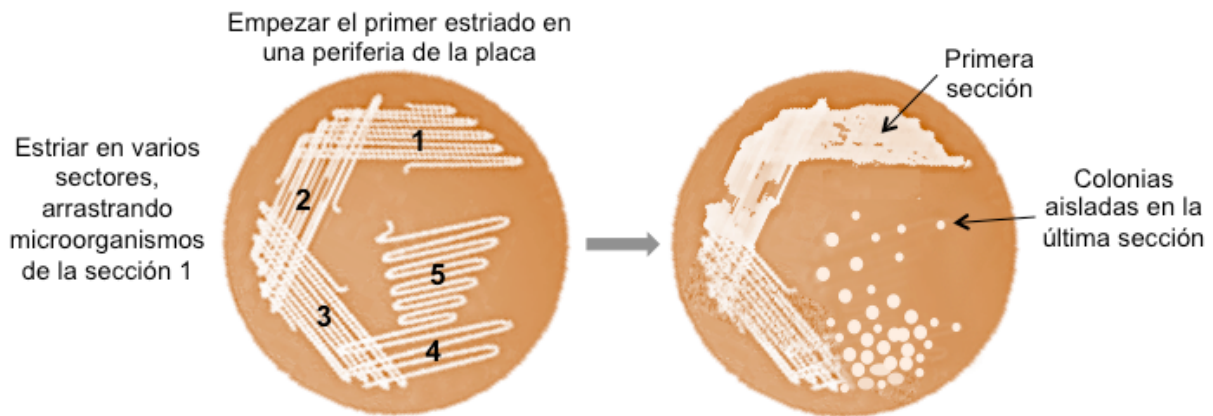


Figura 3.4. Técnica de siembra por estrías.

RESULTADOS

Describir de forma cualitativa y, en su caso, cuantitativa, el crecimiento observado tanto en las cajas sembradas por extensión y estriado como en los controles en el **Cuadro 3.1**.

Realizar la descripción morfológica de las colonias aisladas siguiendo la guía proporcionada en la **Figura 2.5** de la práctica 2.

Técnica de siembra	Cultivo	Observaciones
Extensión con varilla	Diluido 1	
	Diluido 2	
	Diluido 3	
	Saturado 1	

	Saturado 2	
	Saturado 3	
Extensión con perlas	Diluido 1	
	Diluido 2	
	Diluido 3	
	Saturado 1	
	Saturado 2	
	Saturado 3	
Estriado	Diluido 1	
	Diluido 2	
	Diluido 3	
	Saturado 1	
	Saturado 2	
	Saturado 3	

Cuadro 3.1. Descripción morfológica de microorganismos en cajas de Petri con diferentes tratamientos.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. Comparar el crecimiento obtenido con las diferentes técnicas de sembrado empleadas.
2. Comparar el crecimiento obtenido con cultivos líquidos diluidos, saturados y colonias aisladas.
3. ¿Qué tipo de microorganismos se esperan obtener con el agar nutritivo y por que?

4. ¿Qué técnica de siembra es mejor para contar microorganismos?
5. ¿Por qué es necesario tocar una parte estéril del agar con el asa antes de tocar el crecimiento bacteriano?
6. ¿Por qué el asa debe ser flameada antes y después de todos los procedimientos de siembra?
7. ¿Cómo es que el método de estría cruzada en la superficie de un medio sólido permite la dilución de un cultivo?

CUESTIONARIO

1. Define las características y utilidad de los siguientes tipos de medios de cultivo: definidos, complejos, generales, enriquecidos, selectivos, diferenciales. Proporciona dos ejemplos de cada tipo.
2. Explica la función de la adición de componentes como las peptonas, el extracto de levadura o de ternera en los medios de cultivo.
3. Describe la función de los siguientes instrumentos de laboratorio: asa bacteriológica, micropipeta, mechero Bunsen.
4. ¿Qué sustancias se podrían agregar al agar nutritivo para hacerlo selectivo para: (1) bacterias Gram negativas; (2) evitar o limitar el crecimiento de hongos?
5. ¿Qué utilidad tiene cada uno de los siguientes tipos de medios de cultivo: ¿líquido, semisólido y sólido?
6. ¿A qué se refiere una siembra primaria y una siembra secundaria?
7. ¿En qué consiste la técnica de siembra por picadura? ¿Para qué se utiliza?
8. ¿En qué consiste la técnica de siembra por réplica en placa? ¿Para qué se utiliza?

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Para obtener los cultivos de enriquecimiento a partir de muestras de suelo, esterilizar 6 matraces de 125 mL con 25 mL de caldo nutritivo en cada uno. Para ello, pesar la cantidad de polvo de caldo nutritivo comercial indicada por el fabricante, disolver en 150 mL de agua destilada con ayuda de una barra magnética, repartir en los matraces y esterilizar en la autoclave. En condiciones de asepsia, colocar 1 gramo de una muestra de suelo en un matraz, utilizando un segundo matraz abierto en condiciones de asepsia y sin muestra como control. Crecer 48 horas a 35°C y 150 rpm en una incubadora con agitación orbital. Tomar 2.5 mL del cultivo obtenido (arrastrando lo menos posible de partículas de suelo) para inocular otro matraz con medio fresco, utilizando un segundo matraz abierto en condiciones de asepsia como control sin inocular. Crecer 48 horas a 35°C y 150 rpm en una incubadora con agitación orbital para obtener el cultivo el día de la Práctica. Medir la densidad óptica del cultivo obtenido a 600

nm y calcular la cantidad de cultivo a colocar en un matraz con medio fresco para tener una densidad óptica de 0.1 a 600 nm al iniciar la Práctica. Utilizar un segundo matraz abierto en condiciones de asepsia como control. Posteriormente repartir 1 mL de cada cultivo (saturado y diluido) en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles para que todos los equipos tengan una muestra de cada cultivo.

Preparar una caja de agar nutritivo por equipo mas una caja control. Se deben preparar 30 mL de agar por cada caja de 90 x 15 mm. Pesar la cantidad de polvo de agar nutritivo comercial indicada por el fabricante de acuerdo al volumen a preparar y disolver en agua destilada, esterilizar en autoclave y repartir en las cajas. Para obtener las cajas de Petri de agar nutritivo con colonias aisladas de muestras de suelo, colocar 1 gramo de una muestra de suelo en un tubo de cultivo conteniendo 10 mL de solución salina estéril (NaCl 0.9% p/v en agua destilada) y agitar mediante vórtex a velocidad máxima durante 1 min. Inocular las cajas por estriado con una asada de muestra de suelo suspendida en solución salina e incubar 48 horas a 35°C en una estufa.

PRÁCTICA 4 – TINCIÓN DIFERENCIAL DE GRAM

INTRODUCCIÓN

La tinción de células es una importante herramienta usada en el área de la biología. Una de las tinciones más conocidas en microbiología es la desarrollada en 1884 por Hans Christian Gram, bacteriólogo danés, quien buscaba diferenciar entre dos bacterias que causaban neumonía. Este método ha permitido hacer una clasificación de las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, dependiendo de la capacidad que tengan para retener el colorante cristal violeta usado en la tinción (Fig. 4.1). El método es ampliamente utilizado en los laboratorios de microbiología, por ejemplo, en el diagnóstico clínico permitiendo elegir al médico el antibiótico a usar. En procesos de fermentación se usa como método rápido en control de calidad para verificar que los cultivos semilla no estén contaminados, antes de inocular los fermentadores de mayor escala.

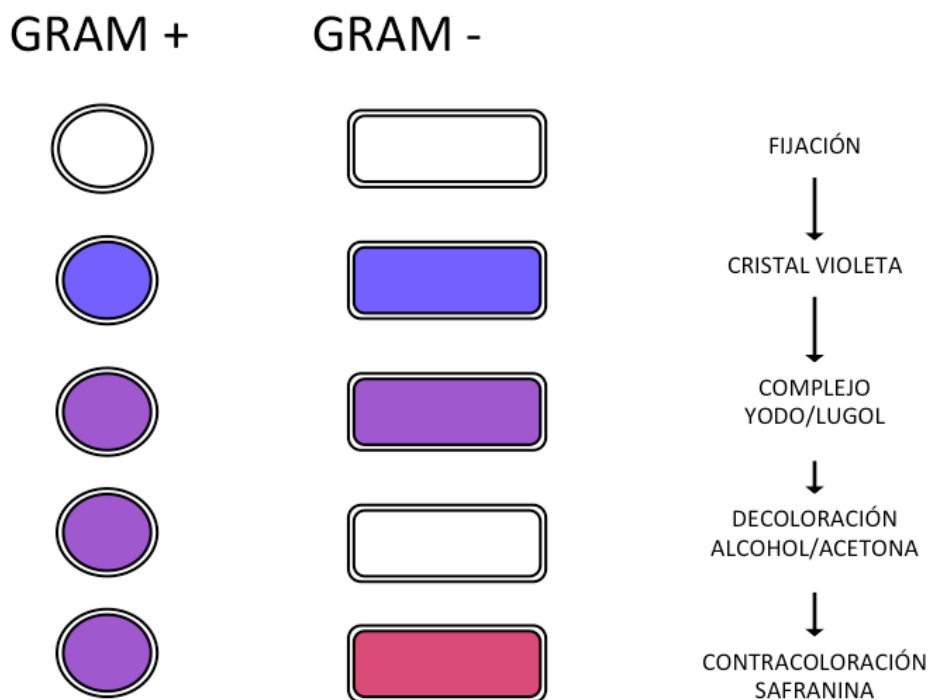


Figura 4.1. Tinción de Gram.

Durante la tinción, las bacterias Gram positivas se tiñen de morado, mientras que las bacterias Gram negativas toman una coloración rosa o roja (Fig. 4.1). Esto es debido principalmente a las diferencias estructurales que presentan en su pared (Fig. 4.2). Las bacterias Gram negativas pierden el colorante cristal violeta con mayor facilidad que las Gram positivas. Las células que

han perdido el cristal violeta se tiñen de color rosa con la safranina que actúa como colorante de contraste. Existen algunos cultivos que darán un resultado negativo en la tinción Gram cuando el cultivo va envejeciendo, esto es particularmente común en cultivos de *Bacillus* y *Clostridium* que a veces son descritos como Gram variables.

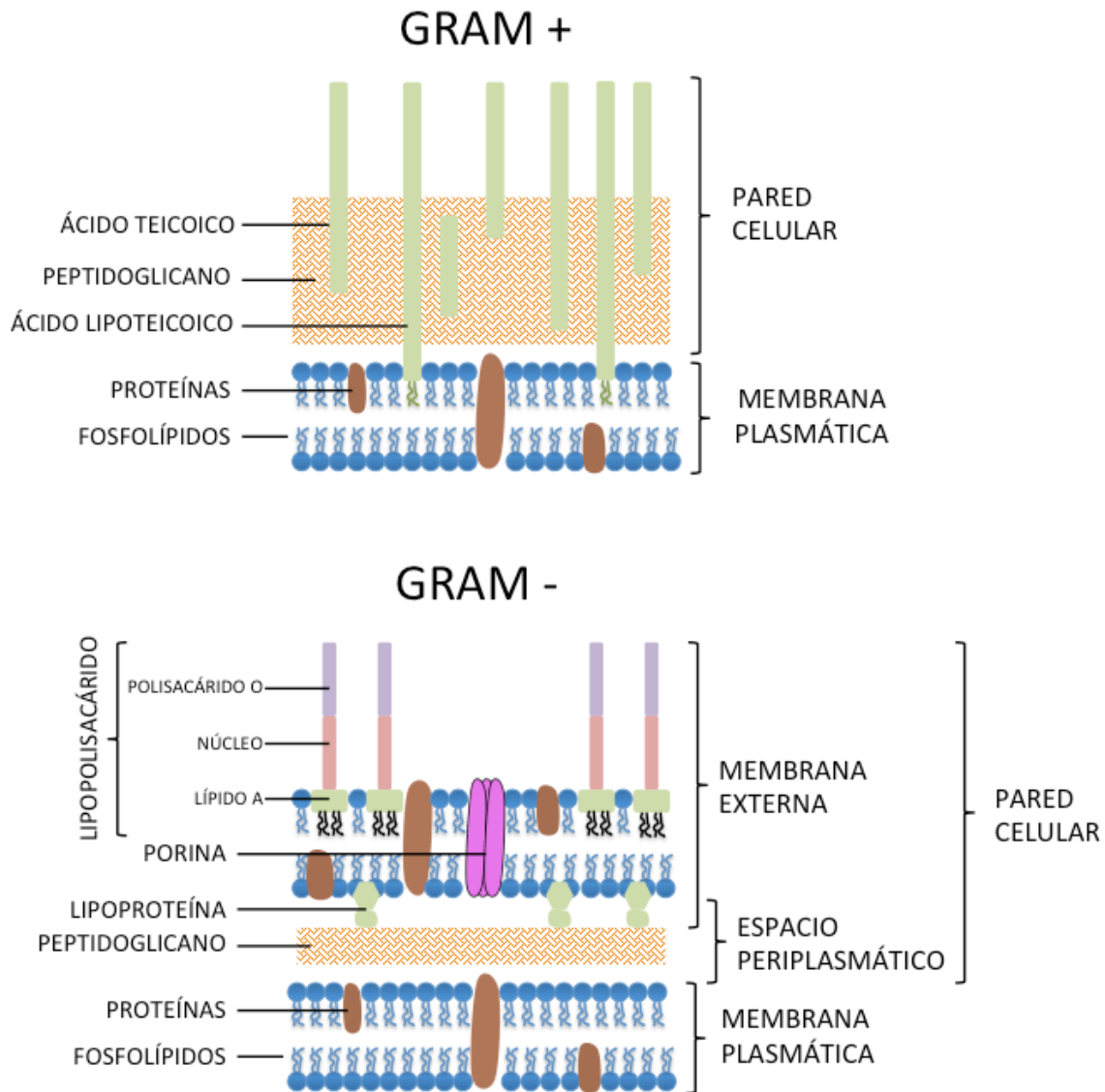


Figura 4.2. Pared de las bacterias Gram negativas y Gram positivas.

La primera etapa es la preparación de un frotis bacteriano (**Fig. 4.3**). Un frotis es la extensión de una muestra o cultivo sobre un portaobjetos para separar lo más posible los microorganismos, lo cual permitirá obtener una mejor imagen de la morfología y agrupamiento celular. La muestra extendida es posteriormente fijada al portaobjeto por calor para evitar que sea arrastrada por las soluciones de colorantes y lavados sucesivos. Contrariamente a las

observaciones en fresco, las bacterias quedan inactivadas y adheridas al portaobjeto en los frotis.

Los frotis pueden ser posteriormente utilizados para tinciones simples o diferenciales. Como las células bacterianas son muy pequeñas, es necesario usar el lente de mayor aumento con aceite de inmersión.

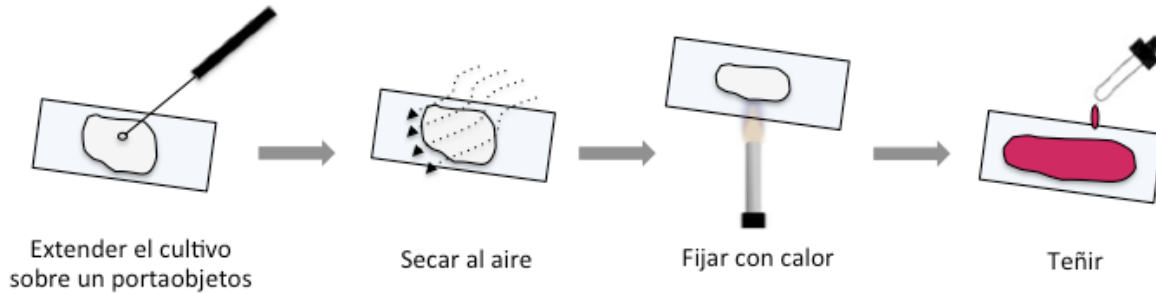


Figura 4.3. Preparación de un frotis.

OBJETIVOS

Que el alumno comprenda los fundamentos de la tinción Gram y la aplique de manera práctica en muestras de cultivos bacterianos.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

Los equipos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), o por grupo (considerando grupos de 25 alumnos) de acuerdo a lo indicado.

- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Microscopio óptico (1 por equipo)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos).

- 1 juego de goteros con 25 mL de cada reactivo para tinción de Gram (cristal violeta, lugol, safranina, alcohol-acetona) por equipo
- Cultivos líquidos y sólidos de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*

b) Proporcionados por los alumnos

Los materiales descritos a continuación son por equipo.

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto fino
- 1 rollo de toallas absorbentes
- Agua inyectable (1 mL)

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 2 lámparas de alcohol
- 1 pissetas con agua destilada, etanol y cloro
- 1 caja con 10 portaobjetos
- 1 caja con 10 cubreobjetos
- 1 frasco de aceite de inmersión
- 1 hoja de Papel seda
- 1 vaso de precipitados de 100 mL
- 10 pipetas Pasteur estériles
- 2 bulbos para pipetas Pasteur
- 1 pinza de disección

MÉTODOS

1.- Preparación de frotis

Procedimiento:

1. Colocar una pequeña gota de agua pequeña sobre un portaobjetos limpio y seco.

2. Flamear el asa, enfriar en el agar y tomar una pequeña cantidad de una colonia, colocarla sobre la gota y extenderla sobre la superficie, evitando que quede conglomerada.
3. Para la muestra de cultivo líquido, tomar directamente la gota del cultivo con el asa previamente flameada y enfriada y extender la muestra.
4. Sujetar el portaobjetos con unas pinzas, pasar dos o tres veces durante un segundo el porta objetos con la cara del frotis hacia arriba por la parte baja de la flama del mechero. Dejar enfriar el portaobjetos entre los pases, para evitar que se queme la muestra.

2.- Tinción de Gram

Procedimiento:

1. Cubrir la preparación del frotis con unas gotas de cristal de violeta durante un minuto.
2. Enjuagar suavemente rociando un pequeño chorro de agua sobre la parte superior del portaobjetos, procurando no desprender la preparación, por presión del agua.
3. Después aplique lugol durante un minuto, lave suavemente con agua. El yodo es corrosivo evite el contacto con la piel.
4. Decolorar por 10 segundos con una mezcla de alcohol y acetona (1:1), y enjuagar rápidamente con agua. Si no se retira rápidamente el decolorante desteñirá tanto a Gram positivas como Gram negativas.
5. Posteriormente contrastar con safranina durante 45 segundos, y finalmente enjuagar con agua.
6. Observar al microscopio con el objetivo 100x, agregando aceite de inmersión para lograr una buena resolución. Recuerde que primero tendrán que utilizar alguno de los objetivos de menor aumento.

RESULTADOS

Dibujar y anotar los resultados para cada uno de los cultivos, tomar fotografías de las observaciones realizadas si es posible.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las

siguientes preguntas:

1. De acuerdo a la literatura, ¿cuál es el Gram de los cultivos estudiados en esta práctica? ¿Corresponde a lo observado aquí?
2. ¿Se puede identificar una bacteria solo con la descripción de su morfología colonial, celular y Gram? Explica tu respuesta.

CUESTIONARIO

1. Describe la función de la pared celular en las bacterias.
2. Define los siguientes conceptos: tinción simple, tinción diferencial, negativa, selectiva, colorantes básicos, colorantes ácidos y da dos ejemplos de cada uno de ellos.
3. ¿Cuál es la composición de las soluciones utilizadas para la tinción de Gram?
4. Describe brevemente el mecanismo de acción de la tinción de Gram.
5. ¿Cómo se pueden teñir las endosporas, capsulas y flagelos bacterianos? ¿Qué tipo de tinciones son?
6. ¿Cuál es el grosor aproximado de la capa de peptidoglicano en bacterias Gram negativas y Gram positivas?
7. Ubica el peptidoglicano, membrana plasmática, externa, periplasma, interior y exterior de la célula en los siguientes esquemas de pared celular. ¿Cuál es la Gram negativa y cuál es la Gram positiva en la Figura 4?
8. ¿En qué se diferencian estructuralmente las paredes celulares de *Archaea* de las de *Bacteria*?

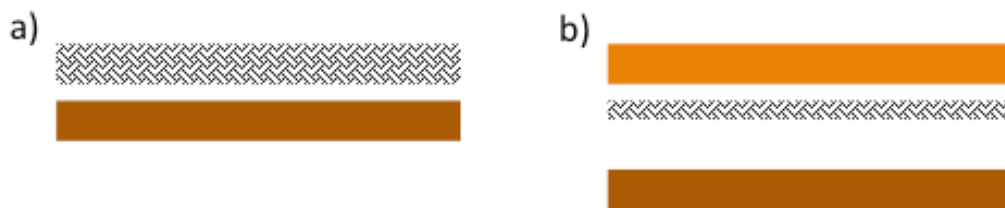


Figura 4.4. Esquemas de pared celular de bacterias.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Cristal Violeta

- Solución A: Cristal Violeta, 2 g; etanol 95% (v/v), 20 mL
- Solución B: Oxalato de amonio, 0.8 g; agua destilada, 80 mL
- Mezclar A y B para obtener el reactivo de tinción Cristal Violeta. La solución se deja reposar durante 24 h y se filtra con papel

Lugol

- Yodo, 1.0 g; yoduro de potasio, 2.0 g; agua destilada, 300 mL
- Pulverizar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero y agregar agua lentamente hasta que el yodo se disuelva. Guardar en botellas ámbar, para protegerlo de la luz.

Safranina

- Solución madre: Safranina 2.5 g; etanol 95% (v/v) 100 mL
- Solución de trabajo: solución madre 10 mL; agua destilada 90 mL

Etanol/Acetona

- Etanol (95%, v/v), 500 mL; acetona, 300 mL

PRÁCTICA 5 – RECUENTO EN PLACA DE BACTERIAS TOTALES Y BACTERIAS FORMADORAS DE ESPORAS

INTRODUCCIÓN

Existen diversos métodos directos e indirectos para cuantificar el número de células microbianas en un cultivo o en una muestra ambiental. Dentro de las medidas directas están el recuento de células totales, tanto las vivas como las muertas, por microscopía con cámara de Neubauer, y el recuento de células viables en placa. Entre los métodos indirectos, uno de los más utilizados para cultivos es la medición de la turbidez en un espectrofotómetro.

En muchos casos interesa contar sólo las células viables (aquellas capaces de dividirse y dar lugar a una descendencia). La forma más utilizada es la de hacer diluciones seriadas y cuenta en placa con medios de cultivo específicos para la población de interés (Fig. 5.1). Esta técnica supone que la célula viable se multiplicará y producirá una colonia visible. En consecuencia, el número de colonias que se observarán a simple vista será igual al número de bacterias viables o unidades formadoras de colonias (UFC) inoculadas en el agar multiplicado por el inverso de la dilución.

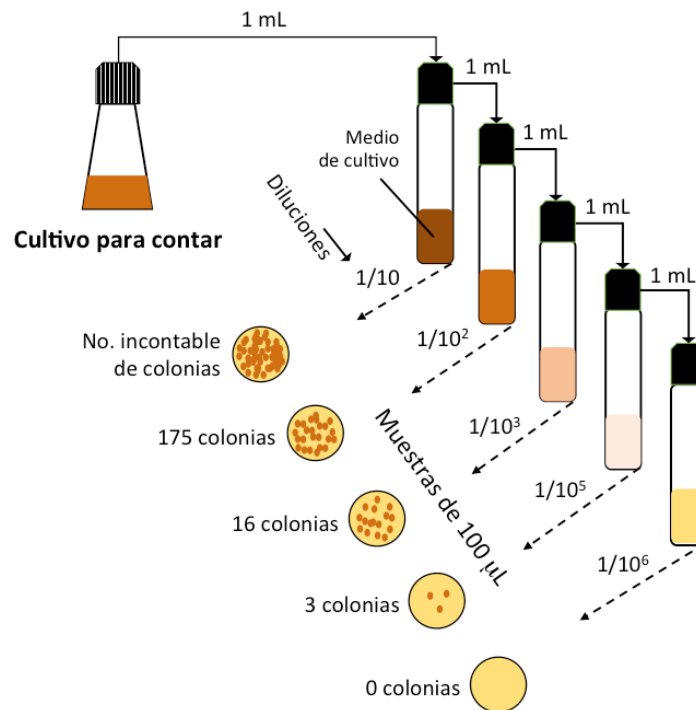


Figura 5.1. Técnica de dilución y cuenta en placa.

El objetivo de las diluciones seriadas es el de disminuir cada vez el número de bacterias presentes en la muestra. Las cajas de Petri finales en la serie deben tener entre 30 y 300 colonias para el conteo. Menos de 30 colonias es demasiado bajo para que el cálculo sea estadísticamente significativo y más de 300 colonias es demasiado grande, pues algunas colonias se podrían fusionar dando estimaciones erróneas. Es importante hacer notar que en las últimas diluciones únicamente el tipo más abundante de bacterias estará presente.

OBJETIVOS

Que el alumno comprenda los fundamentos de la técnica de conteo en placa para cuantificar microorganismos y la aplique de manera práctica con una muestra ambiental.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Balanzas (2 por grupo)
- Baño María a 80°C (1 por grupo)
- Agitador vórtex (1 por equipo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Incubadora con temperatura controlada a 35°C (1 por grupo)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), o por grupo (considerando grupos de 25 alumnos) de acuerdo a lo indicado.

- 1 botella de vidrio con tapa de rosca con 200 mL de solución salina
- 30 tubos de cultivo de vidrio con tapa de rosca con 9 mL de solución salina estéril
- 30 cajas de Petri de 90 x 15 con agar nutritivo

b) Proporcionados por los alumnos

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio

- 1 rollo de cinta masking tape
- 1 rollo de toallas absorbentes
- Al menos 25 g de una muestra de suelo

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 espátula
- 2 mecheros o 2 lámparas de alcohol
- 1 varilla de vidrio en "L" o 1 bote con ≈300 perlas de vidrio estériles
- 1 vaso de precipitados de 250 mL (para alcohol para flamear la varilla de vidrio o para depositar las perlitas usadas)
- 1 gradilla para los tubos de cultivo
- 2 botellas de vidrio de 200 mL estériles
- 2 probetas de 100 mL
- 1 micropipeta automática para volúmenes de 20 a 200 μ L
- 1 caja de puntas estériles para la micropipeta
- 3 pisetas (agua destilada, etanol y cloro)

MÉTODOS

1.- Diluciones y conteo de bacterias totales

Procedimiento:

1. Se debe trabajar en condiciones asépticas. Limpiar la superficie de la mesa con alcohol y flamear la boca de los tubos antes y después de introducir la pipeta. Manipular en todo momento en las proximidades del mechero o en la campana de flujo laminar.
2. Colocar 7 tubos con solución salina en la gradilla y rotularlos. Un tubo al cual no se agregará muestra será marcado como control y 6 tubos serán marcados como 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} para las diluciones.
3. Pesar 10 g de la muestra de suelo y colocarla en 90 mL de solución salina en una botella de 200 mL (dilución 10^{-1}). Agitar vigorosamente durante 3 ó 4 minutos para conseguir una suspensión homogénea.
4. Tomar 1 mL de esta dilución y transferir a un tubo con 9 mL de solución salina (marcar el tubo como dilución 10^{-2}). Agitar en el vórtex durante un minuto.

5. Del tubo marcado 10^{-2} , tomar 1 mL y transferir a otro tubo con solución salina (marcar como dilución 10^{-3}). Agitar un minuto en el vórtex. Repetir el procedimiento hasta llegar a la dilución 10^{-7} .
6. Del tubo control y de cada dilución (partiendo de 10^{-2}) tomar 100 μ L con la micropipeta y pasarlos a una de las cajas de Petri con medio agar nutritivo con el nombre de la dilución.
7. Sumergir la varilla de vidrio en alcohol y flamearla con el mechero. Extender el inóculo de manera uniforme en la caja con ayuda de la varilla. Volver a flamear la varilla. También se pueden emplear perlititas de vidrio estériles para extender las diluciones, usando 8-10 perlititas por caja.
8. Repetir los pasos 5) y 6) para todas las diluciones hechas para cada muestra.
9. Hacer un duplicado, repitiendo los pasos de 4 a 8.
10. Colocar las cajas en la incubadora en posición invertida a 35°C durante 24 a 48 horas (comprobar el crecimiento a las 24 y 48 horas). Poner una caja de Petri adicional como control de las cajas Petri proporcionadas.
11. En la siguiente sesión, examinar las cajas y hacer el conteo total de las colonias presentes en aquellas diluciones que presenten entre 30 y 300 colonias.
12. Regresar las cajas a la profesora para que se desechen adecuadamente.

2.- Conteo de bacterias formadoras de esporas

Procedimiento:

1. Repetir los pasos 1, 2, 3 y 4 del procedimiento anterior.
2. Después de la agitación con vórtex, colocar la solución salina estéril con la muestra de suelo (tubo marcado 10^{-2}) en un vaso de precipitado con agua y poner a calentar en la parrilla a 80°C durante 15 minutos (choque térmico). Hay que cuidar que la temperatura no se suba a más de 80°C .
3. Continuar con el procedimiento anterior a partir del paso 5.

RESULTADOS

Describir los diferentes tipos de colonias obtenidas en las placas de las diluciones sin y con choque térmico. Hacer una lista ordenándolas de la más abundante a la menos abundante.

Con base en el conteo, calcular el número de bacterias totales presentes por gramo de muestra

y completar el **Cuadro 5.1**. Explicar detalladamente como se hace el cálculo. Hacer lo mismo para las bacterias formadoras de esporas. En ambos casos, el número de colonias debe ser el promedio de las dos réplicas de caja de Petri hechas para cada dilución.

Dilución	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
# Colonias totales						
# Colonias del tipo 1						
# Colonias del tipo 2						
# Colonias del tipo 3						
# Colonias del tipo 4						
...						
UFC totales/g						
UFC del tipo 1/g						
UFC del tipo 2/g						
UFC del tipo 3/g						
UFC del tipo 4/g						
...						

Cuadro 5.1. Conteo de bacterias totales y bacterias formadoras de esporas en muestras de suelo.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Qué tipos tróficos de bacterias se espera obtener en esta práctica? ¿Por qué?
2. Comparar las morfologías macroscópicas de las colonias obtenidas con y sin choque térmico y buscar en la literatura el posible linaje bacteriano al que pertenecen.
3. ¿Cuál es la finalidad del choque térmico? ¿Qué géneros bacterianos se esperan obtener con este procedimiento? ¿Por qué?
4. ¿Se espera aislar bacterias anaerobias o microaerofílicas? ¿Por qué?

5. De acuerdo a los resultados obtenidos, ¿estuvo bien hecha la cuenta en placa? ¿Fueron parecidos los resultados obtenidos para cada dilución? Discute el por qué de tus resultados.
6. ¿Cómo utilizarías y completarías los procedimientos descritos aquí para obtener cultivos puros de bacterias formadoras de esporas de diversas muestras?
7. ¿Cómo aplicarías y modificarías estos procedimientos para aislar bacterias lácticas de alimentos fermentados y enterobacterias de agua?
8. ¿Cuál microorganismo conocido propondrías emplear como control experimental de esta práctica? Discute sus alcances y limitaciones.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué aplicaciones prácticas tienen los métodos de cuantificación de microorganismos?
2. ¿Para qué sirve un conteo de bacterias viables?
3. Compara el método de dilución en placa con el método de la cámara de Neubauer para la cuantificación de microorganismos. ¿En qué casos conviene usar cada uno?
4. Explica las ventajas y desventajas del método turbidimétrico de cuantificación de células.
5. ¿Cómo se realiza la cuantificación de levaduras, hongos y bacterias filamentosas?

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Agar Nutritivo

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y calentar hasta disolver en un vaso de precipitados.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Es recomendable vaciar en placa, aproximadamente 30 mL por cada placa de 90 x 15, después de esterilizar cuando aún está líquido el medio y entre 50–60°C.

Solución Salina

- Es una solución estéril de cloruro de sodio (NaCl) al 0.9% (p/v).
- Pesar la cantidad de NaCl requerida para preparar el volumen deseado (275 mL por equipo), agregar agua destilada y disolver en un vaso de precipitados.

- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Una vez enfriada la solución, distribuir en tubos de cultivo estériles (9 mL por tubo) con ayuda de una pipeta serológica y un dispensador manual o electrónico bajo condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar.

PRÁCTICA 6 – CURVA DE CRECIMIENTO MICROBIANO

INTRODUCCIÓN

El concepto de crecimiento microbiano se refiere al incremento en el número de microorganismos en el tiempo y no al aumento de su tamaño. El tipo de reproducción más común en las bacterias es la fisión binaria. El tiempo requerido para que una célula se divida y la población se duplique se conoce como tiempo de generación o tiempo de duplicación. El tiempo de generación puede variar dependiendo de las condiciones físicas y químicas en que suceda el crecimiento.

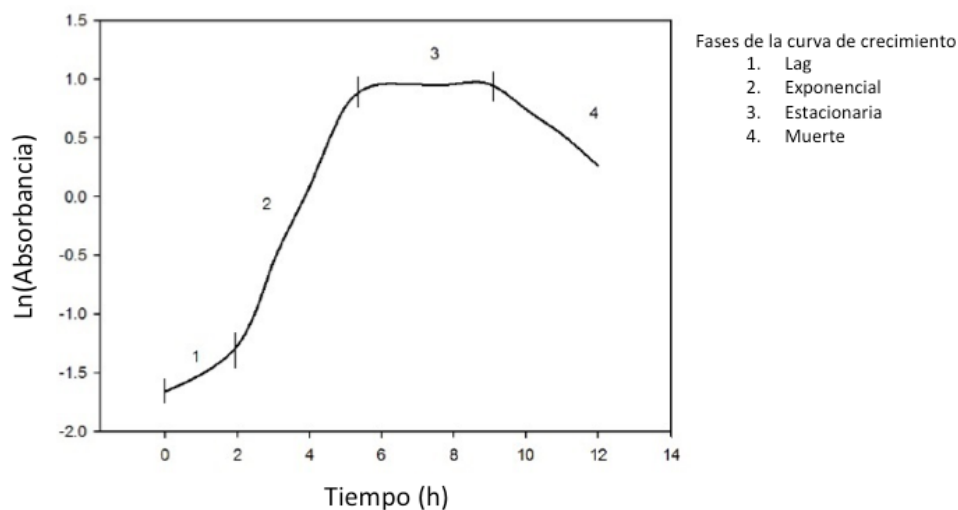


Figura 6.1. Fases de la curva de crecimiento bacteriano.

La representación gráfica del número de células microbianas respecto al tiempo permite identificar distintas fases de crecimiento (**Fig. 6.1**). En la fase exponencial, la velocidad de crecimiento del cultivo es proporcional a la concentración de células o de biomasa.

Existen diferentes métodos para medir el crecimiento microbiano, ya sea contando el número de microorganismos viables o totales o bien determinando por ejemplo la actividad metabólica, la biomasa o las proteínas a lo largo del tiempo. La turbidimetría permite cuantificar los microorganismos totales en una muestra, ya que mide la reducción de la transmisión de luz debido a las partículas en suspensión, cuantificando la luz residual transmitida. Las células en suspensión dispersan la luz causando la turbidez del cultivo, la cual es determinada por espectrofotometría (**Fig. 6.2**). Así, cuando el número de microorganismos aumenta, la turbidez del cultivo se incrementa con el número total de células presentes. La cantidad de luz transmitida se expresa como transmitancia y corresponde al porcentaje de luz incidente que

deja pasar una solución respecto a un blanco o control, mientras que la absorbancia se define como la proporción de luz incidente absorbida por la suspensión. El término densidad óptica se refiere a la absorbancia por unidad de longitud. La turbidimetría es el método más sencillo y utilizado para evaluar el crecimiento microbiano. Tanto la absorbancia como la cuenta viable pueden ser utilizadas para graficar el crecimiento microbiano.

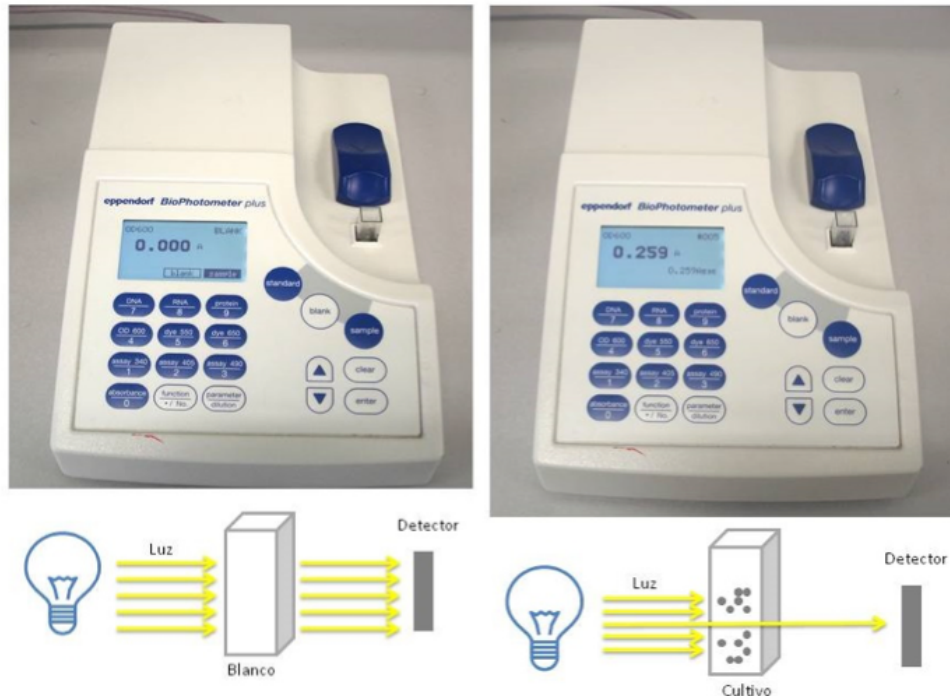


Figura 6.2. Turbidimetría. Al incidir en el cultivo, parte de la luz es desviada, otra absorbida y el resto transmitida. La luz no absorbida o dispersada alcanza el detector y cuantificada.

OBJETIVO

Que el alumno logre hacer un monitoreo del crecimiento microbiano por turbidimetría, identificando las fases del crecimiento, y que calcule el tiempo de generación y la velocidad específica de crecimiento de la población estudiada.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Incubadora con agitación orbital y temperatura controlada a 37°C (1 por grupo).
- Campana de flujo laminar (1 por grupo).

- Balanzas (2 por grupo).
- Espectrofotómetro de luz visible (1 por grupo).
- Agitador vórtex (1 por equipo).

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), o por grupo (considerando grupos de 25 alumnos) de acuerdo a lo indicado.

- 3 matraces Erlenmeyer de 125 mL estériles con tapones de algodón y gasa
- 10 mL de cultivo líquido de *Escherichia coli* en fase estacionaria
- 1 frasco de 250 mL con 100 mL de caldo nutritivo

b) Proporcionados por los alumnos

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio
- 1 rollo de cinta masking tape
- 1 rollo de toallas absorbentes

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 probeta de 25 mL estéril con tapón de gasa y algodón
- 1 mechero o lámpara de alcohol
- 1 espátula
- 3 celdas de 1 mL para espectrofotómetro
- 1 gradilla para las celdas
- 1 micropipeta automática para volúmenes de 200 a 1,000 μL
- 1 caja de puntas estériles para la micropipeta
- 1 pipeta serológica de vidrio de 5 mL estéril
- 1 dispensador manual para pipeta serológica
- 3 pisetos (agua destilada, etanol y cloro)

MÉTODOS

Procedimiento:

1. Bajo condiciones de asepsia, verter 25 mL de caldo en cada matraz Erlenmeyer de 125 mL.
2. Homogeneizar los inóculos con vórtex y bajo condiciones de asepsia inocular dos de los matraces con 2.5 mL de cultivo cada uno para tener un duplicado (serie 1 y serie 2). Como blanco para calibrar el espectrofotómetro (Cuadro 6.1) se utilizará 1 mL del mismo medio sin inocular.
3. Incubar los matraces a 37°C con agitación orbital de 150–250 rpm.
4. Cada 30 minutos sacar de la incubadora los matraces, agitarlos y tomar 1 mL para medir la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) en el espectrofotómetro previamente calibrado con el medio sin inocular. Si la DO_{600} rebasa el valor de 1, efectuar una dilución de la muestra 1/10 con el medio de cultivo y medir nuevamente la DO_{600} .

RESULTADOS

Reportar en el **Cuadro 6.1** los datos de DO_{600} obtenidos respecto al tiempo, considerando cuando sea necesario el factor de dilución. A partir de estos datos, graficar la curva de crecimiento en escala aritmética y logarítmica. Reportar las gráficas con su respectivo pie de figura.

Tiempo	DO_{600} medida	Dilución	DO_{600} calculada*
0			
30 min			
1 hora			
1 hora 30 min			
2 horas			
2 horas 30 min			
3 horas			
3 horas 30 min			
4 horas			

Cuadro 6.1. Datos de DO_{600} obtenidos respecto al tiempo (*aplica en caso de dilución).

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. En un cultivo limitado por la cantidad de sustrato, ¿cuál es la representación del crecimiento de acuerdo a la ecuación propuesta por Monod?
2. ¿Cuál es la expresión matemática que relaciona la velocidad específica de crecimiento con el tiempo de duplicación?
3. Explica el significado de la velocidad específica de crecimiento (μ) y de la velocidad máxima de crecimiento (μ_{\max}).
4. En fase exponencial de crecimiento, ¿cuál es la ecuación lineal que permite obtener el valor de μ como pendiente de esa recta?
5. Calcular la μ_{\max} y el tiempo de generación del cultivo. Explicar detalladamente como se hacen los cálculos.
6. ¿La turbidimetría es un método de medición del crecimiento bacteriano directo o indirecto?
7. ¿En qué diferiría la curva de crecimiento si fuese obtenida por cuenta viable? Explica.
8. ¿Qué resultados esperarías al crecer el cultivo a 30°C en vez de 37°C? ¿y a 100 rpm en lugar de 250 rpm?

CUESTIONARIO

1. Explicar brevemente el fundamento de los métodos directos para medir el crecimiento microbiano y ejemplificar.
2. Explicar brevemente el fundamento de los métodos indirectos para medir el crecimiento microbiano y ejemplificar.
3. Explicar las ventajas y desventajas técnicas de la turbidimetría.
4. Indicar en una gráfica las fases de crecimiento microbiano y explicar en qué consiste cada una de ellas.
5. ¿Cuáles son los principales requerimientos físicos para el crecimiento microbiano y cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo a estos requerimientos?
6. Dentro de los requerimientos químicos, ¿cuál es la importancia de la fuente de carbono y cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo a la naturaleza de su fuente de carbono?

7. Dentro de los requerimientos químicos, ¿cuál es la importancia del nitrógeno y a partir de que nutrientes se puede obtener este elemento? Menciona 4 posibilidades.
8. Dentro de los requerimientos químicos, ¿cómo se clasifican los microorganismos de acuerdo sus requerimientos de oxígeno?

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Caldo Nutritivo

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y disolver en un vaso de precipitados.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

PRÁCTICA 7 – PRUEBAS BIOQUÍMICAS

INTRODUCCIÓN

La taxonomía es la ciencia que se encarga de la clasificación de los seres vivos de acuerdo a su historia evolutiva. La taxonomía microbiana comprende la identificación, la clasificación y la nomenclatura de los microorganismos. Los microorganismos se clasifican de acuerdo a características morfológicas, fisiológicas y genéticas similares para formar grupos o taxones. El sistema de clasificación es un sistema jerárquico en el cual la especie es el grupo más elemental (Fig. 7.1).

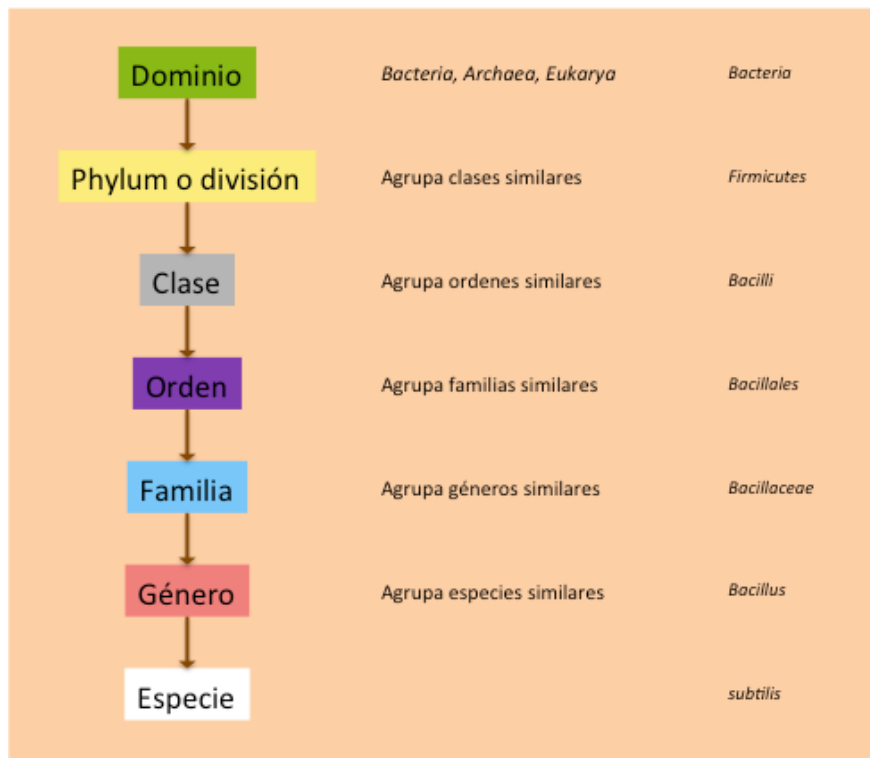


Figura 7.1. Designación de taxones.

Existen diversos sistemas de clasificación e identificación basados en distintos criterios y pruebas. Se entiende por identificación microbiana al conjunto de técnicas y procedimientos que se aplican para establecer la identidad de un microorganismo, es decir, posicionarlo en un taxón y asignarle género y especie.

La diversidad microbiana que existe en nuestro planeta es vasta en términos filogenéticos, metabólicos y funcionales. Las numerosas capacidades metabólicas de los microorganismos, especialmente los procariontes, han permitido que se adapten a diversas condiciones

ambientales y nutrimentales. Por tal motivo, las propiedades bioquímicas de cada microorganismo contribuyen a la identificación y caracterización de géneros y especies, junto con otros métodos como la morfología, tinciones diferenciales, serología, perfiles de ácidos grasos, composición de bases del ADN, etc. Una gran cantidad de reacciones enzimáticas (anabólicas y catabólicas) permiten clasificar desde el punto de vista bioquímico a los microorganismos. Estas pruebas bioquímicas son relevantes desde el punto de vista clínico, ecológico y microbiológico, ya que coadyuvan en la identificación de familias, géneros e incluso especies de microorganismos.

Las pruebas bioquímicas son reacciones que determinan la actividad de una enzima o de una vía metabólica de un microorganismo a partir de un sustrato que es incorporado al medio de cultivo y que es transformado o no. Estas pruebas comprenden estudios de enzimas del metabolismo energético celular (fermentación, respiración) y de requerimientos nutricionales (fuentes de carbono o nitrógeno). También se pueden incluir pruebas de descarboxilación y desaminación de aminoácidos, reacciones hidrolíticas que requieren de enzimas intra o extracelulares, pruebas de resistencia a antibióticos, entre otras. Estas reacciones permiten diferenciar y en algunas ocasiones identificar género o especie de microorganismos en base a sus características bioquímicas específicas (Fig. 7.2).

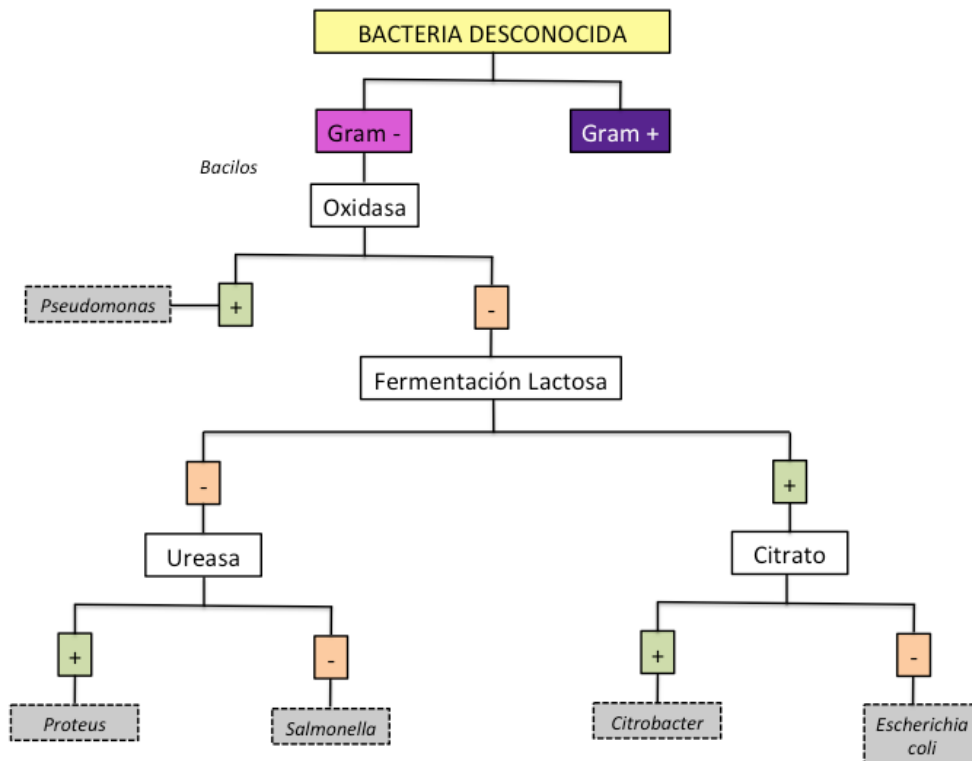


Figura 7.2. Pruebas que permiten diferenciar algunos bacilos Gram negativos.

OBJETIVOS

Que el alumno realice algunas pruebas bioquímicas clásicas que permitan demostrar la actividad metabólica de algunas bacterias y levaduras y que comprenda la importancia de las pruebas bioquímicas en la clasificación e identificación de los microorganismos.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Balanzas (2 por grupo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Incubadoras a 30 y 37°C

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos).

- 3 cajas Petri (90 x 15 mm) de agar dextrosa almidón (1 por microorganismo a probar)
- 1 frasco gotero con 100 mL de solución de lugol
- 3 botellas con 15 mL de medio mineral M9 líquido adicionado con 2 g/L de fuentes de carbono diversas (glucosa, lactosa, sacarosa)
- 1 botella con 25 mL de caldo de rojo de fenol adicionado de 5 g/L glucosa
- 4 cajas Petri (90 x 15 mm) de agar nutritivo (1 por microorganismo a probar y un control)
- Agua oxigenada comercial (3% p/v)
- 1 botella con 25 mL de caldo nutritivo adicionado de nitrato de potasio (1 g/L)
- 1 kit comercial de reactivos de Griess.
- Placas de agar nutritivo con colonias aisladas de *Escherichia coli*, *Acinetobacter baylyi* ADP1 y *Bacillus subtilis* obtenidas por estriado y crecidas toda la noche (16 horas) (1 de cada microorganismo por equipo)

b) Proporcionados por los alumnos

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 mechero o 1 lámpara de alcohol
- 25 tubos de cultivo estériles de 13 × 100 mm con tapa de rosca
- 8 pipetas serológicas estériles de 5 mL
- 1 micropipetas automáticas de 200 µL
- 1 caja de puntas estériles para micropipeta de 200 µL
- 1 asa de siembra
- 1 dispensador para pipetas serológicas

MÉTODOS

1.- Hidrólisis de almidón

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Dividir las cajas de agar almidón en 2 sectores iguales marcando la base de las cajas con un plumón indeleble.
3. Rotular los sectores con los nombres de los microorganismos a probar, dejando un sector para el control en cada caja.
4. Inocular cada sector con una estría recta del microorganismo a probar.
5. Incubar las cajas invertidas toda la noche a la temperatura indicada para cada caso (*E. coli* a 37°C, *A. baylyi* ADP1 y *B. subtilis* a 30°C) toda la noche.
6. Transcurrido el tiempo de incubación, examinar y documentar el crecimiento en los diferentes sectores.
7. Agregar unas gotas de solución de lugol sobre las estrías de microorganismos.
8. Examinar y documentar las áreas alrededor de las estrías de crecimiento.

2.- Utilización de hidratos de carbono

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Rotular los tubos estériles con los nombres de los microorganismos e hidratos de carbono a probar incluyendo controles. Los controles son los mismos medios pero sin inocular.
3. Colocar 2 mL de medio mineral M9 conteniendo los diferentes azúcares a probar (glucosa, sacarosa y lactosa) en los tubos.
4. Inocular los tubos con 3 a 5 colonias aisladas de las placas de agar nutritivo de los microorganismos a probar.
5. Incubar los tubos a la temperatura, tiempo y agitación indicado para cada caso (*E. coli* a 37°C, *A. baylyi* ADP1 y *B. subtilis* a 30°C, agitación 300 rpm toda la noche).
6. Transcurrido el tiempo de incubación, examinar y documentar el crecimiento en los diferentes tubos.

3.- Prueba de fermentación con rojo de fenol

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Rotular los tubos estériles con los nombres de los microorganismos, incluyendo controles.
3. Colocar 5 mL de caldo rojo de fenol adicionado de glucosa en los tubos.
4. Inocular los tubos con 3 a 5 colonias aisladas de los cultivos en agar nutritivo de los microorganismos a probar.
5. Incubar los tubos a la temperatura y el tiempo para cada caso (*E. coli* a 37°C, *A. baylyi* ADP1 y *B. subtilis* a 30°C, agitación 100 rpm toda la noche).
6. Transcurrido el tiempo de incubación, examinar y documentar el crecimiento y coloración en los diferentes tubos.

4.- Prueba de catalasa

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Utilizar una caja de agar nutritivo por microorganismo a probar y una caja adicional como control.
3. Rotular las cajas con los nombres de los microorganismos a probar, dejando una caja marcada como control.
4. Inocular cada caja por estriado para tener colonias aisladas de cada microorganismo a probar.
5. Incubar las cajas invertidas a la temperatura y el tiempo indicado para cada caso (*E. coli* a 37°C, *A. baylyi* ADP1 y *B. subtilis* a 30°C) toda la noche).
6. Transcurrido el tiempo de incubación, agregar unas gotas de agua oxigenada sobre las colonias o estrías de microorganismos (3 colonias por microorganismo a probar).
7. Examinar y documentar los resultados observados.

5.- Reducción de nitratos

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Rotular los tubos estériles con los nombres de los microorganismos, incluyendo controles.
3. Colocar 3 mL de caldo nutritivo con nitrato en los tubos correspondientes.
4. Inocular los tubos con 3 a 5 colonias aisladas de los cultivos en agar nutritivo de los microorganismos a probar.
5. Incubar los tubos a la temperatura, tiempo y agitación indicado para cada caso (*E. coli* a 37°C, *A. baylyi* ADP1 y *B. subtilis* a 30°C, agitación 300 rpm toda la noche).
6. Transcurrido el tiempo de incubación, examinar y documentar el crecimiento en los diferentes tubos.
7. Agregar 3 gotas del reactivo A y 3 gotas del reactivo B del kit de reactivos de Griess a cada tubo.
8. Esperar unos segundos y observar si hay desarrollo de coloración.
9. Interpretar y registrar los resultados.

RESULTADOS

Anotar los resultados obtenidos para cada una de las pruebas en los **Cuadros 7.1, 7.2, 7.3, 7.4 y 7.5**. Modificar los cuadros de acuerdo al número de organismos y controles.

Almidón		
Organismo/control	Observación	Prueba +/-

Cuadro 7.1. Resultados de pruebas de hidrólisis de almidón.

Hidratos de carbono		
Organismo/control/azúcar	Observación	Prueba +/-

Cuadro 7.2. Resultados de pruebas de utilización de hidratos de carbono.

Rojo de fenol		
Organismo/control/azúcar	Observación	Prueba +/-

Cuadro 7.3. Resultados de pruebas de rojo de fenol.

Catalasa		
Organismo/control	Observación	Prueba +/-

Cuadro 7.4. Resultados de pruebas de catalasa.

Nitratos		
Organismo/control	Observación	Prueba +/-

Cuadro 7.5. Resultados de pruebas de reducción de nitratos.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. Menciona el dominio, phylum, clase, orden y familia de los microorganismos utilizados en esta práctica.
2. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de hidrólisis de almidón y qué grupo de microorganismos permite detectar?
3. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de utilización de hidratos de carbono?
4. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de rojo de fenol y qué tipo de microorganismos permite detectar?
5. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de catalasa y cuál es el tipo de microorganismos que identifica?
6. ¿Cuál es el fundamento de la prueba de reducción de nitratos y cuál es el tipo de microorganismos que identifica?
7. ¿Concuerdan los resultados obtenidos con lo que se sabe acerca de los microorganismos utilizados en la práctica?

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la diferencia entre una especie y una cepa procariota?
2. Enlista 4 características morfológicas utilizadas en clasificación e identificación de microorganismos.
3. Enlista 8 características fisiológicas y metabólicas utilizadas para la clasificación e identificación en microbiología.
4. ¿En qué difieren los manuales de Bergey's de Bacteriología Determinativa y Bergey's de Bacteriología Sistemática?
5. ¿En qué consiste la prueba de agar-hierro-triple azúcar y para qué se utiliza?
6. Menciona un ejemplo de kit comercial manual multiprueba para la identificación de bacilos Gram negativos.
7. Menciona un ejemplo de sistema comercial automatizado para la identificación de bacterias.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Agar dextrosa almidón

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en la etiqueta y colocarla en un vaso de precipitados, agregar agua destilada, agitar con una barra magnética sobre una parilla de calentamiento y calentar hasta hervir durante 1 minuto para disolver completamente el polvo.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Es recomendable vaciar en placa, aproximadamente 30 mL por cada placa de 90 x 15, después de esterilizar cuando aún está líquido el medio y entre 50–60°C.

Lugol

- Yodo, 1.0 g; yoduro de potasio, 2.0 g; agua destilada, 300 mL
- Pulverizar el yodo y el yoduro de potasio en un mortero y agregar agua lentamente hasta que el yodo se disuelva.
- Distribuir en frascos goteros ámbar para protegerlo de la luz.

Medio mineral M9 adicionado de fuentes de carbono

El medio mineral M9 es un medio salino mínimo que debe ser suplementado con una fuente de carbono para proveer un medio químicamente definido para el crecimiento microbiano.

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Generalmente es comercializado en una forma concentrada 5x o 10x. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en la etiqueta y disolverla en 1 litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Para preparar el medio M9, agregar 200 mL de sales 5x (o 100 mL de sales 10x) en 800 mL o (900 mL) de agua destilada estéril, bajo condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar.
- Agregar 20 mL de una solución de carbohidrato al 10% (p/v) esterilizada por filtración, 2 mL de una solución de MgSO₄ 1M esterilizada en el autoclave y 0.1 mL de una solución de CaCl₂ también esterilizada en autoclave, todo bajo condiciones de asepsia en la campana de flujo laminar.

Caldo de rojo de fenol con glucosa

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y disolver en un vaso de precipitados.

- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Agar Nutritivo

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y calentar hasta disolver en un vaso de precipitados.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Es recomendable vaciar en placa, aproximadamente 30 mL por cada placa de 90 x 15, después de esterilizar cuando aún está líquido el medio y entre 50–60°C.

Caldo nutritivo con nitrato de potasio

- Existen varias marcas comerciales para el caldo nutritivo. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesar la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y disolver en un vaso de precipitados.
- Agregar 1 g/L de nitrato de potasio y disolver.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Kit comercial de reactivos de Griess

- Varias marcas comercializan kits de reactivos de Griess. Seguir las instrucciones de los fabricantes para la preparación de los reactivos A y B y su uso.

PRÁCTICA 8 – AGENTES ANTIMICROBIANOS Y ANTIBIÓTICOS

INTRODUCCION

Un agente antimicrobiano es un químico natural o sintético que mata o inhibe el crecimiento de los microorganismos. Los biocidas son sustancias capaces de matar a los microorganismos. Los agentes bactericidas, viricidas y fungicidas matan a las bacterias, virus y hongos respectivamente, mientras que los bacteriostáticos, viristáticos y fungistáticos solo inhiben su crecimiento. Los microorganismos presentan diferentes grados de resistencia a los agentes antimicrobianos (Fig. 8.1), dependiendo del tipo de agente microbiano, de su concentración y del tiempo de exposición, entre otros.

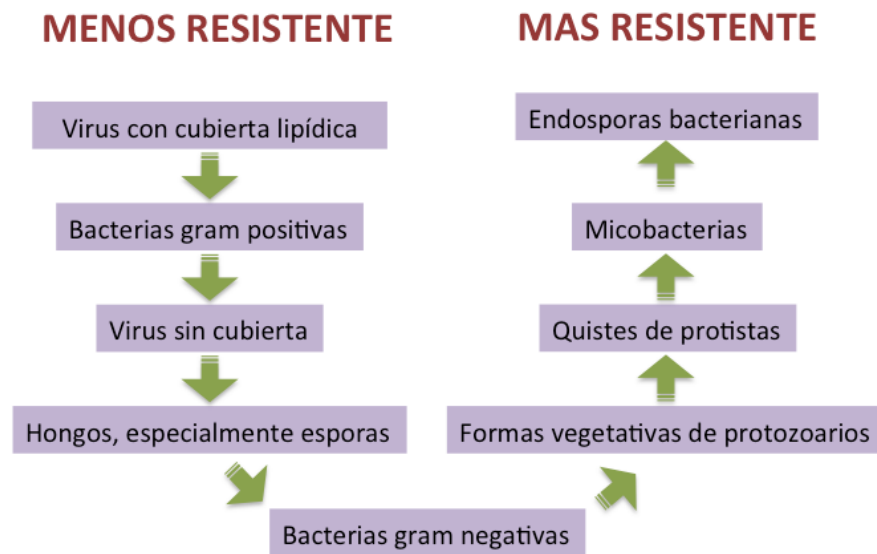


Figura 8.1. Resistencia de los microorganismos al calor.

La actividad antimicrobiana es evaluada determinando la cantidad mínima de agente que se requiere para inhibir el crecimiento de un microorganismo; este valor se conoce como concentración mínima inhibitoria (CMI). Otro parámetro para evaluar un antimicrobiano es la concentración mínima bactericida (CMB), que se refiere a la concentración mínima de antibacteriano que mata el 99.9% de una población microbiana.

Los antibióticos naturales son productos del metabolismo secundario de hongos como *Penicillium* y de bacterias como *Streptomyces*, entre otros y son obtenidos por cultivo a gran escala. En 1929, Alexander Fleming caracterizó el primer antibiótico natural, la penicilina, aislado del hongo *Penicillium chrysogenum* (Fig. 8.2). En la actualidad, también hay antibióticos

semi-sintéticos y sintéticos. Los antibióticos sintéticos se obtienen a través de procesos de síntesis química, mientras que los antibióticos semi-sintéticos se producen a partir de cultivos microbianos y se modifican posteriormente por vía química. Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a su mecanismo de acción, estructura química o espectro de efectividad.

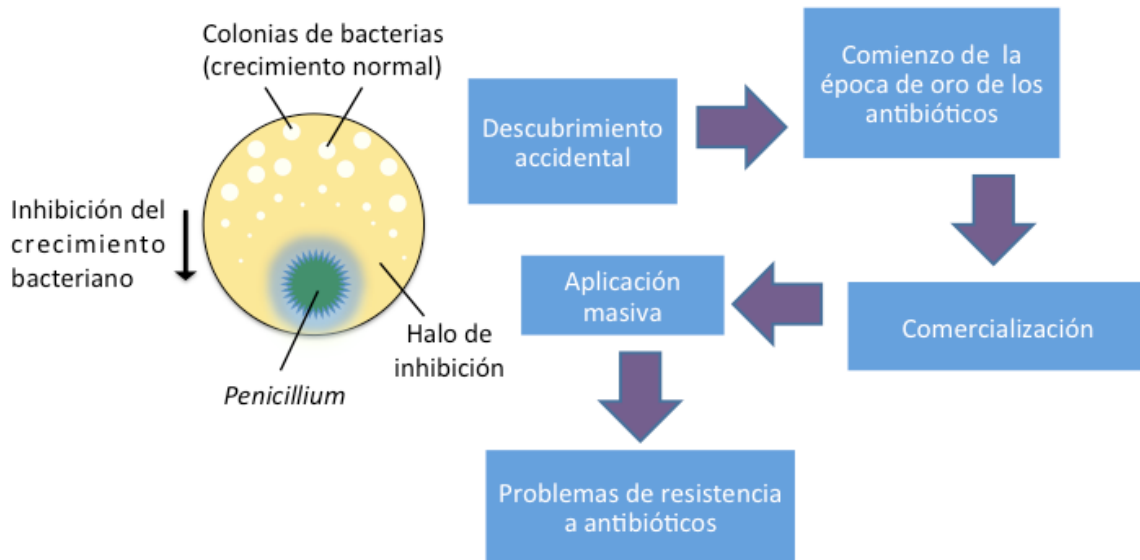


Figura 8.2. Descubrimiento accidental por Fleming de la acción antibacteriana de la penicilina.

OBJETIVO

Que el alumno conozca una técnica para evaluar el efecto de agentes antimicrobianos sobre bacterias, observe la respuesta a diferentes agentes y comprenda los conceptos de CMI y CMB.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Balanzas (2 por grupo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Espectrofotómetro de luz visible (1 por grupo)
- Incubadora orbital con agitación y temperatura controlada a 37°C
- Estufa con temperatura controlada a 37°C

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos).

- 1 cultivo líquido de *Escherichia coli* W3110 en fase estacionaria (10 mL)
- 1 botella con 150 mL de caldo nutritivo estéril
- 1 tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de solución stock de ampicilina (100 mg/mL)
- 1 filtro para jeringa de acetato de celulosa y 0.22 μm de tamaño de poro estéril
- 1 tubo Falcón estéril de 15 mL
- 3 cajas Petri (90 x 15 mm) de agar nutritivo

b) Proporcionados por los alumnos

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio
- 1 frasco de mertiolate incoloro

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 mechero o 1 lámpara de alcohol
- 1 jeringa y desechable de 5 mL estéril
- 1 vasos de precipitado de 10 mL
- 5 tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles
- 1 gradilla con 2 celdas de 1 mL para espectrofotómetro
- 1 gradilla con 25 tubos de cultivo estériles de 13 x 100 mm con tapa de rosca
- 4 pipetas serológicas estériles de 5 mL
- 1 dispensador para pipetas serológicas
- 1 micropipeta automática para volúmenes de 200 a 1,000 μL
- 1 micropipeta automática para volúmenes de 20 a 200 μL
- 1 micropipeta automática para volúmenes de 2 a 20 μL
- 1 micropipeta para volúmenes de 1 a 2 μL
- 1 caja de puntas estériles para cada micropipeta
- 1 asa de siembra

- 1 agitador vórtex
- 4 pipetas serológicas de vidrio de 5 mL estéril (1)
- 1 dispensador para pipetas serológicas
- 3 pisetas (agua destilada, etanol, cloro)

MÉTODOS

1.- Determinación de la CMI

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. En un tubo Falcón de 15 mL, preparar 5 mL de una solución de ampicilina al 10 mg/mL a partir de la solución stock proporcionada por el profesor. Para ello, realizar una dilución del stock en agua destilada. Dar vórtex para homogeneizar.
3. Esterilizar la solución de ampicilina (10 mg/mL) por filtración usando la jeringa y el filtro estéril y repartir el filtrado en 3 tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles.
4. Medir la absorbancia a 600 nm del cultivo de *E. coli* W3110. Hacer una dilución de 1/10 en caldo nutritivo.
5. Disponer los tubos de cultivo en 2 filas de 12 tubos en la gradilla y rotular los tubos como se indica en el **Cuadro 8.1**.

Rótulos para pruebas con ampicilina (Ap)	- Ap	+ Ap	1 Ap	2 Ap	3 Ap	4 Ap	5 Ap	6 Ap	7 Ap	8 Ap	9 Ap	10 Ap
Ampicilina (10 mg/mL)	0 μL	0 μL	1.25 μL	2.5 μL	5 μL	10 μL	25 μL	50 μL	100 μL	250 μL	375 μL	500 μL
Cultivo	No	Si										
Rótulos para pruebas con mertiolate (Mt)	- Mt	+ Mt	1 Mt	2 Mt	3 Mt	4 Mt	5 Mt	6 Mt	7 Mt	8 Mt	9 Mt	10 Mt
Mertiolate comercial (mL)	0 μL	0 μL	1.25 μL	2.5 μL	5 μL	10 μL	25 μL	50 μL	100 μL	250 μL	375 μL	500 μL
Cultivo	No	Si										

Cuadro 8.1. Preparación de tubos para determinación de CMI.

6. Colocar 5 mL de caldo nutritivo en cada tubo.

7. Utilizando micropipetas y puntas estériles, colocar la ampicilina y el mertiolate en los tubos correspondientes a los rótulos anteriores. Homogeneizar con vórtex.
8. Calcular la cantidad de cultivo a inocular para que todos los tubos inicien con una absorbancia a 600 nm de 0.25.
9. Utilizando micropipetas y puntas estériles, inocular los tubos. Homogeneizar con vórtex.
10. Incubar los tubos a 37°C con agitación orbital de 150–250 rpm durante 24 horas, manteniendo los tubos con una inclinación de 45 grados aproximadamente.
11. En la siguiente sesión, examinar los tubos, registrar el crecimiento en cada tubo y continuar con la determinación de la CMB.

2.- Determinación de la CMB

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Dividir las cajas de agar nutritivo en 4 sectores iguales marcando la base de las cajas con un plumón indeleble.
3. De los tubos de la sección anterior, estriar aquellos cultivos que no presentaron crecimiento aparente en las cajas de agar nutritivo como se muestra a continuación (Fig. 8.3). Previamente rotular los sectores a estriar como en los tubos correspondientes.
4. Incubar las cajas a 37°C durante 24 horas.
5. En la siguiente sesión, examinar las cajas y registrar el crecimiento en cada sector.
6. Regresar los tubos y las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.

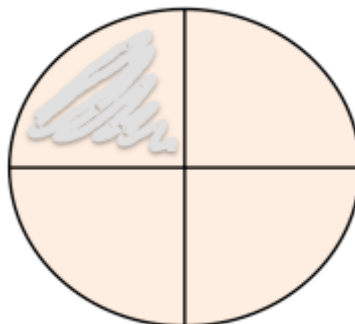


Figura 8.3. Estriado de cajas Petri para la determinación de la CMB.

RESULTADOS

Calcular las concentraciones de la ampicilina y del compuesto activo del mertiolate en cada tubo y anotarlas en el **Cuadro 8.2**.

Reportar el crecimiento observado en los diferentes tubos de forma cualitativa: (-) no hay crecimiento, (+) poco crecimiento, (++) crecimiento regular y (+++) crecimiento abundante en el **Cuadro 8.2**. En base a los resultados obtenidos, indicar la CMI de cada agente antimicrobiano. Reportar en el **Cuadro 8.2** el crecimiento observado en las placas de agar nutritivo. En base a los resultados obtenidos, indicar la CMB de cada agente antimicrobiano.

Pruebas con ampicilina (Ap)	- Ap	+ Ap	1 Ap	2 Ap	3 Ap	4 Ap	5 Ap	6 Ap	7 Ap	8 Ap	9 Ap	10 Ap
Concentración de ampicilina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)												
Crecimiento en tubo												
Crecimiento en placa												
Pruebas con mertiolate (Mt)	- Mt	+ Mt	1 Mt	2 Mt	3 Mt	4 Mt	5 Mt	6 Mt	7 Mt	8 Mt	9 Mt	10 Mt
Concentración de compuesto activo ($\mu\text{g}/\text{mL}$)												
Crecimiento en tubo												
Crecimiento en placa												

Cuadro 8.2. Resultados de determinación de CMI y CMB para una cepa de *E. coli* expuesta a dos agentes antimicrobianos diferentes.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. Explica cuál es la estructura química de la ampicilina? ¿Qué tipo de antibiótico es la ampicilina en base a su mecanismo de acción, estructura química y espectro de acción?
2. Explica cuál es el compuesto activo en el mertiolate? ¿Cuál es su estructura química? ¿Cuál es su mecanismo y espectro de acción?

CUESTIONARIO

1. Define y contrasta desinfección y antisepsia.

2. Explica en que consiste el método de difusión por discos en la evaluación de agentes antimicrobianos.
3. Explica cuál es el modo y espectro de acción de los siguientes agentes antimicrobianos
 - a. Cloro
 - b. Triclosan
 - c. Alcohol etílico
 - d. Nitrato de plata
 - e. Agua oxigenada
 - f. Clorhexidina
4. Completa el **Cuadro 8.3** dando un ejemplo para cada categoría de antimicrobiano.

Categoría de antimicrobiano	Ejemplo
Antibiótico antibacteriano, inhibidor de la síntesis de la pared	<i>Penicilina</i>
Antibiótico antimicobacteriano, inhibidor de la síntesis de pared	
Antibiótico antibacteriano, inhibidor de la síntesis de proteínas	
Antibiótico antibacteriano, que daña a la membrana plasmática	
Antibiótico antibacteriano, inhibidor de la síntesis de ADN o ARN	
Antifúngico que actúa sobre esteroides de membrana	
Antifúngico que interfiere con la división celular eucariótica	
Antiviral que inhibe la síntesis de ADN o ARN	
Antiprotozoario que inhibe la síntesis de ácido nucleico	
Antihelmíntico que daña selectivamente microtúbulos de las células intestinales de los nematodos	

Cuadro 8.3. Ejemplos de agentes antimicrobianos.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Caldo nutritivo

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesarse la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y disolver en un vaso de precipitados.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Agar Nutritivo

- Existen varias marcas comerciales para este medio. Seguir las instrucciones de preparación indicadas en el recipiente.
- Pesarse la cantidad de polvo indicada en etiqueta, agregar agua destilada y calentar hasta disolver en un vaso de precipitados.
- Verter en el recipiente definitivo (frasco o matraz) y esterilizar en autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Es recomendable vaciar en placa, aproximadamente 30 mL por cada placa de 90 x 15, después de esterilizar cuando aún está líquido el medio y entre 50–60°C.

Solución stock de ampicilina

- Pesarse y colocar 1 g de ampicilina en un tubo Falcón de 15 mL.
- Disolver en 10 mL de agua destilada mediante vórtex.
- Esterilizar por filtración y distribuir en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles.
- Conservar en congelación a -20°C.

PRÁCTICA 9 – MICROCULTIVOS Y OBSERVACIÓN MICROSCOPICA DE HONGOS FILAMENTOSOS

INTRODUCCIÓN

Los hongos son microorganismos eucariotas. Producen enzimas extracelulares que digieren la materia orgánica. Sus hábitats son diversos, típicamente terrestres y saprófitos. La mayoría de los hongos filamentosos son aerobios, mientras que las levaduras son anaerobias facultativas. Crecen generalmente a pH debajo de 5, son multicelulares, excepto las levaduras, y tienen esporas sexuales y asexuales.

El cuerpo de los hongos filamentosos tiene dos porciones, una vegetativa (talo o cuerpo) formada por filamentos llamadas hifas las cuales en conjunto forman el micelio, mientras que la parte reproductiva está formada por esporas las cuales pueden estar agrupadas en estructuras llamadas esporangios (**Fig. 9.1**). Las estructuras vegetativas de los hongos son aquellas involucradas en el catabolismo y en el crecimiento. Algunos hongos tienen hifas septadas, mientras otros presentan hifas cenocíticas sin divisiones y presentan varios núcleos (**Fig. 9.1**). La parte de la hifa que está encargada de la reproducción es la hifa aérea, mientras que la parte encargada de la nutrición se conoce como hifa vegetativa.

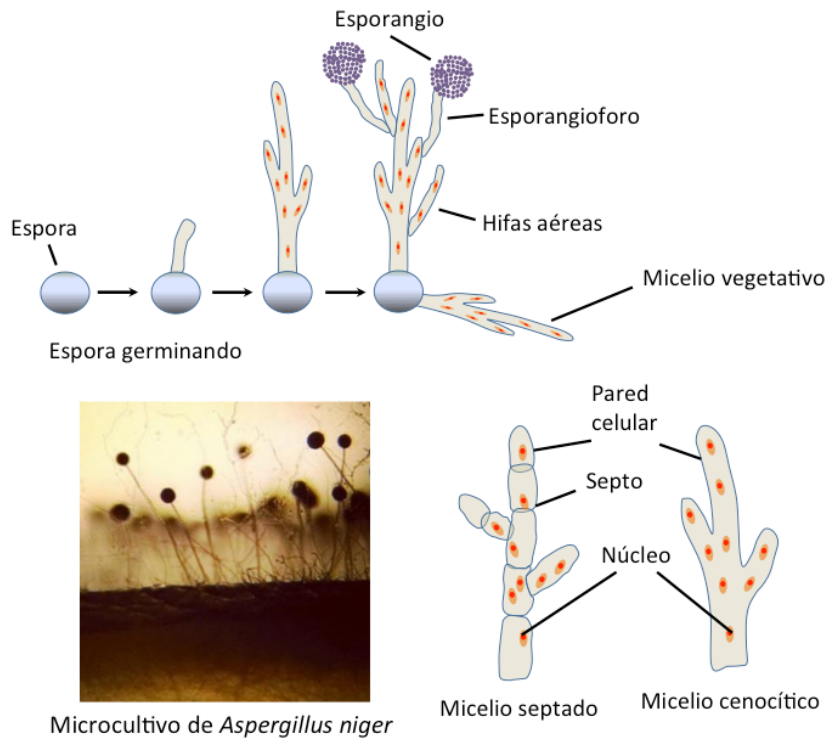


Figura 9.1. Estructuras de hongos filamentosos.

Los hongos filamentosos se encuentran generalmente colonizando la superficie de líquidos y sólidos, forman redes complejas de micelio que se extienden en todas direcciones, pueden secretar enzimas a sus alrededores para degradar polímeros que sirven como nutrientes (p. ej. celulosa, quitina, almidón, proteínas). La capacidad de secretar enzimas ha sido aprovechada para producir industrialmente enzimas, ya que se facilitan los procesos de extracción y purificación, reduciendo tiempo y costos. Los hongos son de gran importancia económica, y se emplean para producir antibióticos, enzimas, alimentos fermentados, ácidos orgánicos, tratamiento de contaminantes, así como para controlar plagas en cultivos vegetales. Algunos hongos producen micotoxinas, las cuales son causantes de intoxicaciones en humanos y ganado.

OBJETIVO

Que el alumno aprenda a preparar microcultivos de hongos filamentosos, observe las principales estructuras vegetativas y reproductivas que desarrollan este tipo de hongos y las identifique.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Equipo

- Balanzas (2 por grupo)
- Parilla de calentamiento con agitación (1 por equipo)
- Autoclave (1 por grupo)
- Campana de flujo laminar (1 por grupo)
- Estufa con temperatura controlada a 28°C (1 por grupo)
- Microscopio (1 por equipo)

2.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por el profesor

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos).

- 1 cultivo sólido de hongo filamentosos
- 1 varilla de vidrio de 10 cm de largo

b) Proporcionados por los alumnos

- 1 encendedor
- 1 bolsa de algodón
- 1 plumón negro indeleble punto medio
- 1 bisturí estéril
- 1 rollo de toallas absorbentes
- 1 paquete de algodón
- 1 paquete de gasas
- 1 rollo de papel aluminio

c) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 1 mechero bunsen
- 2 lámparas de alcohol
- 1 placa de Petri de vidrio de 100x15
- 1 espátula
- 1 barra magnética
- 2 frascos Erlenmeyer de 125 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 probeta de 25 mL
- 1 pinza de disección
- 1 portaobjetos
- 1 cubreobjetos
- 1 pipeta serológica de vidrio de 10 mL
- 1 dispensador para pipetas serológicas
- 1 asa de siembra
- 3 pissetas (agua destilada, etanol, cloro)

Los siguientes materiales y reactivos son por grupo:

- Agar PDA (papa y dextrosa) comercial en polvo
- Glicerol grado reactivo
- 1 rollo de cinta testigo para autoclave
- 1 rollo de Parafilm
- Guantes de asbesto

MÉTODOS

1.- Preparación de material

Procedimiento:

1. Preparar 50 mL de agar papa dextrosa en un matraz Erlenmeyer, colocar tapón de gasa con algodón y cubrir con papel aluminio. Seguir el procedimiento descrito en la Práctica 2.
2. Calentar la parte central de la varilla con el mechero Bunsen y doblar en forma de V.
3. Colocar la varilla en V dentro de la placa Petri, colocar el portaobjetos sobre la varilla vidrio (Fig. 9.2) y empaquetar con papel aluminio la caja.
4. Preparar 50 mL de una solución de glicerol al 5% en un matraz Erlenmeyer, colocar tapón de gasa con algodón y cubrir con papel aluminio.
5. Envolver las pinzas en papel aluminio.
6. Esterilizar los materiales en autoclave a 121°C, 15 psi durante 15 min.

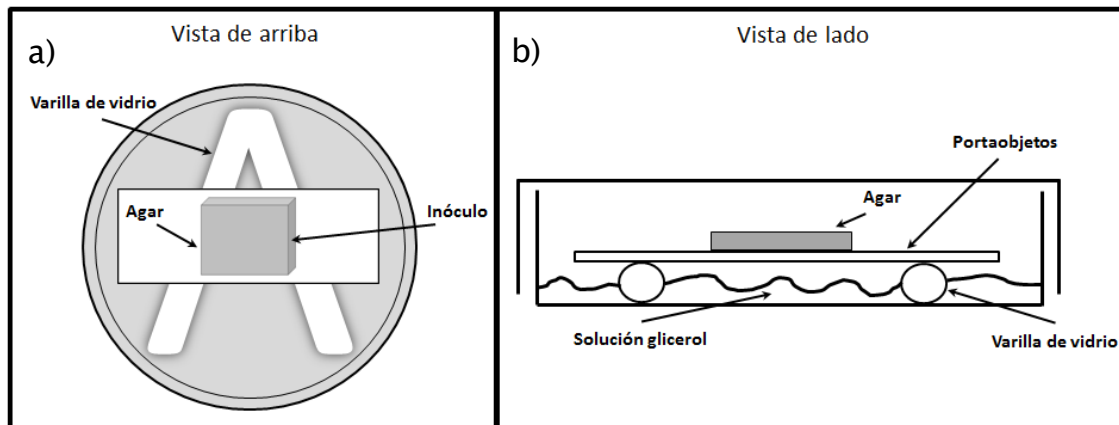


Figura 9.2. Preparación de microcultivo.

2.- Preparación de microcultivos

Procedimiento:

1. Trabajar en condiciones de asepsia.
2. Marcar una altura de aproximadamente 5 mm en las 2 cajas Petri restantes, llenar las cajas con PDA hasta la marca (aprox. 15 mL), y dejar solidificar.

3. Cortar 2 cuadros de 1 cm x 1 cm del PDA usando el bisturí y pinzas estériles y colocarlos sobre un portaobjetos estéril.
4. Inocular el hongo filamentoso por picadura en uno de los cantos del bloque de agar (Fig. 9.2). El segundo canto de agar es utilizado como control negativo.
5. Con la pipeta estéril de 10 mL adicionar en el fondo de la caja Petri 3 mL de la solución estéril de glicerol, para a mantener la humedad y evitar que se seque el microcultivo.
6. Manipular con cuidado la caja Petri para evitar que el cultivo caiga en el líquido, tapar la caja Petri, sellar con parafilm e incubar por 5-7 días a 28°C.
7. Revisar el crecimiento del hongo observando a simple vista los cultivos cada 48 h.

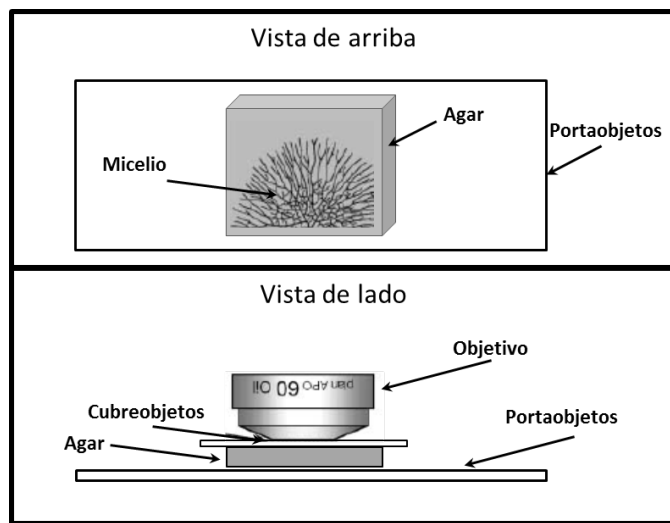


Figura 9.3. Observación de microcultivo.

3.- Observación de microcultivos

Procedimiento:

1. Al final del experimento, sacar el portaobjetos con pinzas, colocar un cubreobjetos sobre el cubo de agar (microcultivo) y observar al microscopio (Fig. 9.3). Presionar suavemente el cubo de agar con el cubreobjetos para evitar la formación de burbujas sin aplastar el agar.
2. Observar el microcultivo a 10x y 40x y documentar.
3. Regresar las cajas al profesor para que se desechen adecuadamente.

RESULTADOS

Incluir en el reporte una descripción de lo observado a simple vista y a través del microscopio, realizar esquemas nombrando las estructuras morfológicas identificadas.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Qué características morfológicas presentan de manera general los hongos filamentosos?
2. Indicar y dibujar las estructuras sexuales que presentan los hongos de manera general, ubicando el grupo filogenético del que son características.
3. Identificar las estructuras vegetativas y reproductivas que se observaron en la práctica.
4. Determinar el posible grupo de hongos de las que son representativas.
5. Buscar y leer los artículos de Riddell (1950) Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture, *Mycologia* 42:265–270 y Harris (1986) Modified method for fungal slide culture, *Journal of Clinical Microbiology* 24(3): 460–461. ¿Cuáles son las similitudes y diferencias entre el protocolo utilizado en esta práctica y los protocolos de Riddell (1950) y Harris (1986)?
6. ¿Cuáles son las ventajas y aplicaciones de los microcultivos?
7. ¿Cuáles son los cuidados que se deben tener durante el manejo de hongos filamentosos?

CUESTIONARIO

1. En una tabla indicar las principales diferencias morfológicas, metabólicas, nutricionales y fisicoquímicas, que existen entre bacterias y hongos.
2. Explicar en qué consiste el ciclo de vida de los hongos y la diferencia entre las esporas sexuales y asexuales.
3. ¿Qué factores pueden afectar la fisiología y morfología de un hongo filamentosos?
4. ¿Qué son los hongos dimórficos?
5. Enlistar 5 usos industriales actuales de hongos filamentosos dando ejemplos de los productos comerciales que se obtienen.

PREPARACION DE SOLUCIONES Y OTROS MATERIALES POR EL PROFESOR

Varillas de vidrio de 10 cm de largo

Para cortar las varillas de vidrio a la misma longitud del diámetro de las placas de Petri (10 cm), hacer una muesca a una varilla de vidrio con una lima a una distancia de 10 cm, enrollar la varilla con una franela, sujetar con ambas manos la varilla cerca de la muesca y presionar con los pulgares, finalmente limar los bordes cortantes. Repetir el proceso hasta cortar el número deseado de varillas de vidrio.

PRÁCTICA 10 – ECOLOGÍA MICROBIANA: LA COLUMNA DE WINOGRADSKY

INTRODUCCIÓN

Los procariontes, tanto bacterias como arqueas, presentan una extraordinaria diversidad metabólica. Participan en el reciclaje de todos los elementos que sustentan la vida en nuestro planeta a través de los llamados ciclos biogeoquímicos. La ecología microbiana es una rama de la ecología que estudia a los microorganismos en su ambiente natural. Dos pioneros en estudios de ecología microbiana fueron Sergio Winogradsky (1856–1953) y Martinus Willem Beijerinck (1851–1931). A diferencia de Pasteur y Koch, pioneros de los estudios con cultivos microbianos puros, ellos estudiaron las relaciones entre diferentes tipos de microorganismos en comunidades mixtas (Fig. 10.1).

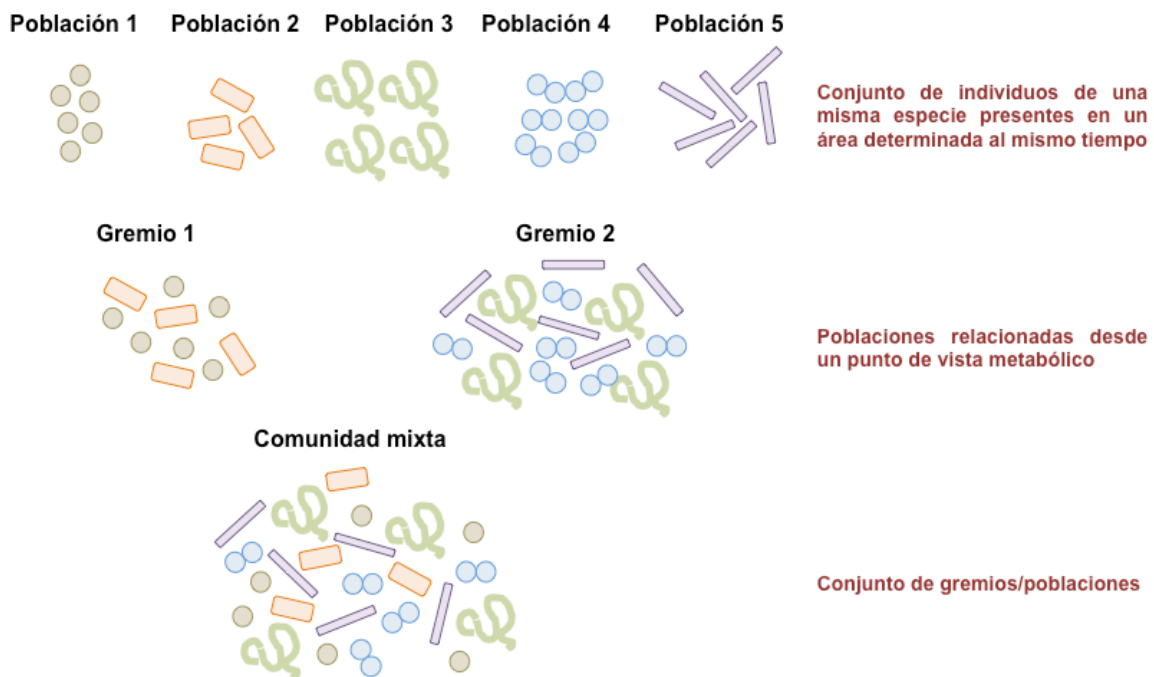


Figura 10.1. Comunidades microbianas, gremios y poblaciones.

La columna de Winogradsky es un sencillo dispositivo de laboratorio que permite el cultivo de una variedad de microorganismos en un microcosmo donde los microorganismos y los nutrientes interactúan a lo largo de un gradiente vertical (Fig. 10.2). Se prepara mezclando una capa de lodo de algún lago o cuerpo de agua con Na_2SO_4 , CaCO_3 , tiras de papel periódico (celulosa) en una columna y se coloca más lodo y agua de lago hasta llenar la columna. Se deja la columna expuesta a la luz, cerca de una ventana, por varias semanas durante las cuales

diferentes poblaciones bacterianas se irán repartiendo en zonas (capas) de diferentes colores. Esta columna es un sistema completo y autónomo de reciclamiento enfocado principalmente al ciclo del azufre.

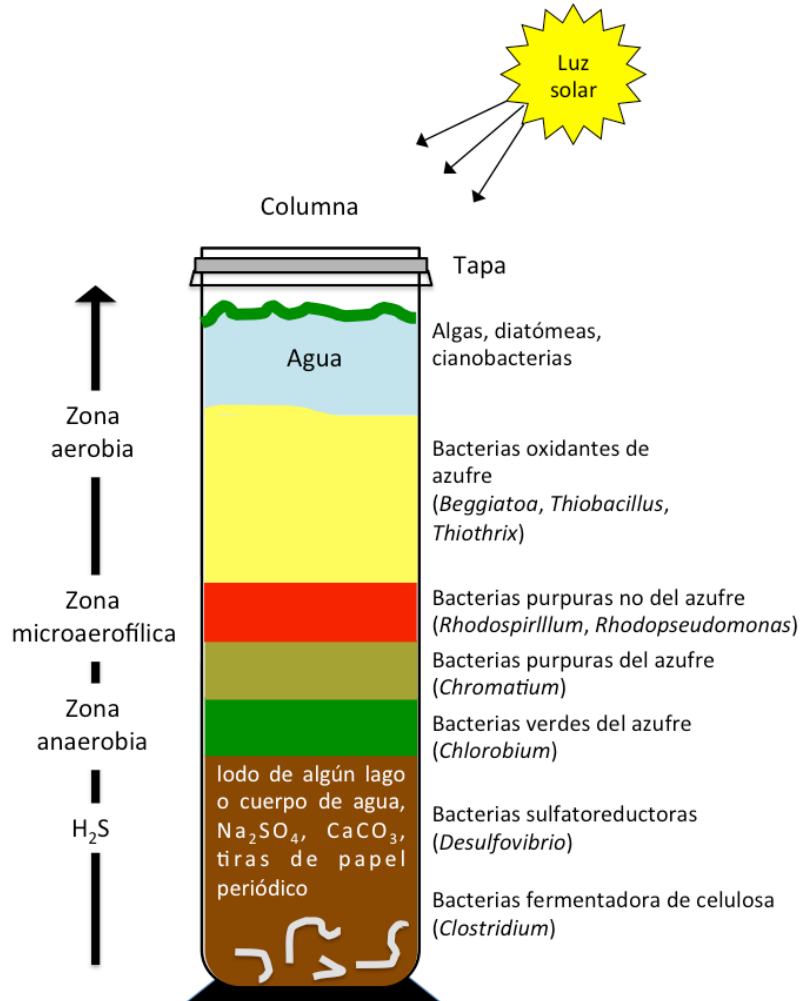


Figura 10.2. Columna de Winogradsky.

Una modificación parcial o total del modo de enriquecimiento o del tratamiento de la columna permite seleccionar microorganismos con características específicas: bacterias del hierro (limaduras de hierro), bacterias del ciclo del nitrógeno (fertilizante en exceso), bacterias termófilas (incubación a temperatura elevada), bacterias halófilas (sal), bacterias acidófilas (vinagre), etc. Las variaciones pueden ser infinitas. Hay quien coloca refresco de cola en el medio y quien agrega un trozo de cáscara de fruta para identificar los microorganismos capaces de colonizarlas.

OBJETIVO

Introducir el alumno en la ecología microbiana y en los ciclos biogeoquímicos a través de la construcción de una columna de Winogradsky y de la observación de las diferentes poblaciones microbianas que se establecen en ella.

MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPO

1.- Materiales y reactivos

a) Proporcionados por los alumnos

- 1 botella de refresco de 2 litros (vacía y limpia)
- 1 bolsa de tiras de papel de periódico (2 mm de ancho aprox.)
- Lodo de la superficie de un lago o cuerpo de agua (\approx 500 gramos)
- Agua procedente del mismo lago o cuerpo de agua (\approx 500 mL)
- 1 plumón negro indeleble punto medio
- 1 rollo de cinta masking tape
- 1 rollo de toallas absorbentes

b) Solicitados al laboratorista

Los materiales y reactivos descritos a continuación son por equipo (considerando 4 a 5 alumnos por equipo), salvo que se indique que es por grupo (considerando grupos de 25 alumnos máximo).

- 5 g de CaSO_4
- 5 g de CaCO_3
- 1 embudo grande
- 3 pissetas (agua destilada, etanol, cloro)

Los siguientes materiales y reactivos son por grupo:

- 1 rollo de Parafilm


MÉTODOS

Procedimiento:

1. Mezclar el lodo con las tiras de papel, CaSO_4 y CaCO_3 .
2. Con ayuda de un embudo, llenar la botella con esta preparación hasta $1/3$ de su volumen, colocando un poco más de lodo original sin tiras de papel al final. La mezcla en la columna debe estar bien apretada y comprimida en el fondo para eliminar burbujas de aire.
3. Posteriormente, llenar los $2/3$ restantes con el agua y cubrir con parafilm.
4. Ubicar la columna cerca de una ventana donde reciba la luz del sol pero no en exceso.
5. Observar los cambios en el aspecto de las columnas en cada sesión, la columna debe empezar a estabilizarse después de 4 a 6 semanas.
6. Periódicamente tomar muestras de los diferentes niveles de la columna con ayuda de pipetas de vidrio y realizar observaciones de preparaciones húmedas, fijadas y teñidas con el microscopio óptico.


RESULTADOS

Registrar en el **Cuadro 10.1** los cambios físicos observados con respecto al aspecto inicial de la columna. Agregar tantas filas como sea necesario para realizar el seguimiento de los cambios observados en diferentes fechas y zonas.

Fecha	Zona de la columna	Observaciones
		

Cuadro 10.1. Cambios físicos observados en la columna de Winogradsky a lo largo del tiempo.

Registrar y esquematizar en el **Cuadro 10.2** los distintos tipos de microorganismos observados en cada zona. Modificar el cuadro de acuerdo a los tiempos y zonas muestreados.

Zona de la columna	Morfologías	Gram	Esquemas
			

Cuadro 10.2. Tipos de microorganismos observados en diferentes zonas de la columna de Winogradsky.

DISCUSIÓN

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos, tratando de dar respuesta a las siguientes preguntas:

1. ¿Qué tipos de ambientes y zonas se establecieron a lo largo de la columna que prepararon en esta práctica?
2. ¿Qué tipo de comunidades microbianas y microorganismos se espera que se desarrollen en cada ambiente/zona?
3. ¿Se observan los mismos tipos y diversidad de microorganismos a diferentes tiempos y en diferentes zonas de la columna?

CUESTIONARIO

1. Definir ciclo biogeoquímico.
2. Definir población microbiana y comunidad microbiana.
3. ¿Cuál es el aceptor final de electrones en la respiración aerobia?
4. ¿Cuál es el aceptor final de electrones en la respiración anaerobia de las bacterias sulfato-reductoras?

5. Completar el Cuadro 10.3.

Bacteria	Forma	Gram	Clasificación metabólica
Ejemplo: <i>Beggiatoa</i>	Filamentos largos	Negativo	Bacteria sulfoxidante
<i>Thiobacillus</i>			
<i>Rhodospirillum</i>			
<i>Rhodopseudomonas</i>			
<i>Chromatium</i>			
<i>Chlorobium</i>			
<i>Clostridium</i>			
<i>Desulfovibrio</i>			

Cuadro 10.3. Características de bacterias típicas de columnas de Winogradsky.

6. Completar el siguiente cuadro.

Microorganismos	Reacciones globales
Algas y cianobacterias	$\text{CO}_2 \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n$ $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{¿?}$
Microorganismos heterótrofos aerobios	$(\text{CH}_2\text{O})_n \rightarrow \text{¿?}$ $\text{O}_2 \rightarrow \text{¿?}$
Bacterias sulfoxidantes	$\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{¿?} \rightarrow \text{S}^0$ $\text{CO}_2 \rightarrow \text{¿?}$
Bacterias sulfato-reductoras	$\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{¿?}$ Acetato $\rightarrow \text{¿?}$
Ejemplo: Bacterias anaerobias fermentativas	$(\text{CH}_2\text{O})_n \rightarrow \text{Acetato} \rightarrow \text{Productos de fermentación}$

Cuadro 10.4. Reacciones globales llevadas a cabo por distintos microorganismos presentes en columnas de Winogradsky.

BIBLIOGRAFÍA CITADA Y ADICIONAL

- Brown A., Smith H. (2014) Benson's microbiological applications, Laboratory manual in general microbiology, Short version, 13th edition, McGraw–Hill Education, New York.
- Cappuccino J.G., Sherman N. (2013) Microbiology: A laboratory manual, 10th edition, Benjamin Cummings, New York.
- Gamazo C., López–Goñi I., Díaz R. (2005) Manual práctico de microbiología, 3ª edición, Masson, Barcelona.
- Goldman R.D., Swedlow J.R., Spector D.L. (2010) Live cell imaging: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Harley J. (2010) Microbiology lab manual, 8th edition, McGraw–Hill Science, New York.
- Hickey P. C., Swift S. R., Roca M. G., Read N. D. (2004) Live–cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy, *Methods in Microbiology* 34:63–87.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., Stahl D.A., Brock T. (2015) Brock Biology of microorganisms, 14th edition, Pearson, New York.
- Pepper I.L., Gerba C.P., Gentry T.J. (2015) Environmental microbiology, 3rd edition, Elsevier, Amsterdam.
- Pommerville J.C. (2014) Alcamo's fundamentals of microbiology, 9th edition, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2002) Microbiología, 5ª edición, McGraw–Hill Interamericana de España, Madrid.
- Ramírez R.M., Luna B., Velázquez O. *et al.* (2011) Manual de prácticas de microbiología general, Facultad de Química UNAM, México.
- Reddy C. A., Beveridge T.J., Breznak J.A., Marzluf G. (2007) Methods for general and molecular microbiology, 3rd edition, ASM Press, Washington.
- Stanchi N.O., Martino P.E., Gentilini E., Reinoso E.H., Echeverría M.G., Leardini N.A., Copes J.A. (2007) Microbiología veterinaria, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2007) Introducción a la microbiología, 9ª edición, Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L. (2013) Microbiology: an introduction, 11th edition, Pearson, New York.
- Wiley J.M., Sherwood L.M., Woolverton C.J. (2008) Microbiología de Prescott, Harley y Klein, 7ª

edición, McGraw–Hill Interamericana de España, Madrid.

Winn W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Procop G.W., Schrenckenberger P.C., Woods G.L. (2008) Koneman Diagnóstico microbiológico, 6ª edición, Editorial Médica Panamericana, México.

PÁGINAS WEB DE INTERÉS

Microbe World – What is a microbe, página web de información general de microorganismos y experimentos que se pueden llevar a cabo en laboratorio: <http://www.microbeworld.org/what-is-a-microbe>

Microbe Zoo, página web de imágenes de microorganismos aislados de diferentes ecosistemas: <http://commtechlab.msu.edu/sites/dlc-me/zoo/>

Microbios en línea, libro en línea que reúne información sobre aspectos generales de microbiología, algunos grupos bacterianos como alfa, épsilon y gamma-*Proteobacterias*, bacterias Gram-positivas, algunos eucariontes (*Trypanosoma* y *Saccharomyces cerevisiae*) y el último ancestro común, entre otros temas: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/>

Microbitos, blog de microorganismos, pruebas bioquímicas, morfología colonial, medios de cultivo e identificación de bacterias: <https://microbitos.wordpress.com/>

Small Things Considered, blog de curiosidades de la microbiología: <http://schaechter.asmblog.org/>

The Microbial World, página web de introducción a los microorganismos, sus actividades y relaciones evolutivas: <http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/microbes>

Wikipedia de los microorganismos: <https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/MicrobeWiki>