



Universidad  
Continental

# Microbiología Ambiental

---

**Guías de  
Laboratorio**

---



## **Visión**

Al 2021, ser la mejor universidad para el Perú y el mundo en el contexto de la Cuarta Revolución Industrial.

## **Misión**

Somos una organización de educación superior dinámica que, a través de un ecosistema educativo estimulante, experiencial y colaborativo, forma líderes con mentalidad emprendedora para crear impacto positivo en el Perú y en el mundo.

**Universidad Continental**

Material publicado con fines de estudio



## NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO

Un laboratorio de Microbiología es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar microorganismos. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto se requiere un ambiente **limpio y ordenado** y trabajar **siempre en condiciones de esterilidad** (en campanas de esterilidad biológica o en la proximidad de la llama de un mechero de alcohol o de gas siempre alrededor de 15 a 20 cm de diámetro del mechero).

Aunque los microorganismos que se manipulen no sean considerados patógenos, **todos** los cultivos de **todos** los microorganismos deben ser manejados con precaución por su potencial patogenicidad.

Es necesario cumplir dos REQUISITOS BÁSICOS:

1. Restringir la presencia de los microorganismos en estudio a sus recipientes y medios de cultivo para evitar el riesgo de contaminarse uno mismo o a un compañero.
2. Evitar que los microorganismos ambientales (presentes en piel, pelo, aire, ropa, etc.) contaminen nuestras muestras.
3. Para mantener estas condiciones, es necesario respetar una serie de NORMAS DE BIOSEGURIDAD:
4. Es imprescindible el uso del guardapolvo, guantes y mascarilla en el laboratorio.
5. Al iniciar y finalizar las prácticas, el estudiante se lavará las manos con agua y jabón es necesario que cada alumno tenga su material de limpieza.
6. El lugar de trabajo debe estar siempre limpio y ordenado. Antes de comenzar cada práctica es conveniente desinfectar la superficie de trabajo. Los desinfectantes más habituales para esto son la lejía y el alcohol (etanol 96°).
7. Los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que pueden crear corrientes que originen contaminaciones o producir accidentes.
8. Durante las prácticas está prohibido comer, beber y fumar. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc.
9. Libros, carpetas, abrigos y cualquier otro material que no se utilice en la realización de la práctica deben estar apartados del lugar de trabajo.
10. Para deshacerse del material contaminado se utilizarán los recipientes adecuados, que serán esterilizados posteriormente. Nunca se debe tirar nada contaminado por la fregadera o a la basura común.
11. Bajo ningún concepto debe sacarse ninguna muestra contaminada del laboratorio.
12. No se debe pipetear nunca con la boca. Utilizar siempre pipeteadores manuales.
13. En caso de accidente (ruptura de material, derramamiento de microorganismos, etc.) se comunicará inmediatamente al docente.



## Índice

VISIÓN	2
MISIÓN	2
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	3
ÍNDICE	4

### PRIMERA UNIDAD

Guía de práctica N° 1: Reconocimiento y uso de materiales y equipos usados en microbiología	5
Guía de práctica N° 2: Manejo del microscopio	11
Guía de práctica N° 3: Preparación de medios de cultivo	16
Guía de práctica N° 4: Tinciones simples, diferenciales y especiales	20

### SEGUNDA UNIDAD

Guía de práctica N° 5: Cultivo de microorganismos	32
Guía de práctica N° 6: Crecimiento microbiano y enumeración de microorganismos	42
Guía de práctica N° 7: Acción de agentes físicos sobre los microorganismos	51
Guía de práctica N° 8: Acción de agentes químicos sobre los microorganismos	60

### TERCERA UNIDAD

Guía de práctica N° 9: Hidrolisis de carbohidratos, proteínas y lípidos	67
Guía de práctica N° 10: Microbiología del suelo	72
Guía de práctica N° 11: Aislamiento de los hongos	79
Guía de práctica N° 12: Diseño de un filtro ecológico de agua	89

### CUARTA UNIDAD

Guía de práctica N° 13: Detención de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas	93
Guía de práctica N° 14: Microbiología del agua	101
Guía de práctica N° 15: Columna de Winogradsky	111
Guía de práctica N° 16: Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos	118



# Guía de práctica N° 1

## Reconocimiento y uso de materiales y equipos usados en microbiología

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

- Describe el material y equipos usados en Laboratorio durante la Práctica de Microbiología.

### 2. Fundamento Teórico

La microbiología es una ciencia muy interesante y fascinante, para su estudio y comprensión es necesario efectuar algunas determinaciones prácticas para lo cual es necesario el conocimiento y manejo de algunos materiales e instrumentos de uso común.

Algunos de los instrumentos más utilizados en los laboratorios, son elaborados de vidrio resistente a altas temperaturas, por su alto contenido de dióxido de silicio, bajo álcali, óxido bórico y vestigios de otros óxidos, lo que condiciona su escaso coeficiente de dilatación, teniendo una gran aplicación en la fabricación de materiales de laboratorio, uno de los más conocidos es el vidrio PYREX. Así como los elaborados de distintos metales pesados como platino, mercurio, aluminio, cobre que les otorgan características como buenos conductores del calor o porque al medio ambiente son muy manejables sin alterar su composición.

#### A) MATERIAL DE VIDRIO.

Constituye una de las principales herramientas para los fines que se persigue en el laboratorio. Los requisitos necesarios para que un material sea un "buen material", son:

1. Ser de buena calidad; es decir que no sean fácil de quebrarse.
2. Ser de color neutro.
3. Poseer resistencia a las acciones mecánicas y a las variaciones de temperatura así como también a los álcali-libre (no se raje).
4. Poseer bajo coeficiente de dilatación (que no pierda su forma)

#### 1. Tubos de Ensayo:

Se emplean como recipientes de medios de cultivo.



#### 2. Placas Petri:

Cajas cilíndricas, se emplean como recipientes de medios de cultivo para el cultivo y aislamiento de microorganismos. Las más usadas son las de 15 ó 20 mm x 100 mm.



#### 3. Pipetas:

Tubos cilíndricos delgados terminados en punta, graduados al décimo o al centésimo de ml. Se emplean en la medición precisa de pequeñas cantidades de líquidos. Pueden ser:

- **Serológicas:** son terminales y con capacidad de 0.1 a 25 ml.





- **Volumétricas**, se reconocen por presentar una dilatación bulbosa central con unas marcas de aforamiento conocida, en el extremo proximal angosto de la pipeta, las medidas más conocidas son de 10, 25, 50 y 100 ml.



**4. Pipetas Pasteur**

Confeccionados de varillas de vidrio de diámetro de 4 x 20 mm de 30 ó 40 cm de longitud. Se emplea para la toma de pequeños inóculos de siembra.



**5. Matraces.**

El matraz Erlenmeyer es un frasco transparente de forma cónica graduado con una abertura en el extremo angosto prolongado y con un cuello cilíndrico. Por su forma es útil para realizar mezclas por agitación y para la evaporación controlada de líquidos; además, su abertura estrecha permite la utilización de tapones. El matraz de Erlenmeyer no se suele utilizar para la medición de líquidos ya que sus medidas son imprecisas.



**6. Vaso de precipitado**

Un vaso de precipitado es un simple contenedor de líquidos. Son cilíndricos con un fondo plano; se les encuentra de varias capacidades, desde 1 mL hasta de varios litros. Normalmente son de vidrio (Pyrex en su mayoría) o de goma. Suelen estar graduados, pero esta graduación es inexacta. Es recomendable no utilizarlo para medir volúmenes precisos de sustancias, ya que es un material que se somete a cambios bruscos de temperatura, lo que lo descalibra y en consecuencia nos entrega una medida errónea de la sustancia.



**7. Probeta**

La probeta es un instrumento volumétrico, que permite medir volúmenes superiores y más rápidamente que las pipetas, aunque con menor precisión. Sirve para contener líquidos. Está formado por un tubo generalmente transparente de unos centímetros de diámetro y está graduado. En la parte inferior está cerrado y posee una base que sirve de apoyo, mientras que la superior está abierta (permite introducir el líquido a medir) y suele tener un pico (permite verter el líquido medido).



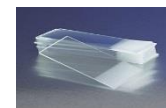
**8. Varilla de vidrio**

En laboratorio, la Varilla de vidrio es de gran grosor y de vidrio que sirve para mover, remover, coger muestras, agarrar, pinchar, trasvasar líquidos, filtrar, revolver, etc.



**9. Porta objetos:**

Son láminas de vidrio rectangulares de 70 mm de largo, por 26mm de ancho y de 1mm de espesor, los bordes están generalmente biselados.



**10. Cubre objetos:**

Son delgadas láminas de vidrio de forma cuadrada o redonda de medidas variables, comprendidas generalmente entre 15mm a 22mm.

**Limpieza:** Los porta objetos y cubre objetos generalmente se encuentran engrasados por el contacto de las manos, antes de usarlos se sumergen en alcohol o en una mezcla sulfocromica para desengrasarlos.



**11. Tubos de fermentación durham:**

Son pequeños tubos de 70 x 10 mm, que se coloca al fondo de un tubo de ensayo y que se utiliza para evidenciar la producción de gas de una bacteria al fermentar determinados azúcares.



**12. Espátulas de Digrafsky:**

Se utiliza para la diseminación del material sobre la superficie de los medios de cultivo, corrientemente se fabrican en el mismo laboratorio.

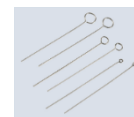


**B. MATERIALES DE OTRA NATURALEZA****1. Mechero de bunsen:**

Es un tubo con un diámetro de 1.5 cm con una base redonda de aproximadamente 10 cm. de diámetro, que en la parte baja del tubo se encuentra una entrada para el gas butano y un anillo regulador. Por la parte superior del tubo se forma la flama del mechero la cual brinda un margen de seguridad al formar un área de esterilidad de aproximadamente 15 a 25 cm. de radio.



**2. Asa de platino:** Son alambres de platino o de níquel-cromo, de unos 6 a 9 cm de longitud por 1 mm más o menos de grosor, que van insertadas en el extremo de una varilla con dispositivo de rosca en el extremo.



**3. Asa Bacteriológica:** Está formada de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio con una cubierta aislante del calor y en su extremo proximal un filamento que puede ser de nicromo, tungsteno o platino que termina en aro o en punta, este instrumento de laboratorio nos ayuda transportar o arrastrar microorganismos de un medio a otro medio para su adecuado desarrollo, así como para la realización de frotis.

• **Asa en argolla o anillos, no calibrada:** Son de alambre de Nicrome. Sirve para la siembra por estrías e inoculaciones en general.



• **Asa de platino en anillo, calibrada:** Para tomar 0.001 ml



• **Asa recta o en hilo:** Sirve para trasladar una sola colonia a medios de identificación o subcultivo y para la siembra por picadura profunda.

**4. Asa micológica:**

Está formada de una base que puede estar hecha de platino, acero, aluminio y un filamento más grueso que el asa bacteriológica que puede ser de alambre o platino que termina o en un ángulo de 45° o forma de "L", este instrumento nos ayuda transportar o arrastrar hongos de un medio a otro medio para su adecuado desarrollo, así como para la realización de frotis.

**C) EQUIPOS DE LABORATORIO**

**1. Autoclave:** Es un dispositivo que sirve para esterilizar material de laboratorio utilizando vapor de agua a alta presión y temperatura. El fundamento de la autoclave es que coagula las proteínas de los microorganismos debido a la presión y temperatura.

Para lograr esterilizar, necesita una presión interna de 103 kPa, temperatura de 121 °C por un tiempo de 15-20 minutos.

**2. Horno Pasteur**

Es como una mufla que tiene tres paredes y la cubierta es de asbesto sirve para la esterilización por el calor seco.

**3. Estufas de aire caliente**

Al igual que el anterior es utilizado en la esterilización por el calor seco. Tienen solo dos paredes y son de forma cúbica.

**4. Incubadoras y Hornos**

Los hornos son capaces de mantener la temperatura más de 100°C y no tienen salida de aire.

Las incubadoras mantienen la temperatura a menos de 100°C y si tienen salida de aire.





**5. Cámara de flujo laminar:**

Equipo para manipular muestras biológicas bajo una atmósfera microbiológicamente controlada. Gabinete de seguridad biológica con ventana frontal deslizable y alarma que indica el nivel de apertura de la ventana. Flujo de aire vertical y recirculación de aire filtrado. De acero inoxidable. Con filtros absolutos de eficiencia del 99.99% (HEPA) y retención de partículas de 0.3 micras. Con llave para toma de oxígeno.



**6. Baño María**

También llamados baños de agua, presentan un termostato que regula la temperatura del agua y un piso para colocar los materiales que se desea.



**3. Equipos, Materiales y Reactivos**

**3.1. Equipos**

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Baño María		1
3	Camara de Flujo Laminar		1
4	Incubadora		1
5	Autoclave		1
6	Horno		1
7	Microscopio		1

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Placas Petri	15x 100	1
2	Probeta	50 ml	1
3	Varilla de vidrio		1
4	Vasos precipitado	500 ml	1
5	Tubos de ensayo	13x100	1
7	Asa Digraskly	vidrio	1
8	Asa Bacteriologica		1
9	Asa Micológica		1
10	Pipeta serologica	10 ml	1
11	Matraz	500 ml	1
12	Espátulas de Digralsky		1
13	Tubos de fermentación Durham		1
14	Laminas porta objetos		1
15	Lamina cubre objetos		1

**3.2. Reactivos**

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol Etilico	Mezcla alcohol y agua	120ml
2	Mezcla sulfocrómica	Solución diluida	1000 ml

**4. Indicaciones/instrucciones:**

- 4.1 Manejar con especial cuidado el material frágil, como el vidrio.
- 4.2 No utilizar ningún equipo sin conocer su uso, funcionamiento y normas de seguridad específicas.
- 4.3 Informa al profesor del material roto o averiado.





## 5. Procedimientos:

### Primero: Reconocimiento de materiales y equipos utilizados en el Laboratorio

- Observe e identifique los materiales presentados.
- Elabore una lista con los materiales específicos que se utilicen en el laboratorio y complete la Tabla N° 1

Tabla N° 1: Materiales utilizados en el laboratorio de microbiología

INSTRUMENTO	DESCRIPCION	FUNCIÓN

### Segundo: Preparación y esterilización de material.

- El proceso de esterilización se aplica dependiendo del material a esterilizar, el procedimiento a seguir es el siguiente:

#### 1. CONFECCIÓN DE TAPONES DE ALGODÓN

- a) Tomar un trozo rectangular, practicar a lo largo el dobles en tres y enrollarlo transversalmente a su eje longitudinalmente hasta darle la medida y diámetro deseado. Para mejor duración del tapón, almoadar un trozo de gasa que lo cubra totalmente.

#### 2. PREPARACIÓN DE PIPETAS SEROLOGICAS Y VOLUMETRICAS:

##### Preparación de Pipetas Serológicas

- a) Colocar tapones de algodón a manera de filtros moderadamente ajustados, en las boquillas de las pipetas.
- b) Colocar oblicuamente la pipeta serológica a una tira de papel y hacer un dobles de este en un extremo, cubrir el extremo proximal (punta de la pipeta).
- c) Deslizar el papel en espiral sobre la longitud de la pipeta hasta la boquilla. Hacer torsión de la tira de papel para permitir la protección completa. Evitar queden vacíos.

#### 3. PREPARACIÓN DE LAS PLACAS PETRI:

Se pueden envolver aisladamente o en número de 2 ó 3, con los trozos rectangulares de papel Kraft.

- a) Colocar las placas sobre el papel en posición invertida y doblar los márgenes uno sobre otro, a manera de cubrirla.
- b) Completar el dobles con los extremos del papel sobrante asegurándose con papel engomado. Los bordes de las placas deben quedar íntimamente adheridos al papel que los cubre, para evitar vacíos.

## 6. Resultados

### 1. Reconocimiento de materiales y equipos utilizados en el Laboratorio

Tabla 1: Materiales utilizados en el laboratorio de microbiología

NOMBRE INSTRUMENTO/EQUIPO	DESCRIPCION (foto)	FUNCIÓN

### 2. Preparación y esterilización de material. (Colocar las fotos del trabajo terminado)



**7. Conclusiones**

7.1.....

7.2.....

7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Beran, J. (2007).Laboratory manual for principles of general chemistry (9ª ed.).USA: John Wiley & Sons Inc.
- Medios de cultivo [en línea]. [Consulta: 22 de marzo de 2016]. Disponible en web:  
<https://es.scribd.com/doc/7788947/2/Agar-Nutritivo>  
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/34/medios-de-cultivo.pdf>

# Guía de práctica N° 2

## Manejo del microscopio

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Maneja correctamente el microscopio y señala los componentes mecánicos y ópticos que constituyen el microscopio

### 2. Fundamento Teórico

#### 2.1 Partes de un microscopio óptico

##### Sistema óptico

**Ocular:** Lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.

**Objetivo:** Lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.

##### Sistema de Iluminación

**Condensador:** Lente que concentra los rayos luminosos sobre la preparación.

**Diafragma:** Regula la cantidad de luz que entra en el condensador.

**Foco:** Dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

##### Sistema mecánico

**Soporte:** Mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.

**Platina:** Lugar donde se deposita la preparación.

**Cabezal:** Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.

**Revólver:** Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.

##### **Tornillos de enfoque:**

- **Macrométrico** que aproxima el enfoque
- **Micrométrico** que consigue el enfoque correcto.

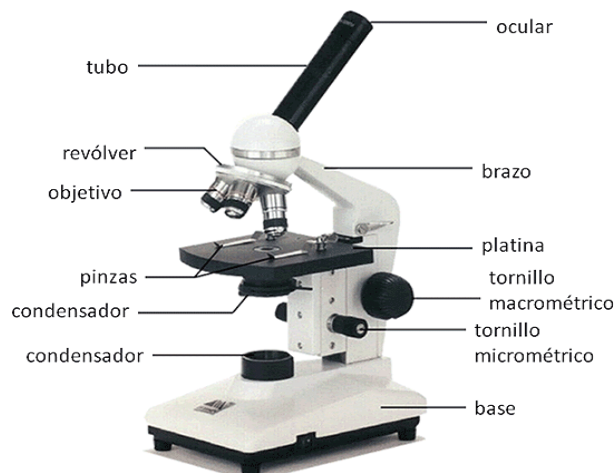


Figura 1. Microscopio óptico compuesto



## 2.2 Manejo del microscopio óptico

Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente. Si el microscopio se recogió correctamente en el uso anterior, ya debería estar en esas condiciones.

Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.

Comenzar la observación con el objetivo de 4x (ya está en posición) o colocar el de 10 aumentos (10x) si la preparación es de bacterias.

### Para realizar el enfoque:

1. Colocar el objetivo de menor aumento en posición de empleo y bajar la platina completamente.
2. Colocar la preparación sobre la platina sujetándola con las pinzas metálicas.
3. Comenzar la observación con el objetivo de 10X si la preparación es de bacterias.
4. Acercar al máximo la lente del objetivo a la preparación, empleando el tornillo macrométrico. Esto debe hacerse mirando directamente y no a través del ocular, ya que se corre el riesgo de incrustar el objetivo en la preparación pudiéndose dañar alguno de ellos o ambos.
5. Mirando, ahora sí, a través de los oculares, ir separando lentamente el objetivo de la preparación con el macrométrico y, cuando se observe algo nítida la muestra, girar el micrométrico hasta obtener un enfoque fino.
6. Pasar al siguiente objetivo. La imagen debería estar ya casi enfocada y suele ser suficiente con mover un poco el micrométrico para lograr el enfoque fino. Si al cambiar de objetivo se perdió por completo la imagen, es preferible volver a enfocar con el objetivo anterior y repetir la operación desde el paso 4.
7. El objetivo de 40 x enfoca a poca distancia de la preparación y por ello es fácil que ocurran dos tipos de percances: incrustarlo en la preparación si se descuidan las precauciones anteriores y mancharlo con aceite de inmersión si se observa una preparación que ya se enfocó con el objetivo de inmersión.

### Enfoque visual a menor aumento (10 X)

Se coloca la preparación centrada en la platina, mirando por fuera, se acerca el objetivo de menor aumento (10 X) a la lámina, girando el tornillo macrométrico hasta que quede a una distancia ligeramente menor de la distancia de trabajo.

Ahora se enfoca girando el tornillo macrométrico hasta ver la imagen del preparado.

Una vez obtenida la imagen, complete el enfoque con el tornillo micrométrico o de ajuste fino. Si es necesario, gradúa la intensidad luminosa ajustando la apertura del diafragma y la altura del condensador. Evite sobre iluminación.

### Enfoque visual a mayor aumento (40 X)

Una vez observada la preparación a menor aumento, pase a posición de trabajo del objetivo de mayor aumento, girando suavemente el revólver. Para el caso de microscopio con lentes parafocales, queda enfocado automáticamente y se afina el enfoque con el tornillo micrométrico. Si el microscopio posee lentes no parafocales, la lente puede tropezar con la preparación, entonces levante el objetivo empleando el tornillo macrométrico y proceda a acercar el objetivo a la preparación a menos de 1mm observando por fuera y no a través del ocular. Enfoque la imagen con el tornillo micrométrico alejando siempre el objetivo de la preparación.

### Empleo del objetivo de inmersión (100X)

1. Bajar totalmente la platina.
2. Subir totalmente el condensador para ver claramente el círculo de luz que nos indica la zona que se va a visualizar y donde habrá que echar el aceite.
3. Girar el revólver hacia el objetivo de inmersión dejándolo a medio camino entre éste y el de 40x.
4. Coloque una gota muy pequeña de aceite de inmersión sobre la laminilla cubreobjetos (si la preparación es un extendido fijado, coloque la gota de aceite de inmersión directamente sobre la lámina). Colocar una gota mínima de aceite de inmersión sobre el círculo de luz.
5. Terminar de girar suavemente el revólver hasta la posición del objetivo de inmersión.
6. Mirando directamente al objetivo, subir la platina lentamente hasta que la lente toca la gota de aceite. En ese momento se nota como si la gota ascendiera y se adosara a la lente.
7. Enfocar cuidadosamente con el micrométrico. La distancia de trabajo entre el objetivo de inmersión y la preparación es mínima, aun menor que con el de 40x por lo que el riesgo de accidente es muy grande.
8. Una vez se haya puesto aceite de inmersión sobre la preparación, ya no se puede volver a usar el objetivo 40x sobre esa zona, pues se mancharía de aceite. Por tanto, si desea enfocar otro campo, hay que bajar la platina.

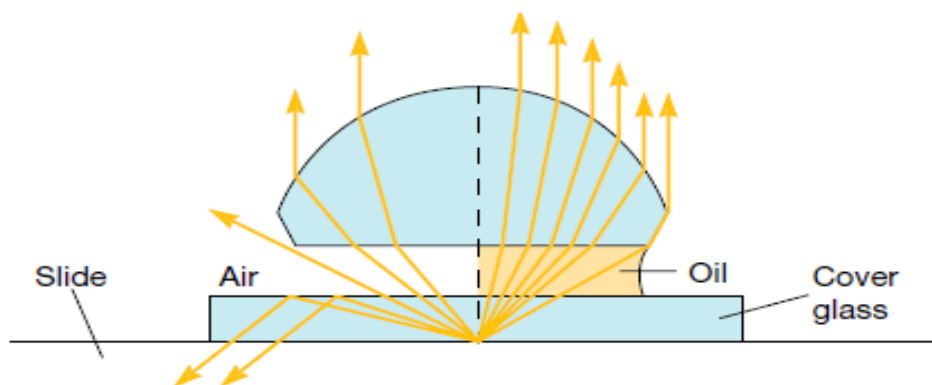
- Una vez finalizada la observación de la preparación se baja la platina y se coloca el objetivo de menor aumento girando el revólver. En este momento ya se puede retirar la preparación de la platina. Nunca se debe retirar con el objetivo de inmersión en posición de observación.
- Teniendo en cuenta que la distancia de trabajo es menor con el objetivo de inmersión y se requiere mayor intensidad de luz.
- Limpiar el objetivo de inmersión con cuidado empleando un papel especial para óptica. Comprobar también que el objetivo 40x está perfectamente limpio.

#### Alcances:

#### Cómo funciona el aceite de inmersión?

Cuando el objetivo de inmersión es usado, el aceite de inmersión llena los espacios entre el objetivo y el espécimen. Debido a que el aceite de inmersión tiene el mismo índice de refracción que el vidrio, en consecuencia con este sistema, los rayos de la luz pasan directamente del portaobjetos al lente del objetivo de 100 X o lente de inmersión, por lo tanto la pérdida de luz se reduce al mínimo. (Figura 1)

Si no se utilizara dicho aceite los rayos de luz se refractarían (desviarían) debido al aire presente entre el portaobjetos y el objetivo, y entraría menos luz al microscopio. Si se siguen con sumo cuidado las instrucciones se debe obtener una buena iluminación y observación del espécimen en cuestión



**Figure 1.** El objetivo de inmersión: Un lente de objetivo de inmersión que opera en el aire y en el aceite de inmersión. Se observa que los rayos de luz que pasan a través del el aire están doblados (refractados) y muchos rayos no ingresan al objetivo de inmersión. En cambio, el objetivo que opera con el aceite de inmersión, los rayos de la luz pasar directamente del portaobjetos al lente del objetivo de 100 X o lente de inmersión, evitando la pérdida de rayos de luz

#### Como calcular el aumento total del objeto observado?

Recuerda que el lente ocular, ubicado en la parte superior del tubo, magnifica la imagen formada por el lente objetivo. Como resultado, la magnificación total vista por el observador se obtiene por la multiplicación de la ampliación del lente objetivo por la ampliación del lente ocular.

Por ejemplo, cuando usamos un ocular 10 X y un objetivo de 40 X, su total magnificación es:  $10 \times 40 = 400$  veces

#### Precaución

Una vez realizada la observación limpia con papel de lentes el objetivo de inmersión pues al solidificarse se puede dañar la lente. Para lo anterior, tenga cuidado de girar el revólver directamente al objetivo de menor aumento sin devolverlo ya que mojaría el objetivo de mayor aumento con aceite de inmersión. Finalmente retira la lámina del microscopio.

#### Mantenimiento y precauciones

- Al finalizar el trabajo, hay que dejar puesto el objetivo de menor aumento en posición de observación, asegurarse de que la parte mecánica de la platina no sobresale del borde de la misma y dejarlo cubierto con su funda.



2. Cuando no se está utilizando el microscopio, hay que mantenerlo cubierto con su funda para evitar que se ensucien y dañen las lentes. Si no se va a usar de forma prolongada, se debe guardar en su caja dentro de un armario para protegerlo del polvo.
3. Nunca hay que tocar las lentes con las manos. Si se ensucian, limpiarlas muy suavemente con un papel de filtro o, mejor, con un papel de óptica.
4. No dejar el portaobjetos puesto sobre la platina si no se está utilizando el microscopio.
5. Después de utilizar el objetivo de inmersión, hay que limpiar el aceite que queda en el objetivo con pañuelos especiales para óptica o con papel de filtro (menos recomendable). En cualquier caso se pasará el papel por la lente en un solo sentido y con suavidad. Si el aceite ha llegado a secarse y pegarse en el objetivo, hay que limpiarlo con una mezcla de alcohol-acetona (7:3) o xilol. No hay que abusar de este tipo de limpieza, porque si se aplican estos disolventes en exceso se pueden dañar las lentes y su sujeción.
6. No forzar nunca los tornillos giratorios del microscopio (macrométrico, micrométrico, platina, revólver y condensador).
7. El cambio de objetivo se hace girando el revólver y dirigiendo siempre la mirada a la preparación para prevenir el roce de la lente con la muestra. No cambiar nunca de objetivo agarrándolo por el tubo del mismo ni hacerlo mientras se está observando a través del ocular.
8. Mantener seca y limpia la platina del microscopio. Si se derrama sobre ella algún líquido, secarlo con un paño. Si se mancha de aceite, limpiarla con un paño humedecido en xilol.
9. Es conveniente limpiar y revisar siempre los microscopios al finalizar la sesión práctica y, al acabar el curso, encargar a un técnico un ajuste y revisión general de los mismos.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio óptico		6

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Laminas portaobjetos		2
2	Laminillas cubreobjetos		2
3	Papel óptico		2

#### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Aceite de inmersión		6

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Los portaobjetos y cubreobjetos son de vidrio. Tenga cuidado con ellos. No te cortes al utilizarlos.
- 4.2 Desechar los cristales rotos en el recipiente debidamente etiquetado.
- 4.3 Si el microscopio tiene una falla mecánica, no usarlo y llamar al docente o personal técnico encargado.

### 5. Procedimientos:

#### Primero

Visualizar el siguiente video:

#### Segundo

Señalar las partes del microscopio identificadas en el video en el microscopio que está manejando en la clase práctica.

### 6. Resultados

1. Dibujar un microscopio óptico y señale sus partes (sistema óptico y sistema mecánico)
2. Calcular el aumento total para cada combinación ocular / objetivo en el microscopio de tu mesa

Ocular	x	Objetivo	=	Aumento
10 X		40 X		400 veces



---

---

---

---

3. Ubique el diafragma en tu microscopio. Realice un dibujo y mencione cuál su función.
  
4. Ubique el condensador en el microscopio. Realice un dibujo y mencione cuál es su función.

**7. Conclusiones**

7.1.....

7.2.....

7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....

.....

.....

.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Beran, J. (2007).Laboratory manual for principles of general chemistry (9a. ed.). USA: John Wiley & Sons Inc.
- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.



# Guía de práctica N° 3

## Preparación de medios de cultivo

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica los requerimientos nutricionales de los microorganismos y prepara diferentes medios de cultivo.

### 2. Fundamento Teórico

2.1 **MEDIOS DE CULTIVO:** Son sustancias nutritivas líquidas o sólidas, que se utilizan en el laboratorio para el crecimiento de los microorganismos, pudiendo ser similares a sustratos naturales, en los cuales estos crecen normalmente. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuado, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad

2.2 **COMPOSICION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:** Sus componentes básicos deben satisfacer las mínimas exigencias nutricionales para el desarrollo microbiano y varían según el tipo de bacteria. Incluyen: agua, nutrientes como fuentes de nitrógeno, carbono y energía; y en ciertos casos, factores de crecimiento. Se considerarán además para el crecimiento, necesidades de O<sub>2</sub> (aerobios), CO<sub>2</sub> parcial (microaerófilos) o total (anaerobios) y condiciones óptimas de pH y temperaturas de incubación. Los constituyentes habituales de los medios de cultivo son:

1. **Agar.** Se utiliza como agente solidificante. Es un polisacárido que se obtiene de ciertas algas marinas. Las bacterias no son capaces de degradarlo. Se licúa completamente a la temperatura del agua hirviendo y se solidifica al enfriarse a 40°C.
2. **Azúcares.** Son una fuente de carbono para los microorganismos. Los más empleados son la glucosa, la lactosa y la sacarosa.
3. **Peptonas.** Son proteínas hidrolizadas, se obtienen por digestión química o enzimática de proteínas animales o vegetales.
4. **Extractos.** Son preparados de ciertos órganos o tejidos animales o vegetales obtenidos con agua y calor. Los extractos son ricos en proteínas de bajo peso molecular y en factores de crecimiento. Ej.: extracto de carne, de levadura, de malta, etc.
  - **Extracto de carne:** Concentrado de componentes hidrosolubles de la carne. Aporta sustancias nitrogenadas como: aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, ácidos orgánicos, creatina, urea, y sustancias no nitrogenadas como glucógeno, fosfatos de hexosas, ácido láctico, sales inorgánicas. La calidad de este tipo de extracto varía con la carne empleada, el tiempo y la temperatura de extracción. Su función es ser complemento vitamínico de las peptonas.
  - **Extracto de Levadura:** Se obtiene por autólisis de las células de levadura de cervecera y de panadería, que son inducidas a autolisarse por calor a 55°C o pueden ser hidrolizadas con HCl o enzimas proteolíticas. Su función es ser suplemento vitamínico de las peptonas, pero también aporta mezclas de aminoácidos y péptidos, y carbohidratos. Sustituye al extracto de carne.
5. **Fluidos corporales.** Sangre completa, sangre desfibrinada, plasma o suero sanguíneo son añadidos a los medios empleados para el cultivo de algunos microorganismos patógenos.
6. **Sistemas amortiguadores.** Son sales que se añaden al medio para mantener el pH dentro del rango óptimo del crecimiento bacteriano. Ej.: fosfatos bisódicos o bipotásicos.
7. **Indicadores de pH.** Son indicadores ácido-base que se añaden para detectar cambios de pH en el medio.





**8. Agentes reductores.** Sustancias que se añaden al medio para crear las condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerófilos o anaerobios. Ej.: cisteína y tioglicolato.

**9. Agentes selectivos.** Sustancias como el cristal violeta, las sales biliares etc. que a determinadas concentraciones en el medio actúan como agentes selectivos frente a determinados microorganismos.

**10. NaCl** que se añade al nutriente aumenta la presión osmótica del medio.

**2.3 UTILIDAD DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:** La mayoría de los medios de cultivo son empleados para el desarrollo inicial y aislamiento de microorganismos heterotróficos, son ricos en componentes proteicos derivados de carnes, corazón, cerebro, caseína, fibrina, soya, por digestión con enzimas proteolíticas (pepsina, tripsina, papaína). Estos derivados son principalmente péptidos, peptonas, proteosomas, aminoácidos, sales inorgánicas como fosfatos y trazas de K y Mg que los organismos utilizan como compuestos parcialmente degradados, al ser incapaces la mayoría de hidrolizar proteínas completas.

**2.4 CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO:** Según su composición y objetivos se clasifican de la siguiente manera:

**MEDIOS COMUNES:** Aquellos que contienen los mínimos componentes nutricionales para organismos heterotróficos no exigentes. Estos pueden ser LÍQUIDOS, SÓLIDOS y SEMISÓLIDOS. Ejm:

- **Medios Líquidos:** Son de consistencia líquida. Ejm: Caldo nutritivo, caldo peptonado, caldo triptosa, caldo carne y otros.

- **Medios Sólidos:** Nutrientes compuestos de un medio líquido base, al que se le agregan sustancias orgánicas de poco o nulo valor nutritivo como el agar o gelatina, para dar al medio consistencia de gel. Ejm.: Agar nutritivo, agar peptonado, agar almidón, medio de gelatina y otros.

El Agar Nutritivo depositado en placas Petri, permite el aislamiento de bacterias no exigentes a partir de una fuente problema. También es importante su utilidad para otros fines como para la preparación de cosechas bacterianas masivas en la elaboración de antígenos, vacunas, conservación de cepas para estudios culturales en tubos de prueba, etc.

- **Medios Semisólidos:** Compuesto por cualquiera de los medios líquidos antes mencionados, a los que se adiciona una cantidad suficiente de agar (0.5%). para obtener un estado de gel blando (semisólido) Principalmente se les usa para estudios de motilidad macroscópica en columna de los microorganismos, mantenimiento en cepario y estudios de la capacidad respiratoria.

**MEDIOS ENRIQUECIDOS O SUPLEMENTADOS:** Son medios complejos (normalmente) con aditivos adicionales para favorecer el crecimiento de determinados microorganismos (particularmente heterótrofos exigentes). Se componen de un medio basal ordinario suplementado con factores de crecimiento como sangre, suero sanguíneo, líquido pleural, vitaminas, extracto de levadura, bases nitrogenadas, carbohidratos y sales minerales. Estos medios pueden ser: LÍQUIDOS o SÓLIDOS. Ejm.

**Medios Líquidos:** Caldo cerebro corazón, caldo extracto de levadura, caldo suero, caldo tripticasa soya, etc.

**Medios Sólidos:** Agar cerebro corazón, agar extracto de levadura, agar sangre, agar chocolate, suero coagulado de Loeffler y otros.

**MEDIOS DEFINIDOS O SINTÉTICOS:** Preparados exclusivamente de sustancias químicas definidas, por lo tanto su composición se conoce. Ejm:

**MEDIOS NO DEFINIDOS O COMPLEJOS:** Contienen algunos ingredientes cuya composición exacta se desconoce. Ejm: Caldo nutritivo, Caldo de triptona, Agar Mc Conkey

**MEDIOS ESPECIALES:** Son aquellos que además de contener los requerimientos nutricionales básicos, llevan en su composición sustancias inhibitoras con carácter selectivo y compuestos específicos e indicadores para poner de manifiesto los principales caracteres bioquímicos esenciales para el diagnóstico específico. Entre las sustancias inhibitoras, los medios pueden contener sales biliares, antibióticos, colorantes u otros; pueden afectar el metabolismo o sistema enzimático con carácter de selección. Comprende:



**-Medios de ENRIQUECIMIENTO:** Que favorecen el crecimiento de uno o un grupo de microorganismos en particular, e inhiben en lo posible a otros de la microflora acompañante. Ejm.: Agua peptonada alcalina (APA)

**-Medios SELECTIVOS:** Que favorecen el aislamiento de un determinado grupo de microorganismos mediante la obtención de colonias (cepas puras). Todos son utilizados en condiciones sólidas. Ejm: Agar McConkey y Agar Saboraud

**-Medios DIFERENCIALES:** Empleados para detectar reacciones bioquímicas, con carácter diferencial de grupos, géneros y especies microbianas. Ejm. Agar TSI

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Baño María		1
3	Camara de Flujo Laminar		1
4	Incubadora		1
5	Mecheros bunsen		1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1			1
2	Probeta graduada	50 ml	1
3	Varilla de vidrio		1
4	Vasos precipitado	500 ml	1
5	Tubos de ensayo	13x100	1
7	Gradillas		1
8	Botellas de vidrio de 250 mL		1
9	Pipetas serológicas		1
10	Varillas de vidrio		1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol Etilico	Mezcla alcohol y agua	120ml
2	Mezcla sulfocrómica	Solución diluida	1000 ml
3	Frasco de Mc Conkey	En polvo	500g
4	Frasco de agar agar	En polvo	500g
5	Frasco de Peptona	En polvo	500g
6	Frasco de Extracto de carne	En polvo	500g
7	Frasco de NaCl	En polvo	500g
8	Frascos de alcohol 70% para desinfección	Solución diluida	100 ml
9	Cintas de pH	Cintas	2
10	Frascos con HCL 0.1 N	Solución diluida	10 ml
11	Frascos NaOH 0.1N	Solución diluida	10 ml

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 2.1 Leer la etiqueta se seguridad de todos los reactivos antes de su utilización en el Laboratorio.
- 2.2 Consultar los procedimientos de manipulación aséptica, riesgos biológicos y desecho del producto usado en el documento INSTRUCCIONES GENERALES DE USO

### 5. Procedimientos:

1. Leer las instrucciones del fabricante para cada medio de cultivo.
2. Pesar los ingredientes según la cantidad requerida por los medios a preparar.
3. Colocar la cantidad pesada en el matraz Erlenmeyer (con excepción del agar granulado que se adiciona en caliente), adicionar agua destilada en la proporción requerida. Homogenizar la mezcla mediante la varilla de vidrio.



4. Colocar el matraz Erlenmeyer sobre una rejilla de asbesto. Calentar la muestra (mezcla), empleando la cocina eléctrica, hasta lograr la total disolución de los ingredientes. En la preparación del agar, se adiciona el agar granulado en caliente y se sigue calentando hasta su completa disolución.
5. Disueltos los componentes, enfriar a 50-55°C y ajustar el pH a 7.2 - 7.4 con **HCl 0.1 N** ó **NaOH 0.1 N**. Distribuir los medios en las botellas de vidrio hasta la mitad. Taponar.
6. Esterilizar a la autoclave a 15 lb de presión (121 ° C) por 15 minutos. Terminado el tiempo de esterilización, esperar que la aguja del manómetro descienda y extraer los medios.
7. Los medios sólidos sometidos al proceso de esterilización y enfriados a 50-55°C, deben de repartirse en alícuotas de 12 a 15 mL en 1-2 placas Petri en condiciones asépticas; para ello se tendrá que seguir las siguientes indicaciones:
  - No destapar las cajas de petri, sino hasta el momento que vayan a ser utilizadas. Es conveniente colocarse un cubre bocas la persona que va a realizar el vaciado y evitar hablar en todo momento para no contaminar el medio de cultivo.
  - Es conveniente mantener el mechero encendido y trabajar cerca del área estéril al momento del vaciado en las cajas de petri. Levantar la tapadera de la caja petri con la mano izquierda, sin soltarla y sin retirarla demasiado de la base de la misma caja mientras que con la mano derecha tomar el matraz que contiene el medio de cultivo y realizar el vaciado de aproximadamente 15 ml a 20 ml de Agar por placa procurando que no se formen burbujas, se procede a tapar la caja inmediatamente.
  - Si se forman burbujas, tomar el mechero, flamear el medio de cultivo sobre la superficie de la caja de petri y de manera rápida. Se procede a tapar la caja. Esperar a que el medio solidifique.
  - Se rotulan los medios de cultivo, anotando la fecha y con iniciales el tipo de medio de cultivo. Si las placas no se van a utilizar el mismo día se sujetan con cinta y se colocan en el refrigerador de manera invertida para evitar que el vapor condensado caiga sobre el medio de cultivo y lo pueda contaminar.
  - Cuando se vayan a utilizar los medios de cultivo preparados, será necesario secar las placas invertidas en estufa a 37 °C por 24 h, para control de esterilidad.
8. Si se desea añadir medio sólido en tubos, entonces se esterilizará el Agar directamente en los tubos a 121 °C durante 15 minutos tapados con algodón, gasa y papel estraza. Si desea que solidifiquen inclinados, colocarlos en una superficie lisa inclinándolos en un ángulo de 20° a 30° sobre una varilla de vidrio.

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Beran, J. (2007). Laboratory manual for principles of general chemistry (9a. ed.). USA: John Wiley & Sons Inc.
- Medios de cultivo [en línea]. [Consulta: 22 de marzo de 2016]. Disponible en web:  
<https://es.scribd.com/doc/7788947/2/Agar-Nutritivo>  
<http://asignatura.us.es/mbclinica/docs/recursos/34/medios-de-cultivo.pdf>



# Guía de práctica N° 4

## Tinciones simples, diferenciales y especiales

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica)

- Diferencia e identifica a los microorganismos por su capacidad tintorial, morfología bacteriana y estructuras internas.

### 2. Fundamento Teórico

#### 2.1. COLORACION – GENERALIDADES

En general todas la bacterias vivas son prácticamente incoloras es decir no presenta suficiente contraste con el medio acuoso en que se encuentra; lo que dificulta su estudio cuando los exámenes se realizan en fresco por tal razón es necesario teñirlas para que produzcan un contraste con respecto al medio que se encuentra.

La manera más simple de aumentar el contraste entre la célula y el medio que la rodea es la utilización de colorantes. Es por ello, para distinguirlos del medio es necesario hacer una coloración (tinciones simples), las cuales también sirven para contrastar o realzar distintas características morfológicas o estructurales (tinciones diferenciales).

Ventajas de las técnicas de tinción:

- Permite diferenciar distintos tipos morfológicos de microorganismos.
- Establecer una información complementaria sobre sus estructuras internas y/o externas.
- Permite conocer sus características tintoriales orientandonos hacia un grupo taxonómico para la clasificación de las bacterias.

#### 2.2 TECNICA DE TINCION

Toda técnica de tinción requiere de los siguientes pasos:

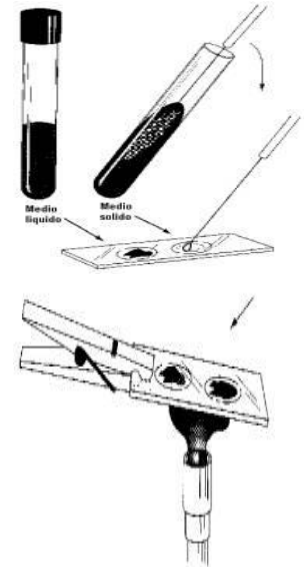
1. Realización de un frotis o extensión
2. Fijación
3. Coloración
4. Decoloración
5. Lavado.
6. Coloración de contraste.
7. Observación ala microscopio.

Para observar las bacterias teñidas es necesario, en primer lugar, hacer un frotis de las bacterias y luego fijarlo.

**Frotis o Extensión:**

Cuando se parte de un cultivo de bacterias en medio líquido, se toma una o varias cargas directamente con el asa y se extienden sobre el portaobjetos.

Si se parte de un cultivo en medio sólido, debe depositarse previamente una gota de agua sobre el portaobjetos. A continuación, se toma con el asa una pequeña parte de la colonia y se dispersa en la gota de agua, realizándose la extensión como en el caso anterior.



**Fijación:** Es el proceso en el cual las células, generalmente son tratadas para coagular el protoplasma antes de teñirlas. La fijación tiene por objeto:

- Preservar las estructuras celulares: Provocar modificaciones en la composición físico-química de la bacteria (coagulación de las proteínas, etc.) de forma que ésta conserve definitivamente una estructura celular similar a la que tenía en vivo, sin deformarse como consecuencia de los tratamientos a que se verá sometida durante la tinción.
- Impedir el arrastre de los microorganismos al quedar estos adheridos al portaobjetos
- Hacer que la pared celular sea más permeable a los colorantes.

La fijación produce generalmente el encogimiento de las células, en cambio, la tinción hace que las células aparezcan mayores de lo que son realmente, de manera que las medidas de las células que han sido fijadas o teñidas no pueden realizarse con mucha precisión.

La fijación se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos:

**Fijación por calor** es la más utilizada para la observación de bacterias y es la que emplearemos en la práctica. Este procedimiento consiste en que el frotis, una vez seco, se pasa dos o tres veces sobre la llama, con la preparación hacia arriba, para no quemarla. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos pero no las estructuras internas

Hay que procurar que el calor nunca sea excesivo, pues se alterarían las estructuras de la bacteria: en ningún momento el portaobjetos, colocado sobre el dorso de la mano, debe quemar.

**Fijación química** con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético y alcoholes entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares

**2.3 TIPOS DE TINCCIONES BACTERIANAS**

**2.3.1 TINCCION SIMPLE**

Utilizan un solo colorante. Se basan en el hecho de que las células tienen una composición química diferente a la de su entorno, de modo que ambos se comportan de forma diferente frente a un colorante. Los colorantes (azul de metileno ó safranina) tiñen las células. **Se caracteriza por:**

- Necesita fijación previa.
- Se utiliza un solo colorante y este debe ser básico (azul de metileno o safranina)
- Permite la visualización la concentración, morfología y el modo de agrupación bacteriana

**2.3.2 TINCCION NEGATIVA:**

Es un tipo de tinción simple pero con ciertas diferencias ya que nos permites observar características estructurales de la bacteria. Por otra parte, en la tinción negativa se utilizan compuestos que no penetran en las células sino que impregna el medio circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro. **Se caracteriza por:**

- No necesita fijación previa.
- Se utiliza un solo colorante.
- Nos permiten visualizar sobre un fondo oscuro la forma de la bacteria y alguna otra estructura como es la presencia de capsula.



### 2.3.3 TINCIONES DIFERENCIALES

Utilizan dos colorantes. Las tinciones **diferenciales** permiten diferenciar microorganismos con características superficiales distintas, por lo que requieren más de un colorante. Se basan en el hecho de que distintos tipos de células tienen distinta composición química, y por lo tanto reaccionan de forma diferente frente a una tinción, lo que permite clasificar los microorganismos en diferentes grupos, según su capacidad de tinción. Dentro de las tinciones diferenciales tenemos:

- A. Tinción de Gram
- B. Tinción ácido-alcohol resistencia (de Ziehl-Neelsen).

Las tinciones diferenciales presenta las siguientes características:

- Se necesita de fijación previa generalmente por calor.
- Se utilizan dos colorantes siendo el último colorante el de contraste.
- Nos permite visualizar su morfología y otras características como puede ser la composición de la pared bacteriana

#### A. TINCIÓN DE GRAM

Permite diferenciar los microorganismos en Gram (+) y Gram (-) lo cual reviste especial importancia taxonómica. La explicación de las diferencias en el comportamiento tintorial entre bacterias G(+) y G(-), debe buscarse en la estructura y composición de la pared celular bacteriana.

La pared de las bacterias Gram (+) está constituida fundamentalmente por una gruesa capa de peptidoglicano (20-30 nm). Las cadenas de peptidoglicano, se unen a través de puentes formados por aminoácidos, en arreglos que varían de una especie bacteriana a otra.

Es la tinción diferencial más utilizada en Bacteriología pues permite separar las bacterias en dos grandes grupos, las Gram-positivas (color azul o violetas) y las Gram-negativas (color rojo). La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:

1. **Primer colorante.** Es un colorante básico que en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente.** Fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, una solución diluida de yodo.
3. **Agente decolorante.** Es un disolvente orgánico, por ejemplo, alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste.** Es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, por ejemplo, la safranina. Los dos grupos bacterianos a los que anteriormente nos referíamos difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram positivas se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram negativas perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las bacterias Gram positivas poseen una malla de peptidoglicano en su parte más externa, mientras que las bacterias gram negativas, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.

#### B. COLORACIÓN DE MICROORGANISMOS ACIDOS RESISTENTES: TINCIÓN DE ZIEHL NEELSEN

La propiedad que presentan algunas bacterias de resistir la decoloración con ácidos fuertes después de ser coloreadas con solución de fucsina caliente, permite reunirlos bajo la denominación general de bacterias "ácido-resistentes" o "ácido-alcohol resistentes". La ácido-alcohol resistencia es la capacidad de incorporar ciertos colorantes y retenerlos después de someterlos a la acción de ácidos y alcohol y está determinada por la presencia en la pared celular de los ácidos micólicos que son ácidos grasos de cadenas ramificadas de alto peso molecular. Las micobacterias son bacilos ácido-alcohol resistentes, cortos, ligeramente curvos. El género *Mycobacterium*, incluido en esta clasificación, comprende especies patógenas para el hombre, animales y especies saprófitas.

### 2.4.4 COLORACIONES ESPECIALES, SELECTIVAS O ESTRUCTURALES

Se basan en el hecho de que distintas estructuras celulares tienen distinta composición química, de modo que se tiñen selectivamente con ciertos colorantes. Estas tinciones permiten observar estructuras especializadas que son útiles para la clasificación taxonómica de bacterias. Por ejemplo, la tinción de esporas, de flagelos, de corpúsculos metacromáticos.

Las tinciones estructurales presenta las siguientes características:



- Requieren fijación previa generalmente por calor
- Utilizan al menos dos colorantes.
- Nos permiten observar su morfología
- Nos permiten visualizar otras características de carácter estructural como son la presencia de esporas, flagelos, cilios, capsulas, etc.

Dentro de las funciones estructurales tenemos:

**A. COLORACIÓN DE ESPORAS: MÉTODO DE WIRTZ-CONKLIN**

Las esporas son estructuras bacterianas que se forman en condiciones adversas por parte de ciertas bacteria como pueden ser: del genero *Bacillus* y *Clostridium*.

Tales esporas son capaces de resistir situaciones muy desfavorables de allí su denominación de resistencia.

Las esporas se tiñen muy difícilmente, por la naturaleza y grosor de la membrana y bajo contenido en agua, por ello se hace actuar el tinte en caliente en idéntico procedimiento al efectuado para ÁCIDO-RESISTENTES. La coloración de contraste para el cuerpo bacteriano se consigue con Safranina.

Si el cultivo es joven no hay esporas y los microorganismos se teñirán uniformemente. Es necesario que éste permanezca por 3-4 días a temperatura ambiente, después de una incubación óptima de 24 horas o sembrar el cultivo en un medio específico de esporulación. De esta manera el material resulta ideal para ensayos de cualquiera de las técnicas específicas de tinción.

**B. COLORACIÓN DE CAPSULAS: MÉTODO DE TINCIÓN NEGATIVA**

Es el reverso del procedimiento de tinción usual: las células se dejan sin teñir pero se colorea un cambio el medio que las rodea. Lo que se ve, por tanto, es el perfil de las células. La sustancia utilizada para la tinción negativa es un material opaco que no tiene afinidad por los constituyentes celulares y que simplemente rodea las células, tal como la tinta china (que es una suspensión de partículas de carbono coloidal) o la nigrosina (un colorante negro insoluble en agua). La tinción negativa es un modo satisfactorio de aumentar el contraste de las células en microscopía óptica, pero su máxima utilidad está en revelar la presencia de cápsulas alrededor de las células bacterianas.

**C. COLORACIÓN DE FLAGELOS: MÉTODO DE LEIFSON**

Los flagelos son estructuras, cuyo diámetro no excede de los 30mm, lo cual está muy por debajo del poder de resolución del microscopio óptico. Para hacer visibles a los flagelos se requiere aumentar su grosor, para lo cual se emplea una suspensión de ácido tánico como mordiente que al precipitarse sobre su cubierta forman una capa que aumenta aparentemente su diámetro. Lo que propicia que al ser posteriormente coloreado, tanto los flagelos como su disposición con respecto al bacilo se hagan visibles al microscopista.

**D. COLORACIÓN DE CORPÚSCULOS METACROMÁTICOS: MÉTODO DE EPSTEIN**

Muchas bacterias acumulan en su protoplasma grandes reservas de fosfato insolubles en agua. Estos son los granulos metacromáticos o de volutina que aparecen como granulos refráctiles, cuando se observan al microscopio sin teñir. Con colorante de Azul de Toluidina u otros tintes azules, se tornan de color violáceo o ligeramente rojo violáceo; de ahí el nombre de metacromático.

Los bacilos diftéricos (*Corynebacterium diphtheriae*), y differoides poseen numerosos gránulos de este material; los primeros son agentes causantes de la difteria y sólo están presentes en casos agudos. Se pueden encontrar en muestras de saliva de humanos

**3. Equipos, Materiales y Reactivos**

**3.1. Equipos**

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Microscopio		1
3	Camara de Flujo Laminar		1
4	Incubadora		1
5	Mecheros bunsen		1

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Pinza de madera		1
2	Probeta graduada	50 ml	1
3	Varilla de vidrio		1
4	Vasos precipitado	500 ml	1
5	Tubos de ensayo	13x100	1
7	Gradillas		1
8	Botellas de vidrio de 250 mL		1
9	Pipetas serológicas		1
10	Varillas de vidrio		1
11	Laminas portaobjetos		1
12	Laminas cubreobjetos		6
13	Asas de siembra		6
14	Cultivo de Bacillus subtilis	24 horas	
15	Cultivo de E. coli	24 horas	

**3.3. Reactivos**

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Alcohol Etílico	Mezcla alcohol y agua	120ml
2	Fascos con azul de metileno	Solución diluida	1000 ml
3	Fascos con cristal violeta	Solución diluida	500g
4	Fascos con lugol	Solución diluida	500g
5	Fascos con alcohol acetona	Solución diluida	500g
6	Fascos con safranina	Solución diluida	500g
7	Fascos con verde de malaquita al 5%	Solución diluida	500g
8	Fascos con azul de metileno loeffler	Solución diluida	100 ml

**4. Indicaciones/instrucciones:**

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar
- 4.2 Las porta y cubre objetos son de vidrio y frágiles. Desechar los vidrios rotos en recipientes adecuadamente rotulados.
- 4.3 Los porta y cubre objetos usados deben desecharse en un recipiente con desinfectante.
- 4.4 Utilice siempre un soporte o pinza para sujetar los portaobjetos cuando se exponen al calor del mechero.
- 4.5 No sobrecalentar el portaobjetos porque se pueden quebrar y no tocar hasta que se enfríe.
- 4.6 Los colorantes Cristal Violeta, Safranina, y el yodo pueden causar irritación a los ojos, sistema respiratorio y piel.
- 4.7 Mantener los recipientes que contienen los colorantes bien cerrados para evitar accidentes.
- 4.8 Tener precaución al manejar el microscopio, al momento de enfocar la muestra podemos romper la laminilla al acercar el lente objetivo a la muestra.

**5. Procedimientos:****Primero: Preparación del frotis o extendido de la muestra**

1. Se limpia y desengrasa un portaobjetos, flameándolo suavemente.
2. Coloque la lámina sobre la mesa con el lado flameado hacia arriba.
3. Caliente el asa bacteriológica hasta el rojo vivo.
4. Ponga con el asa una gota de agua en el centro de la lámina, en el caso de que el cultivo sea líquido no hace falta este paso.
5. Flamee suavemente el asa, tome con la mano izquierda el tubo que contiene la cepa y remueva el tapón con el dedo meñique y borde cubital de la mano derecha.
6. Flamee el borde del tubo y retire una pequeña cantidad del cultivo.
7. Flamee nuevamente la boca del tubo y coloque el tapón de algodón. Regrese el tubo a la gradilla.
8. Emulsione el crecimiento en la gota de agua.
9. Extienda la suspensión en una capa delgada y uniforme, sin llegar a los bordes del portaobjetos.
10. Flamee nuevamente el asa y colóquela en su lugar.
11. Seque por calentamiento suave, sosteniendo la lámina a 20-30 cm sobre el mechero.
12. No deje que el líquido hierva.



**Segundo: Fijación del frotis o extendido**

1. Fije el extendido por pasajes rápidos (2-3 veces), por la parte superior de la llama del mechero. Para evitar el recalentamiento es conveniente tocar la piel del dorso de la mano con la lámina después de cada pasaje. (Esto evita que el extendido se desprenda durante el proceso de lavado y decoloración).

**Tercero: Realizar Tinciones: Simples, Diferenciales y Especiales****TINCION SIMPLE:****B) Coloración Simple con Azul de Metileno:**

1. Prepare un frotis, secarlo y fijarlo.
2. Cubrir con la solución de azul de metileno por un minuto
3. Lavar suavemente con agua corriente y deje secar al aire.
4. Enfoque la preparación con los objetivos de 10 X y 40 X y observe la preparación con objetivo de inmersión (100x) empleando el aceite de inmersión apropiado.

**B) Coloración Simple con Safranina:**

Repita los pasos anteriores (1 -4) con safranina.

Estas técnicas permite observar la morfología y tamaño de las bacterias, así como los tipos de agrupaciones que forman.



Figura 1. Tinción simple de *S.aureus*

**TINCIONES DIFERENCIALES****A) Tinción Gram****Materiales:**

1. Cultivo de bacterias de *E. coli* y *B. subtilis*.
2. Batería Gram: Cristal violeta, Fucsina Básica, Lugol, Alcohol acetona.
3. Laminas limpias, asas de siembra, lápiz grueso, gradillas.
4. Microscopio
5. Aceite de cedro. Papel lente. Solución desinfectante.

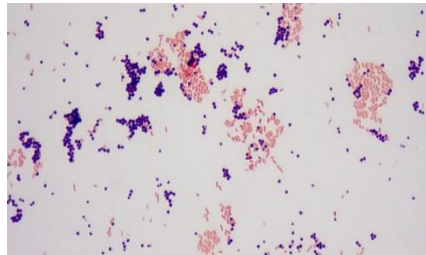
**Procedimiento:**

1. Se prepara el frotis de la bacteria, se seca y se fija al calor del mechero.
2. Se cubre con **cristal violeta** durante **60 segundos**.
3. Lavar suavemente con agua corriente para eliminar el exceso de colorante.
4. Añadir **lugol** por **30-60 segundos**. El lugol actúa como mordiente aumentando la afinidad del colorante por la bacteria.
5. Lavar con agua corriente el exceso de lugol.
6. Se gotea **alcohol-acetona** por **15 segundos** de forma continua hasta que la preparación deje de perder color
7. Lavar enseguida con agua abundante.
8. Se cubre la preparación con **safranina** por **60 segundos** (Safranina es colorante de contraste)
9. Se lava con agua y se seca al aire.
10. Observar a continuación con el objetivo de inmersión y con aceite de inmersión.

**Resultados:**

Bacterias Gram-positivas: Presentarán una coloración violeta

Bacterias Gram-negativas: Presentarán una coloración roja o rosa.



**Figura 2.** Tinción Gram, observar bacilos Gram negativos y cocos gram positivos

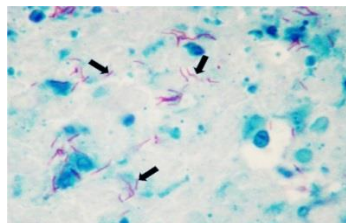
**B) Tinción de Ziehl Neelsen****Materiales:**

1. Muestra: Esputo de enfermos tuberculosos (*Mycobacterium tuberculosis*)
2. Bateria de coloración: Fucsina fenicada de Ziehl, Azul de metileno al 0,3%, alcohol ácido al 33%
3. Laminas limpias, asas de siembra, lápiz grueso, gradillas.
4. Microscopio, aceite de cedro, papel lente.

**Procedimiento:**

1. Realizar la extensión de la muestra y fijar al calor moderado del mechero.
2. Cubrir el extendido con **fucsina fenicada de Ziehl** y flamear por debajo del portaobjeto hasta el desprendimiento de vapores blancos (evitar que se produzca la ebullición por exceso de calor). Dejar enfriar 5 minutos. Repetir este proceso por 3 veces consecutivas. Finalmente dejar enfriar 5 minutos.
3. Lavar abundantemente con agua corriente.
4. Cubrir con el decolorante **alcohol-ácido** durante 10-20 segundos. . Realizar sucesivos lavados hasta que no se desprenda más colorante (aproximadamente 2 minutos; pero en el caso de preparados más gruesos, puede requerirse mayor tiempo).
5. Lavar con agua corriente
6. Teñir con el colorante de contraste **azul de metileno** durante 30 segundos.
7. Lavar con agua corriente durante 30 segundos.
8. Secar el extendido
9. Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X.

**Resultados:** Los bacilos de *Mycobacterium sp.* son los llamados "bacilos ácido-alcohol resistentes" (BAAR) aparecen de color rojo o fucsia sobre un fondo azul claro, mientras que los microorganismos no resistentes se teñirán de diferentes tonalidades de azul.



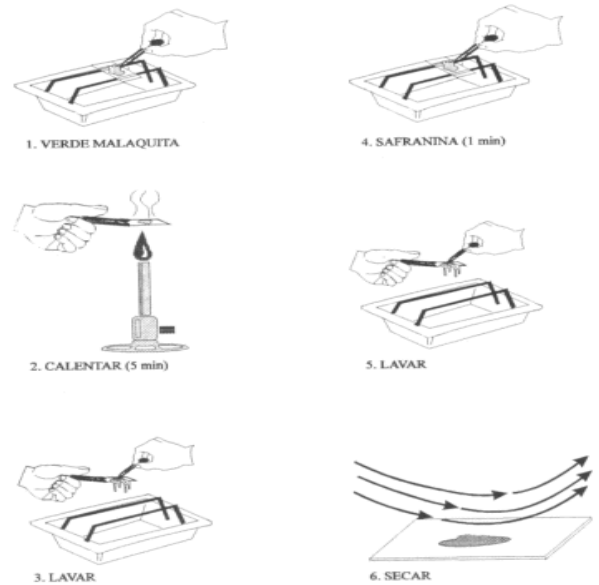
**Figura 2.** Tinción Gram, observar los BAAR color rojo

**TINCIONES ESPECIALES, SELECTIVAS O ESTRUCTURALES****A) Coloración de esporas: Método de Wirtz-Conklin****Material**

1. Cultivo sólido de 5 días de *Bacillus subtilis* ó *Bacillus cereus*
2. Bateria de coloración: Verde de malaquita al 5%, Safranina o Fucsina Básica al 0.5%, agua destilada o corriente.
3. Gradilla, lápiz grueso, asa de siembra.

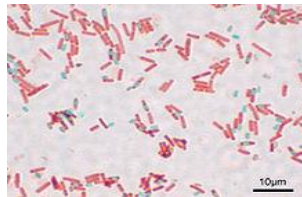
**Procedimiento**

1. Realizar la extensión de la muestra y fijar al calor moderado del mechero.
2. Cubrir con **Verde de Malaquita** por **1 minuto** dejarlo actuar a temperatura ambiente y para permitir que el colorante ingrese a la endospora: colocar la muestra encima de la llama del mechero hasta el desprendimiento de vapores blancos. Repetir este proceso por 3 veces consecutivas.  
*Nota:* evitar que la muestra hierva. Añadir más colorante si éste se evapora; es importante que la muestra no se seque
3. Dejar enfriar y lavar con abundante agua corriente el exceso de colorante
4. Añadir el colorante de contraste **Safranina o Fucsina Básica** por **1-2 minutos**.
5. Lavar con agua corriente.
6. Secar la preparación
7. Cubrir el extendido con una gota de aceite de inmersión y observar al microscopio óptico, con aumento 100X.



**Tinción de esporas**

**Resultados**-Esporas color verde intenso y el resto del cuerpo bacteriano color rojo. Posición de la espora central o subcentral, sin deformación del bacilo.



**Figura 3.** Tinción de esporas, observar esporas de color verde

**B) Coloración de Cápsulas: Método de Tinción Negativa**

**Materiales:**

1. Cultivos de 24 horas de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis* en agar-fosfato-triptosa inclinado.
2. Tinta china (recientemente filtrada).
3. Papel absorbente

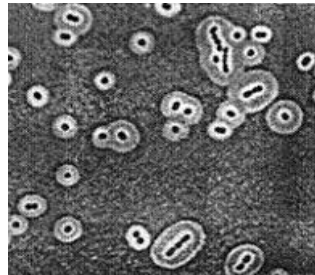
**Procedimiento:**

1. Prepare una suspensión diluida de *Klebsiella pneumoniae*, mezclando sobre el porta una colonia de la bacteria con unas gotas de agua destilada. Si la bacteria está en medio líquido, colocar una gota de este medio en un portaobjetos.
2. A esta suspensión diluida, añadir una gota de tinta china y mezclar suavemente sin extender la muestra. Después de mezclar bien la suspensión quedará de un gris oscuro.
3. Colocar suavemente un cubreobjetos sobre la suspensión de células con tinta china. Evitar que se formen burbujas.
4. Colocar los portaobjetos con los cubreobjetos entre dos papeles absorbentes.
5. Presionar con los dedos sobre el portaobjetos.
6. El exceso de suspensión será absorbido por los papeles.
7. Tirar el papel en un contenedor para material contaminado y lavarse las manos con jabón.



8. Observar al microscopio, con gran cuidado coloque una gota de aceite de inmersión sobre el cubreobjetos y examine la preparación con el objetivo de inmersión. Trabajar con el diafragma del condensador cerrado para aumentar el contraste de las células. Enfocar hasta que la célula se tome algo oscura.
9. Enfoque críticamente, encuentre un campo demostrativo y dibújelo.
10. Repita el mismo procedimiento ahora con *Staphylococcus epidermidis*

**Resultados:** Fondo negro, cuerpo bacteriano teñido de negro y cápsula incolora.



**Figura 4.** Cápsulas de neumococo observadas con tinción negativa (tinta china)

### C) Coloración de Flagelos: Método de Leifson

#### **Materiales:**

1. Cultivo joven y de alta motilidad de *Proteus vulgaris* (de 6 a 12 horas) y *Pseudomonas aeruginosa* sembrados en *Agar nutritivo + Gelatina al 2%*
2. Portaobjetos químicamente limpios (remojados 24 horas en ácido crómico y enjuagado con agua destilada). Estos se le distribuirán individualmente.
3. Colorante Leifson para flagelos (recientemente filtrados).
4. Agua destilada estéril
5. Pipeta estéril de 1 ml.
6. Pipeta Pasteur estéril
7. Aceite de cedro

#### **Requisitos a tener en cuenta:**

1. Los medios de cultivo empleado para el desarrollo de las cepas deben ser adecuados.
2. Los cultivos tienen que ser jóvenes.
3. Las láminas portaobjetos y cubreobjetos deben ser nuevas y estar escrupulosamente limpias sin el más mínimo vestigio de grasa: Sumergir en mezcla crómica durante 24 h, posteriormente lavar con agua destilada, enjuagar con alcohol y secar con un trozo de papel limpio. Finalmente desengrasar pasándolo por la flama varias veces)
4. Las láminas a emplear deben calentarse previamente y enfriarse a la temperatura corporal, para que los frotis se sequen con rapidez.

#### **Procedimiento:**

##### **Preparación de la suspensión bacteriana:**

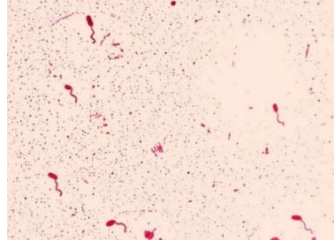
1. Agregar agua destilada estéril por las paredes del tubo sembrado con *Proteus vulgaris*, de tal manera que el agua entre en contacto con la superficie del cultivo. Y dejar aproximadamente 30 min con la finalidad de que la bacteria por medio de sus flagelos migre hacia el agua y la enturbie.
2. Luego introducir cuidadosamente una pipeta pasteur estéril, y tomar una suspensión bacteriana (dejar que la suspensión suba por capilaridad) de la región más superficial de la suspensión acuosa de *Proteus vulgaris* (aquí se encontrarán los organismos con más motilidad)
3. Sacar la pipeta pasteur suavemente y colocar una gota del germen en el extremo de un portaobjetos.



**Coloración de Flagelos:**

1. Coloque sobre la mesa de trabajo 3 láminas portaobjetos limpias y acabadas de calentar.
2. Deposite una gota grande de una suspensión bacteriana joven, procedente de un cultivo líquido o del agua de condensación de un cultivo sólido, casi al extremo de cada una de las tres láminas
3. Inclíne el portaobjetos suavemente unos 30-40 grados para que la gota de suspensión corra hasta el extremo opuesto del rectángulo. (no extender con asa). Si el porta está meticulosamente limpio, la gota se deslizará en línea recta por el vidrio.
4. Espere a que las láminas se sequen al aire y en posición inclinada. No fijar a la llama del mechero ya que esta operación puede destruir los flagelos.
5. Eche sobre cada lámina portaobjetos 1mL del colorante de Leifson y déjelo actuar con un tiempo diferente para cada preparación. Una de las láminas por espacio de 8 minutos, la segunda por espacio de 10 minutos y la tercera 15 minutos. Dejar secar a temperatura ambiente.
6. Elimine el exceso de colorante y lave muy suavemente con agua corriente.
7. Secar al aire.
8. Observar al microscopio, con con el objetivo de inmersión. Busque un campo donde puedan apreciarse claramente organismos flagelados

**Resultados:** Se observarán flagelos como finos filamentos de color rojo.



**Figura 5:** Tinción de Leyfson para evidenciar el flagelo en *Vibrio cholerae*

**D) Coloración de Corpúsculos Metacromáticos: Método de Epstein**

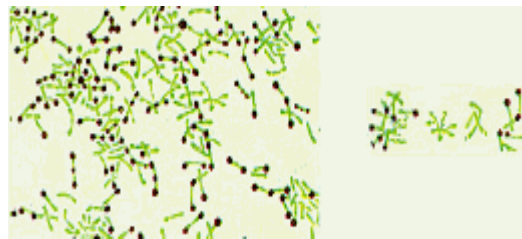
**Material**

1. Muestra de saliva de los alumnos. (*El género Corynebacterium está presente en la saliva y presenta éstos corpúsculos metacromáticos*)
2. Solución colorante de Azul de Metileno de Loeffler.
3. Agua corriente.
4. Láminas limpias, asa de siembra, lápiz graso.
5. Microscopio, aceite de cedro.

**Procedimiento**

1. Extender la muestra (colocar agua destilada en el porta y luego suspender la bacteria)
2. Fijar la muestra al calor del mechero
3. Colorear con el **Azul de Metileno de Loeffler** por 3-5 minutos.
4. Lavar con agua corriente.
5. Secar
6. Observar con el objetivo de inmersión.

**Resultados:** Bacilos difteroides, largos y ligeramente gruesos de color azul claro, con granulaciones de color azul intenso o violeta. En caso de coloración purpúrea (violeta), el color se debe a la oxidación del colorante por el álcali que lleva la fórmula.



**Figura 6.** Tinción de Epstein para evidenciar corpúsculos metacromáticos en *Corynebacterium diphtheriae* (Los corpúsculos se observa en forma de letras chinas, empalizada o en V)

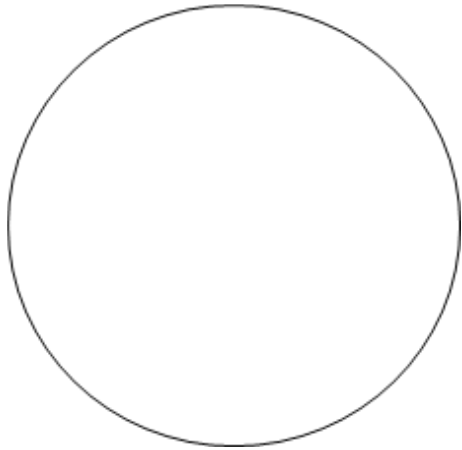
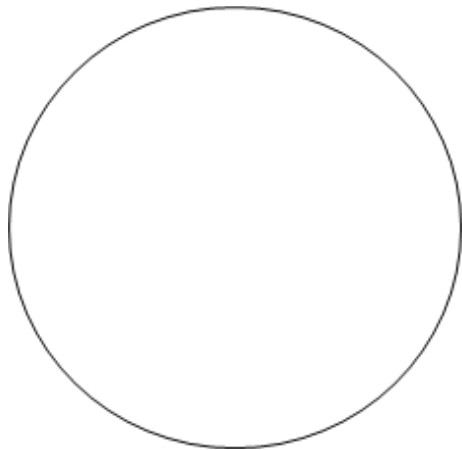
**6. Resultados**

Completar el siguiente cuadro, de acuerdo con las tinciones realizadas en clase:

MORFOLOGÍA, ESTRUCTURAS Y CORPÚSCULOS	MÉTODOS	TIPO DE TINCIÓN	OBSERVACIONES
Esporas	Wirtz-Conklin	Estructural	Para la observación de esporas, es necesario que el cultivo tenga 3 -5 días
Cápsula	Tinción negativa		
Flagelos			
Corpúsculos Metacromáticos.			
Formas de Agrupación			
Diferencia entre Gram (+) y Gram (-)			



Completar de acuerdo a las observaciones microscópicas realizadas en clase:

	
<b>Genero/ Especie:</b> <b>Aumento:</b> <b>Tinción:</b> <b>Forma celular:</b> <b>Forma de agrupación:</b> <b>Color celular:</b> <b>Otras observaciones:</b>	<b>Genero/ Especie:</b> <b>Aumento:</b> <b>Tinción:</b> <b>Forma celular:</b> <b>Forma de agrupación:</b> <b>Color celular:</b> <b>Otras observaciones:</b>

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)



# Guía de práctica N° 5

## Cultivo de microorganismos

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Aísla colonias bacterianas por los métodos de estriado, diseminación y difusión y describe sus características morfológicas.

### 2. Fundamento Teórico

#### 2.1 Cultivo de microorganismos

En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando **poblaciones mixtas** con otros tipos de microorganismos. Los cultivos de estas mezclas se llaman por ello **cultivos mixtos**. Sin embargo, el conocimiento de los microorganismos se consigue mediante el estudio de cepas aisladas, cultivadas en el laboratorio en **cultivos puros** o **axénicos**.

La identificación bacteriana y la caracterización completa solo es posible tras el aislamiento de la bacteria y la obtención de cultivos puros. Por ello el primer problema al estudiar una bacteria es su aislamiento del resto de los microorganismos presentes (en una muestra patológica, de agua, de suelo, de alimentos, etc.). Una vez que se ha logrado el aislamiento es posible obtener la bacteria de interés en **cultivo puro**.

#### 2.2 Siembra y Aislamiento de microorganismos

En esta etapa el alumno inicia el aprendizaje e interpretación de los cultivos bacterianos. Gracias a la aplicación de los medios de cultivo, se ha llegado a conocer ampliamente el comportamiento cultural y fisiológico de la variada flora microbiana que pulula en los ambientes, permitiéndose la identificación específica. Para ello es necesario considerar la metodología que conduzca a la exacta determinación de la especie en el laboratorio.

**Concepto de Siembra:** acondicionamiento de un microorganismo en un medio de cultivo, de acuerdo a sus exigencias vitales, para que en condiciones óptimas de temperatura y tiempo de incubación, pueda desarrollar y multiplicarse *in vitro*. Se siembra con 2 finalidades: a) para hacer un aislamiento y b) para hacer un trasplante.

**Aislamiento:** permite la separación de microorganismos al estado de pureza a partir de una MUESTRA PROBLEMA. Se requiere un medio sólido con gran superficie para que los microorganismos al ser diseminados sobre el medio, generen su progenie formando colonias separadas. Si se aíslan colonias distintas, cada colonia tendrá caracteres especiales. La morfología bacteriana será también distintiva.

**Trasplante:** significa la separación primaria de la cepa a un medio de cultivo apropiado en tubo, que puede ser líquido o sólido. Se conserva la cepa pura y por tanto trasplantes en medios especiales, se logran conocer las propiedades culturales y bioquímicas y como resultado, la identificación específica.

#### 2.3 Aislamiento de bacterias aerobias en placa petri

Todo aislamiento implica el agotamiento de una muestra sobre la superficie del medio sólido. Se va descargando gradualmente el inóculo, para que en los últimos planos o cuadrantes del medio de cultivo queden escasas células que en el ambiente nutricional, se irán multiplicando logarítmicamente hasta formar colonias puras.

Los métodos de aislamiento varían según el dispositivo de siembra y la forma de distribuir el inóculo. Cualquiera que sea el método ensayado, aprovechando el máximo de superficie del medio, se logra el aislamiento del mayor número de cepas microbianas.



### 2.3.1 Métodos de Aislamiento en Placa

#### A.- Aislamiento por el método de estriado

El método de estrías en placa es el procedimiento clásico para aislar cepas de bacterias. Este método consiste en la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan.

**Estriar** para aislar implica una sola inoculación de una sección de la placa de Petri y a continuación, disminuir la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial a dos o tres secciones adicionales, achicando eficazmente la población de microorganismos. Generalmente es utilizado para separar un cultivo mixto de bacterias

**a) Estría Simple:** Esta técnica es ampliamente utilizado para la visualización de ciertas propiedades metabólicas tales como la producción de enzimas hidrolíticas (a través de la hidrólisis de las sustancias - yema de huevo, sangre) y la producción de pigmento.

**Técnica 1:** Transferir una asada al medio sólido de placa de cultivo y estriar en forma de zig-zag en toda la placa.

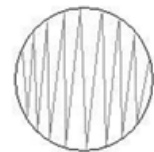


Figura 1. Estría simple

**Técnica 2:** Se divide la placa Petri por la mitad. Colocamos el inóculo en el extremo de la placa y sembramos en forma de zigzag decreciente, luego se esteriliza el asa al mechero. Nuevamente tomamos el inóculo y lo sembramos de la misma manera en la otra mitad de la placa. Se puede diferenciar la forma y el color de colonias.



Figura 2. Estría simple

#### b) Estriar para aislar

Estriar para aislar implica una sola inoculación de una sección de la placa de Petri y a continuación, disminuir la colonia arrastrando microorganismos de la sección inicial de dos o tres secciones adicionales, achicando eficazmente la población de microorganismos. Generalmente utilizado para separar un cultivo mixto de las bacterias, los bacteriólogos también utilizan este método para aislar una línea de bacterias que nacen de un solo progenitor

**Estría en T:** Se dibuja una T en la placa y se procede a estriar en 3 cuadrantes (A, B, C)

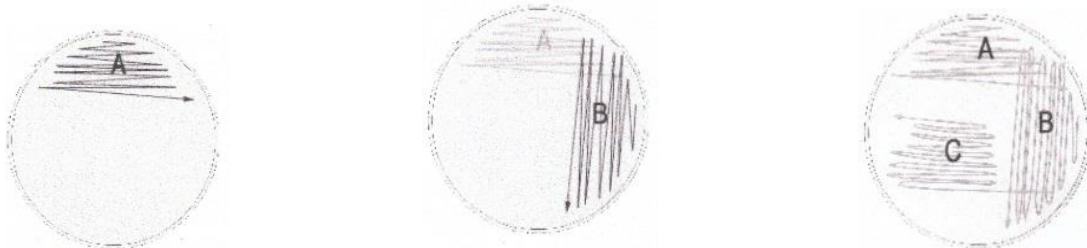


Figura 3. Estría en T

#### c) Estriado por agotamiento sobre cuatro cuadrantes

Este es también un método de estriado para el aislamiento, pero utiliza cuatro secciones en lugar de tres. Divide la placa de Petri en cuatro partes iguales con un marcador permanente. Consiste en sembrar uno a uno los cuadrantes, sin flamear el asa entre estría y estría, de tal forma que en el cuarto cuadrante, al ir agotando la muestra del asa, tendremos los microorganismos aislados. **Objetivo:** obtener colonias aisladas.

Es importante no volver a repasar el cuadrante que ya hemos sembrado. Para conseguir que al final de la estría tengamos colonias aisladas

Es importante no cruzar las estrías (no tocar con el asa la estría anterior) para reducir el inóculo a cada estría y obtener colonias aisladas. Puede, alternativamente, flamear el asa al terminar cada cuadrante y tocar la punta del asa la última estría anterior para arrastrando un pequeño inóculo a la siguiente estría.

También es importante que en los primeros cuadrantes hagamos la estría más junta y que la cantidad de muestra tomada en el asa sea la adecuada, y que en los últimos dos cuadrantes hagamos las estrías más separadas.

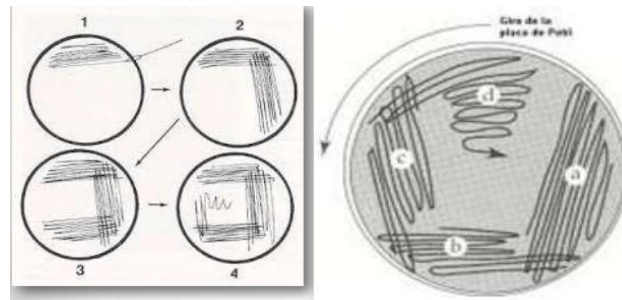


Figura 4. Estriado por agotamiento sobre cuatro cuadrantes

**B.- Aislamiento por diseminación**

El método de **aislamiento por diseminación** en placa es un procedimiento en el cual el investigador coloca una muestra diluida sobre una superficie de agar estéril en una placa de Petri, y disemina uniformemente la mezcla diluida de células sobre una superficie de agar, utilizando una varilla doblada de vidrio (Asa de Digrafsky), esterilizada. Los cultivos son incubados por un periodo de tiempo específico. Y posteriormente, en el medio sólido aparece un crecimiento macroscópicamente visible esto se debe a que cada célula forma una colonia separada, por lo tanto cada colonia representa un cultivo puro. Luego de que las colonias han crecido, son contadas y se calcula el número de bacterias en la muestra original.

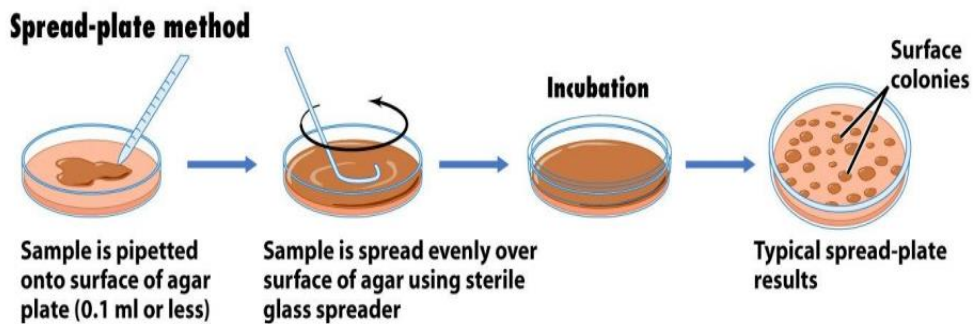


Figura 5. Técnica de aislamiento de diseminación

**C.- Aislamiento por Difusión**

El procedimiento de **placa vertida** se utiliza extensivamente con bacterias y hongos y también puede producir colonias aisladas. Se prepara una muestra bacteriológica diluida. El investigador introduce una pequeña cantidad de muestra dentro de una placa petri vacía. Se vierte agar derretido o fundido dentro de la placa petri que contiene la muestra. El agar y la muestra se mezclan meticulosamente al tapar la placa y realizar giros suaves sobre la mesa. Se le da tiempo para que el agar se vuelva gel mientras se asienta sobre la superficie plana. Finalmente, las placas se invierten y se dejan incubar por un periodo de tiempo específico. Las colonias son luego observadas y contadas, y se registra la información.

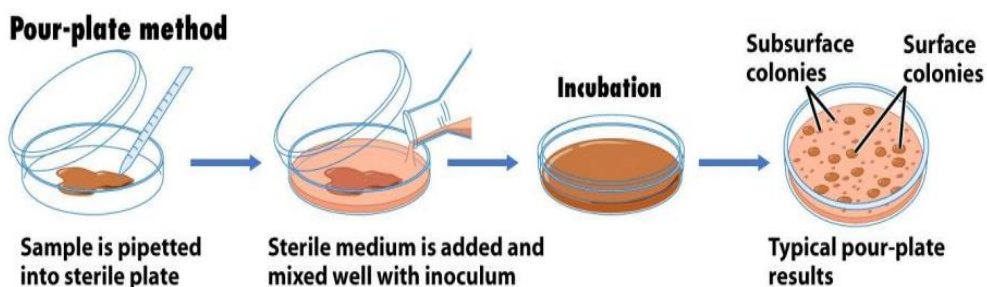


Figura 6. Técnica de aislamiento por difusión

**2.4 Criterios para la diferenciación de colonias**

El aspecto de las colonias, su coloración, tamaño, etc. permiten diferenciar diferentes bacterias, aunque son propiedades generales muy influenciadas por las condiciones de cultivo, por lo que a continuación se realiza una descripción muy general. Las colonias pueden ser opacas, translucidas o transparentes. Algunas producen pigmentos fluorescentes cuando se iluminan con luz ultravioleta. Otras aparecen con superficie pulverulenta, otras son lisas, o rugosas, o poseen anillos concéntricos. En ocasiones el olor es también característico.

**2.4.1 Estudio de la morfología de la colonia**

Cuando se cultivan los microorganismos sobre medios de cultivo sólidos, las células aisladas se multiplican sucesivamente hasta dar un crecimiento visible conocido con el nombre de **colonia**, las características de estas colonias son estudiadas y se usan en la identificación de las especies.

Las características que se le estudian a las colonias son: Forma, elevación, margen, superficie, color

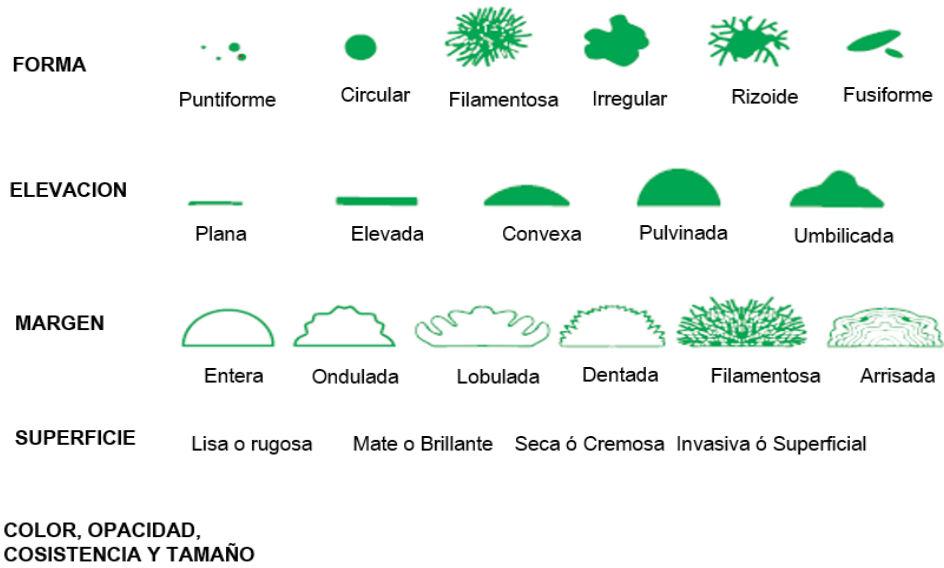


Figura 7. Morfología de colonias bacterianas

**3. Equipos, Materiales y Reactivos**

**3.1. Equipos**

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Mecheros Bunsen		1
3	Balanzas		1
4	Cocina eléctrica		1
5	Rejilla de Asbesto		1

**3.2. Materiales**

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mecheros de alcohol		1
2	Asas bacteriológicas		1
3	Espátulas o cucharitas		1
4	Gradillas		1
5	Botellas con 100 ml de alcohol para desinfección		1
7	Pizetas con agua destilada		1
8	Vaso de precipitación	100 ml	1
9	Asas de Digraskly		1
10	Tubos de ensayo con Agua destilada estéril		1
11	Erlenmeyer con 90 ml de agua destilada esteril	100 ml	1
12	Placa Petri estéril vacía		1
13	Placa Petri con Agar Nutritivo		1
14	Laminas		3
15	Laminillas		3
16	<b>Pinza de madera para tubos</b>		1

**3.3. Reactivos**

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Goteros con Aceite de inmersión		1
2	Goteros con Azul de metileno		1

**4. Indicaciones/instrucciones:**

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 No colocar la pipeta en la mesa; utilizar un portapipeta.
- 4.4 Si la pipeta está contaminada, colóquelo inmediatamente en el recipiente apropiado.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y bucles y agujas inoculantes al rojo vivo.
- 4.6 Mantener el vaso de alcohol étílico fuera del mechero Bunsen, ya que el alcohol es inflamable.

**5. Procedimientos:****Primero: Precauciones antes de realizar el aislamiento**

1. Limpiar con alcohol la mesa de trabajo.
2. Desinfectarse las manos con alcohol para eliminar las bacterias de nuestras manos y así no contaminar los medios de cultivo.
3. Conectar 3 mecheros a las llaves del gas y prenderlos, regularizando en oxígeno.
4. Esterilizar el asa hasta que obtenga un color rojo vivo, dejarlo enfriar en un extremo del agar.
5. Tomar una gota de la muestra y comenzar el estriado. Evitar destapar completamente la tapa de los medios de cultivo para evitar contaminación.
6. Repetir el proceso según la técnica de estriado que se utilice, girando la caja y esterilizando el asa cada vez que se gire la caja, sin tomar muestra.
7. La técnica general de siembra dependerá de:
  - a) Estado físico del material a sembrar (sólido o líquido)
  - b) Estado físico del medio de cultivo (agar o caldo)
  - c) Ambiente en el cual crece el microorganismo (aerobiosis, microaerofilia o anaerobiosis)

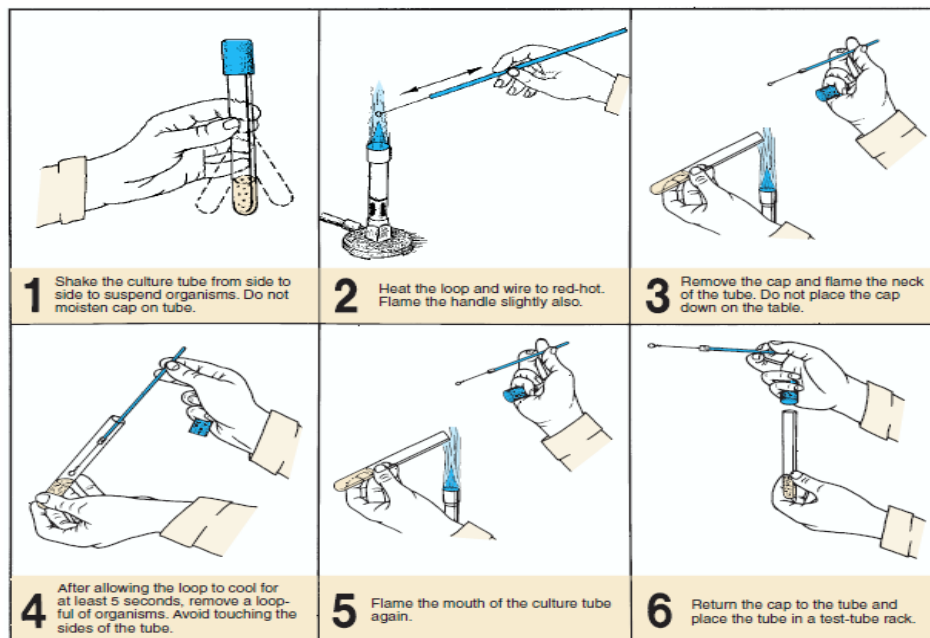
**Segundo: Aislar bacterias usando los tres métodos de aislamiento en placa**

**A) Aislamiento por el método de estriado: Aplicar el método de Estriado por agotamiento sobre cuatro cuadrantes.**

1. Agitar el tubo que contiene la muestra problema
2. Con la mano derecha, calentar el asa de siembra en aro al rojo vivo.
3. Con la mano izquierda sostener el tubo que contiene muestra problema; destapar el cultivo con el dedo meñique y margen cubital de la mano derecha. Flamear la boca del tubo.
4. Después de enfriar el asa de siembra durante 5 segundos, retirar los microorganismos del tubo de la muestra problema con el asa de siembra. Evitar tocar las paredes del tubo.
5. Flamear nuevamente la boca del tubo.
6. Tapar el tubo y colocarlo en la gradilla.
7. Nuevamente, tomar con la mano izquierda la placa Petri con agar, descansando la base sobre los dedos medio, anular y meñique; el índice actúa de bisagra y con el pulgar, levantar la tapa lo suficiente para el paso del asa cargada. Esta operación se realiza a la altura del mechero encendido.  
 Descargar el inoculo con el asa de siembra en un punto marginal de la superficie del medio y con el asa misma, realizar las estriado utilizando el método **estriado por agotamiento sobre cuatro cuadrantes**: Con el asa de siembra se distribuye el inoculo varias veces con estrías en forma de ZIGZAG ó en S, con escasa separación unas de otras (1-3 mm) en el cuadrante 1. Repetir el mismo procedimiento para los cuadrantes 2,3 y 4. No flamear el asa entre estría y estría, de tal forma que en el cuarto cuadrante, al ir agotando la muestra del asa, tendremos los microorganismos aislados. (Figura 9) Luego tapar la placa, dejando caer suavemente la tapa con el control de los dedos pulgar e índice
8. Finalmente flamear nuevamente el asa (Ver los pasos 1 -8 , en la Figura 8 )
9. Rotular datos sobre el dorso de la placa Petri sembrada así: número de grupo, tipo de siembra y fecha.
10. Colocar las placas en la estufa en posición invertida e incubar a 37°C por 24 h. Mediante la incubación de las placas de manera invertida, el problema de la humedad en la cubierta se reduce al mínimo.

**Resultados:**

A las 24 h, evaluar y observar colonias aisladas en la placa. Reportar en el informe de Laboratorio las características morfológicas de las colonias aisladas según la Figura 12



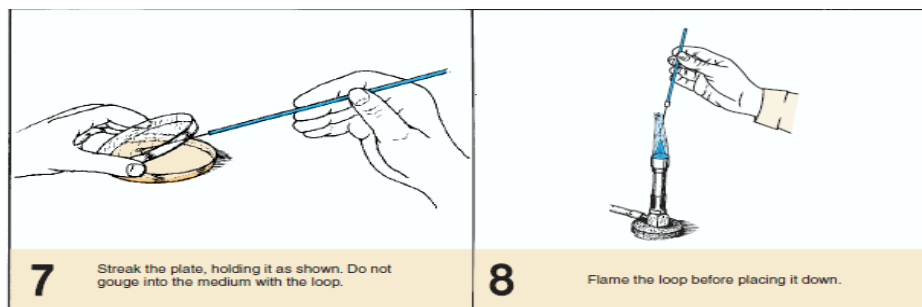


Figure 21.3 Routine for inoculating a Petri plate

Figura 8. Rutina para inocular una placa petri

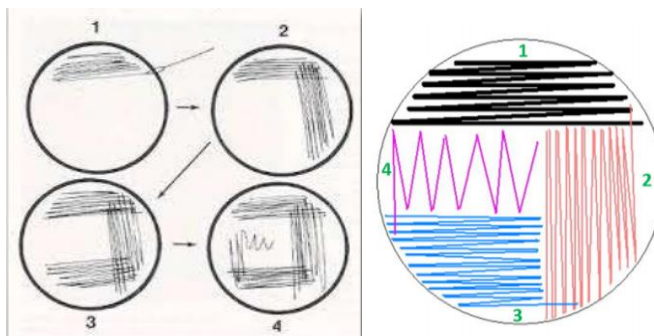


Figura 9. Método de estriado por agotamiento sobre cuatro cuadrantes

**Recomendaciones para el método de estriado por agotamiento:**

- Es importante no volver a repasar el cuadrante que ya hemos sembrado (a excepción del primer cuadrante). Para conseguir que al final de la estría tengamos colonias aisladas
- Es importante no cruzar las estrías (no tocar con el asa la estría anterior) para reducir el inóculo a cada estría y obtener colonias aisladas. Puede, alternativamente, flamear el asa al terminar cada cuadrante y tocar la punta del asa la última estría anterior para ir arrastrando un pequeño inóculo a la siguiente estría.
- También es importante que en los primeros cuadrantes hagamos la estría más junta y en los últimos dos cuadrantes hagamos las estrías más separadas

**B. Aislamiento por diseminación**

1. Tomar el inóculo de la muestra problema con la pipeta
2. Depositar una 0.1 ml sobre el medio de la placa Petri, que descansa en posición normal sobre la mesa.
3. Sumergir el asa de Digralsky en alcohol y flamear al mechero
4. Destapar con la izquierda la placa Petri, lo necesario para introducir la espátula de Digralsky previamente esterilizada.
5. Diseminar la gota por la superficie del medio.
6. Desechar la espátula en el frasco bactericida, o flamear en el mechero.
7. Rotular: número de grupo, tipo de siembra y fecha.
8. Incubar igual a los métodos anteriores.

**Nota:** En caso de cultivo muy turbio, el inóculo debe ser muy pequeño. Si está diluido, inocular en el medio más de una gota.

**Resultados:**

A las 24 h, evaluar y observar colonias aisladas en la placa. Reportar en el informe de Laboratorio las características morfológicas de las colonias aisladas según la **Figura 12**

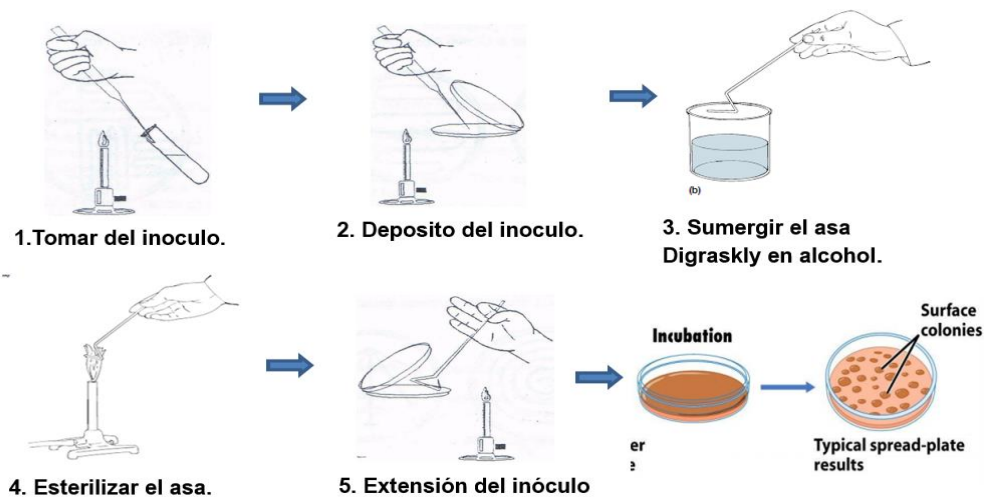


Figura 10. Método de aislamiento por diseminación

**C. Aislamiento por Difusión**

1. Tome una pipeta estéril y transferir 1 ml de la muestra problema a un tubo con 90 mL de ADE (Tubo 1)
2. La muestra problema es diluida primero al 1/10, 1/100, 1/1000, etc. de acuerdo a la turbiedad.
3. Se toman alícuotas (1ml) de cada dilución
4. Se depositan separadamente en placas Petri vacías y estériles.
5. Sobre cada una de las placas se vierte agar fundido (10-15 ml) y enfriado a 45°C. La mezcla se agita moderadamente con movimientos ondulantes. De esta forma los microorganismos se distribuirán de forma homogénea en el medio de cultivo, permitiendo el desarrollo de colonias separadas por todo el agar.
6. Se espera a que el medio solidifique, se rotulan los datos y se incuban las placas en posición invertida, a 37°C. Las placas de cultivo para incubación se colocan invertidas para evitar que el agua de condensación de la cara interna de la tapa humedezca la superficie. Se asegura el crecimiento de colonias aisladas.
7. A las 24 horas aparecerán colonias aisladas en superficie y profundidad, a diferentes planos. Estas últimas, de forma lenticular y de diámetros diversos. Los cálculos matemáticos de las cuentas es motivo de otra práctica.

**Resultados:**

A las 24 h, evaluar y observar colonias aisladas en la placa. Reportar en el informe de Laboratorio las características morfológicas de las colonias aisladas según la **Figura 12**

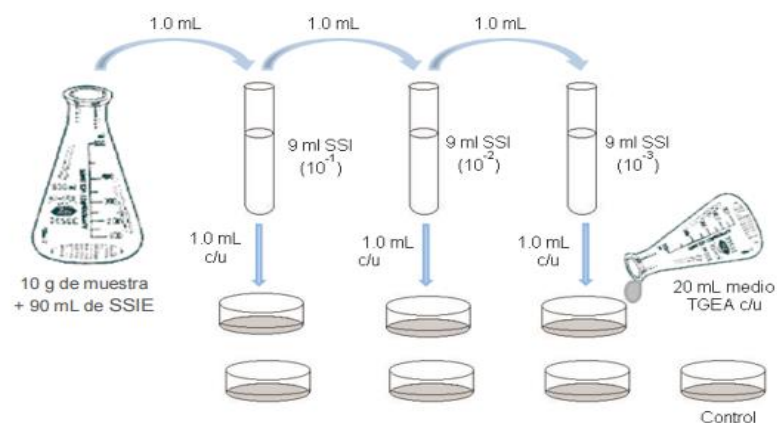


Figura 11. Método de aislamiento por difusión

**Tercero: Estudio de la morfología de la colonia**

Registrar las características morfológicas de las colonias (Forma, Elevación, Borde, Superficie, Pigmentación, Apariencia general, Tamaño) después de realizar los 3 métodos de aislamiento y registrar lo siguiente:

- **FORMA:** Puntiforme, circular, irregular, alargada, fusiforme, filamentosa, rizoide.
- **ELEVACION:** Aplanada, elevada, pulvinada, convexa, umbonada, umbilicada.
- **BORDE:** Continuo, ondulado, lobulado, erosionado, festoneado, filamentoso.
- **SUPERFICIE:** Lisa, rugosa, cerebriforme, en anillos concéntricos, etc.
- **COLOR:** Según sea observado por la luz reflejada o por la luz transmitida, puede ser de color blanco, amarillo, rojo ladrillo, anaranjado, etc.
- **OPACIDAD:** Transparente, opaca, etc.
- **CONSISTENCIA:** Dura, viscosa, membranosa, gelatinosa, mucosa, etc. Usar el asa bacteriológica para determinar la consistencia.
- **TAMAÑO:** Estimar el diámetro en mm.

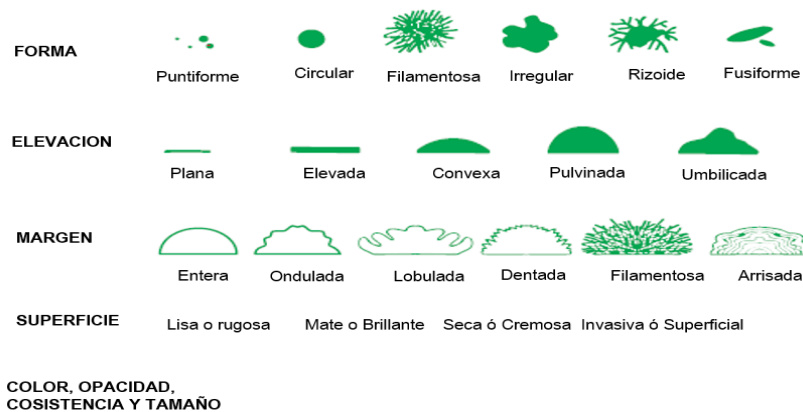


Figura 12. Características morfológicas de colonias bacterianas

**6. Resultados**

- .....  
.....  
.....
- .....  
.....  
.....
- .....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y/o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....





**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Siembra y aislamiento. [en line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
<https://conalepfelxtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>  
<http://www.biomedicinapadrao.com.br/2012/09/tecnicas-de-semeadura.html>



# Guía de práctica N° 6

## Crecimiento microbiano y enumeración de microorganismos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Aplica las técnicas de recuento bacteriano para la cuantificación de los microorganismos y analiza los resultados obtenidos según el tipo de microorganismo y sus necesidades nutricionales.

### 2. Fundamento Teórico

El crecimiento de los microorganismos ocurre generalmente por medio de la división celular. Durante el ciclo de división celular, todos los componentes de la célula se duplican. El intervalo para la formación de dos células a partir de una se llama **generación** y el tiempo requerido para que esto ocurra se llama **tiempo de generación**.

Los microbios se desarrollan principalmente como poblaciones de células y es importante distinguir entre el crecimiento de una célula individual y el crecimiento de una población. Una población microbiana presenta generalmente un patrón de crecimiento característico cuando se inocula en un medio de cultivo fresco. Hay una fase de retraso inicial (**fase lag**) mientras las células se ajustan a las nuevas condiciones y entonces el crecimiento toma la **forma exponencial**. A medida que los nutrientes indispensables se agotan, o se forman productos tóxicos, cesa el crecimiento y la población entra en **fase estacionaria**. Si la incubación continúa en la fase estacionaria, las células pueden empezar a morir y se dice que la población está en la **fase de muerte**.

Es por ello que en diversos estudios microbiológicos (como análisis de alimentos, de agua de bebida, de productos farmacéuticos o del medioambiente entre otros), se requiere conocer el número de microorganismos presentes en un material. El procedimiento es esencialmente el mismo que para la medida del crecimiento de las poblaciones de bacterias. El crecimiento de poblaciones microbianas puede determinarse mediante diferentes métodos para determinar el **número de microorganismos** o medir la **masa total celular**.

#### Métodos de evaluación del crecimiento

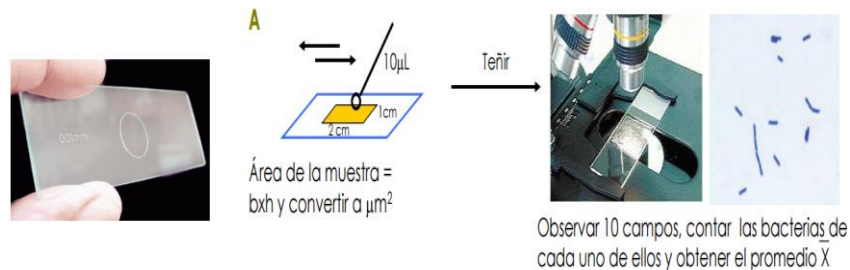
##### 1) Número de microorganismos.

##### 1.1 Método Directos

- Se determina el **número total** de células presentes (**viabiles y no viabiles**) en una muestra.
- Estos métodos utilizan generalmente cámaras de recuentos, aunque también pueden realizarse a partir de muestras filtradas en membranas.
- Este método permite determinar el número de células microbianas, por observación a través del microscopio. Se basa en contar microorganismos en una cantidad conocida y pequeña de muestra utilizando frotis coloreados o cámaras de recuento como de Neubauer.
- Son técnicas comunes, rápidas y baratas que utiliza un equipamiento fácilmente disponible en un laboratorio de microbiología.
- La muestra puede utilizarse sin diluir (leche, o cultivos puros en medio líquido), o puede prepararse una dilución tal como se realiza para otros métodos de recuento.

a) **Método de Breed:** es una técnica de laboratorio que se utiliza para el recuento de microorganismos en la leche.

Consiste en que un volumen conocido de la muestra (0.01 ml) se extiende sobre un portaobjetos normal en una superficie conocida. Se examina en un microscopio calibrado, donde se conoce el diámetro del campo del microscopio.



b) **Contador electrónico:**

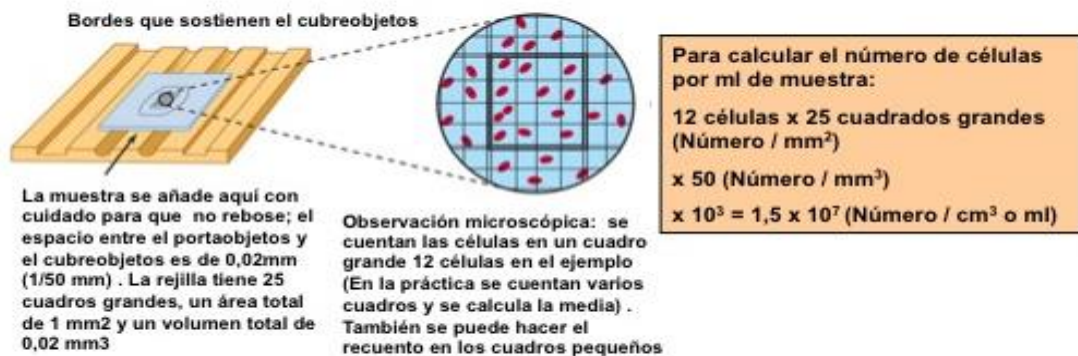
Se utiliza el contador Coulter recuenta el número de células suspendidas en un líquido, a su paso por un orificio por donde fluye la corriente eléctrica. Se puede determinar a su vez el tamaño de las células pero tampoco distingue entre viables, muertas o partículas. Este contador ofrece resultados precisos con células grandes y es usado ampliamente para el recuento de leucocitos y eritrocitos pero no es eficaz para el conteo de bacterias debido a la interferencia con partículas pequeñas.

Los contadores electrónicos permiten realizar recuentos de bacterias, levaduras no filamentosas y protozoarios, pero no de hongos y microorganismos filamentosos o miceliares.

c) **Camara de Petroff-Hauser:**

Son portaobjetos excavados modificados sobre cuya superficie está marcada una rejilla con pequeños cuadrados de área conocida. Se utilizan para contar el número de células por unidad de volumen de suspensiones bacterianas. Para trabajar se cubre con un portaobjetos y por capilaridad se introduce la muestra

La de Petroff – Hauser se utiliza para contar bacterias. La excavación mide 0,02 mm de profundidad y está dividida en 25 cuadros grandes, subdivididos a su vez en 16 pequeños (hay 400 celdillas en  $1\text{mm}^2$ )



Para el recuento de levaduras se utiliza la cámara de Thoma

d) **Camara de Neubauer:**

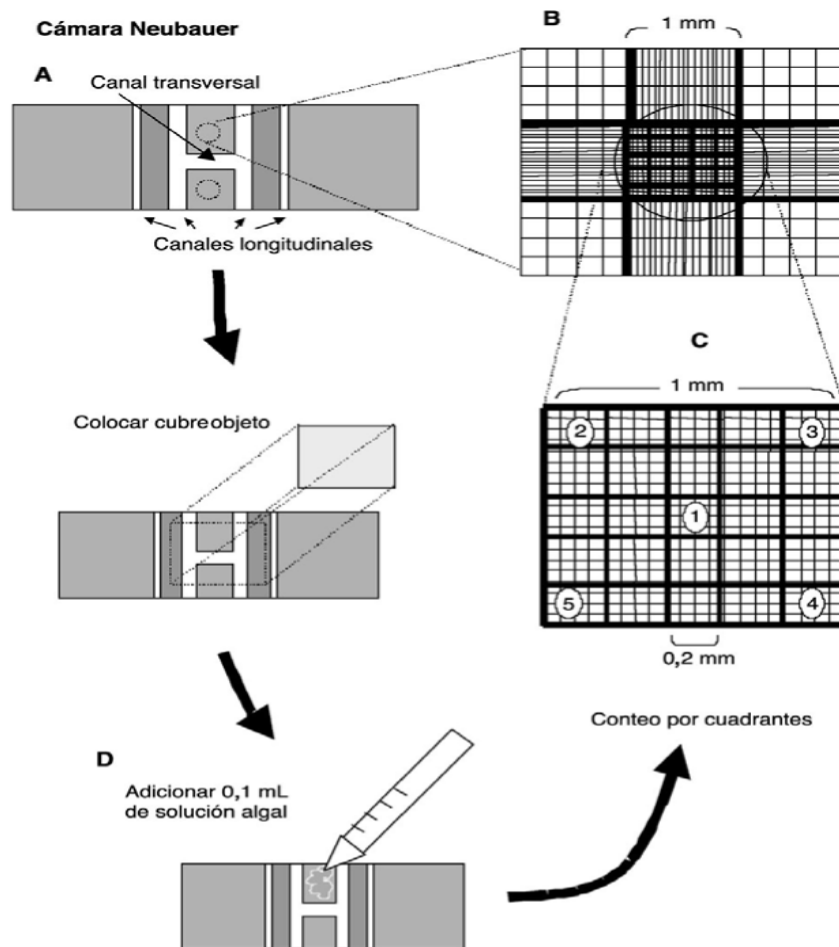
Es una cámara que está diseñada de manera de contener una cantidad fija de líquido. Consta de un cuadrado central de 1 mm de lado dividido en 25 cuadraditos. Cada uno de ellos está, a su vez, dividido en 16 cuadrados.

Se coloca un cubreobjetos sobre la zona cuadrículada, de manera que queda una distancia de 0.1 mm entre el cubreobjetos y la cámara. Esto determina que el líquido quede contenido en toda la cámara un volumen es de  $0.1\text{mm}^3$ .

$$\text{Vol. del cuadrado chico} = \text{área (mm}^2) \times \text{altura (mm)}$$

$$= 0,0025\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 2,5 \times 10^{-4}\text{mm}^3 = 2,5 \times 10^{-7}\text{mL}$$

$$\text{Vol. del cuadrado mediano} = 2,5 \times 10^{-7} \times 16 = 4.0 \times 10^{-6}\text{mL}$$



La mayor dificultad del recuento en cámara es obtener reproducibilidad en el llenado de la cámara con líquido. Otra dificultad es la adsorción de las células en las superficies del vidrio, incluyendo pipetas. Esta adsorción es crítica en el proceso de dilución de la muestra y se minimiza al realizar las diluciones en medios de alta fuerza iónica (solución fisiológica o medios mínimos sin fuente de carbono).

## 1.2 Métodos Indirectos

- Se determina el **número de células viables** en una muestra.
- Requieren al menos 24 horas para el cultivo y la interpretación de resultados.
- Se emplean medios de cultivo generales, enriquecidos, selectivos y diferenciales, dependiendo de los microorganismos a cuantificar.

### a) Métodos de recuento de bacterias viables en placa

El método que vamos a utilizar consiste en realizar diluciones sucesivas seriadas de la muestra en agua, caldo o solución salina, etc. en condiciones de esterilidad con objeto de sembrar después cantidades conocidas de las mismas en una serie de placas de petri y la posterior incubación durante 24-48 horas a la temperatura apropiada.

Se usa una amplia serie de diluciones (por ejemplo  $10^{-4}$  a  $10^{-10}$ ) debido a que el número exacto de bacterias vivas en la muestra suele ser desconocida. Además se consigue una mayor precisión en placas duplicadas o triplicadas de cada dilución

Considerando que alguna de las diluciones será tal que al distribuir una parte de ella en la placa, originará colonias separadas, se cuenta el número de colonias.

Las colonias se consideran originadas a partir de una célula, pero a veces la metodología conduce a que puedan surgir de un grupo de células, por lo que se utiliza mucho el término: **unidades formadoras de colonias (U.F.C.)**, con ello se infiere que cada colonia se originó de una sola célula.

Además, a los efectos de que todas las células que queden en una placa tengan una adecuada disponibilidad de nutrientes, y que los errores del método sean menores, se establece que las condiciones óptimas de conteo se dan cuando desarrollan entre **30 y 300 colonias por placa** para que sea un resultado estadísticamente confiable. Esto es necesario para minimizar errores al calcular el tamaño de la población.

Placas con más de 300 colonias no pueden ser contados y se designan como demasiado numerosos para contar (**TNTC**, too numerous to count). Más de 300 colonias en una placa es probable que produzcan colonias demasiado cerca uno del otro para ser distinguidos como unidades formadoras de colonias (UFC).

Placas con menos de 30 colonias se designan demasiado pocos para contar (**TFTC**, too few to count) y no son aceptables por razones estadísticas. Cuando esto no se cumple se considera el valor obtenido como una estimación del recuento, y si es posible se repite hasta caer en las condiciones óptimas.

Estos métodos ofrecen la ventaja de cuantificar solo a las bacterias viables presentes en una muestra a través de la determinación de los microorganismos presentes en una muestra en base a su desarrollo en medio de cultivo en placas, formando colonias.

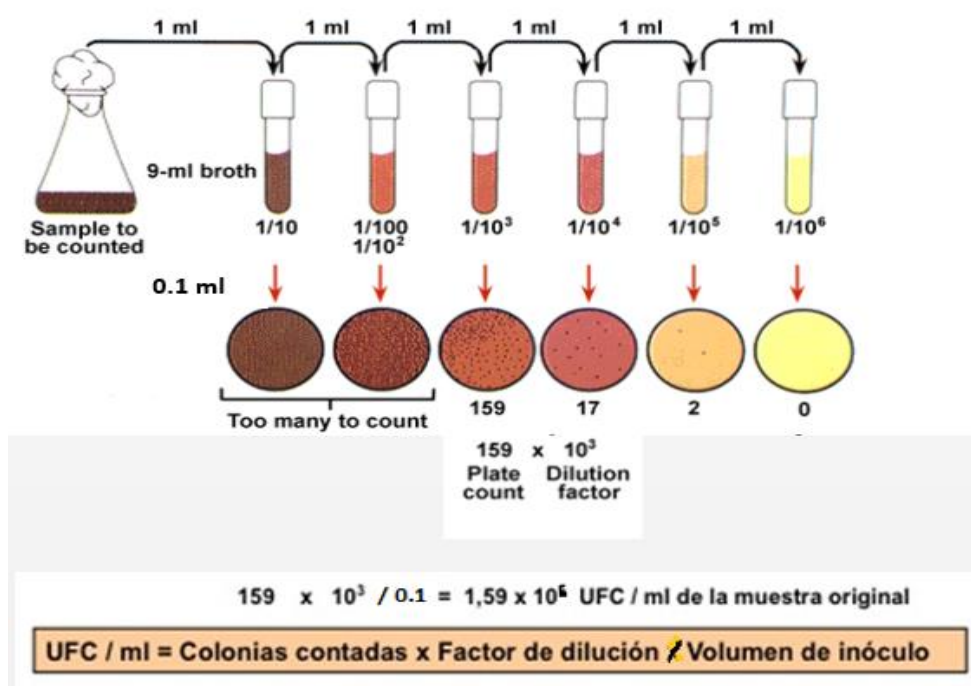
Estos métodos se utilizan principalmente para la cuantificación de [bacterias, levaduras y hongos filamentosos](#)

El número de unidades formadoras de colonias (UFC) de una suspensión bacteriana puede determinarse mediante dos técnicas:

### a.1 Siembra en superficie

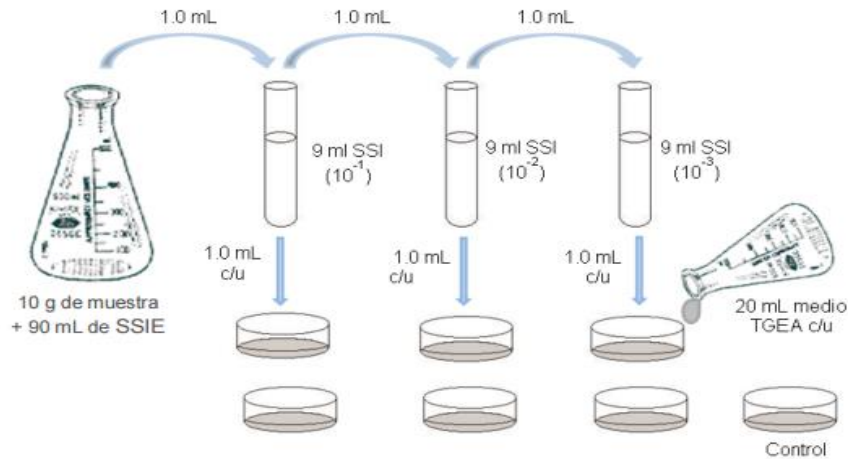
Se deposita en la superficie de las placas que ya contienen el medio de cultivo adecuado para cada microorganismo en estudio, **0.1 mL** o 100 µl de cada dilución. Se realiza duplicado para cada dilución. Se emplea la misma pipeta para todas las diluciones y se comienza por la más diluida. Luego de realizada la descarga de la muestra, se procede a extenderla sobre toda la superficie de las placas, usando rastrillo estéril, en el mismo orden que la siembra (o sea de la más diluida a la más concentrada).

En este método todas las colonias crecen sobre la superficie del medio. Generalmente se utiliza esta técnica para el recuento de bacterias aerobias.



**a.2 Siembra incorporada**

Se procede de la dilución mayor a la menor, y se deposita **1 mL** de cada dilución en placas estériles, vacías, por duplicado. Posteriormente, se agrega a cada placa 15 a 20 mL del medio de cultivo a emplear, previamente fundido y mantenido a 45°C en baño o estufa. Se agita moviendo la placa tapada sobre la superficie de la mesa con movimiento circular, horario y antihorario, con movimientos hacia arriba y hacia abajo (siempre sin levantar la placa de la mesa).



**Figura 11.** Método de dilución y vertido en placa.



**Resultados de Recuento en placa:**

Una vez enfriado el agar en el caso del incorporado, y secada la muestra en el caso de superficie, las placas se invierten, y se ponen en la estufa que corresponde según los microorganismos a contar, incubándose el tiempo propuesto en la técnica correspondiente. El conteo de las colonias se realiza con la ayuda de una lupa como se observa en la siguiente figura.



Con el volumen de muestra sembrado en la placa y la dilución correspondiente, podremos calcular el número de unidades formadoras de colonias presentes en la muestra inicial.

Se efectúa el cálculo promediando los valores y multiplicando por la inversa de la dilución (factor de dilución). Una vez estimado el número de colonias por placa, se aplica el factor de corrección para expresar el resultado por gramo o mL de muestra, de acuerdo al método utilizado, y a las diluciones sembradas.

Se informan los resultados de recuento con sólo **dos cifras significativas**, redondeando los valores cuando corresponda.

Recordar, que se debe efectuar el recuento de colonias eligiendo las placas entre 30 y 300 UFC. Placas con más de 300 colonias se designan como TNTC (too numerous to count). Placas con menos de 30 colonias se designan como TFTC.

El tamaño de la población se calcula usando la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{N} \times \text{Inversa de dilución}}{\text{Vol}}$$

donde:

**UFC** : unidades formadoras de colonias

**N** : número promedio de colonias obtenidas para una dilución dada.

**vol**: volumen de inóculo (ml)

**Inversa de dilución**: Inversa de la dilución

**Ejemplos:**

- Por el método de incorporación se obtuvo el siguiente resultado: 142 colonias en promedio de 3 cajas en la dilución  $10^{-4}$ . Calcular UFC/ml.

$$\text{UFC/ml} = \frac{142 \times 10^4}{1 \text{ ml}} = 1,4 \times 10^6$$

Resultado:  $1,4 \times 10^6$  UFC/g o mL. de la muestra

- Suponiendo que la placa de dilución  $10^{-6}$  se contaron 130 colonias. Cuantas bacterias hay en 1 ml de muestra original?

$$\text{UFC/ml} = \frac{130 \times 10^6}{1 \text{ ml}} = 1,3 \times 10^8$$

Resultado:  $1,3 \times 10^8$  UFC/ mL. de la muestra

**b) Número más probable (NMP)**

Se basa en la determinación de la presencia o ausencia de un determinado tipo de microorganismo (en función de que crezcan o de que produzcan determinada reacción en el medio), en diferentes cantidades de muestra.

Según el tipo de microorganismo que se desea contar se utilizan medios de enriquecimiento selectivos, o medios de propagación

**c) Filtros por membrana**

Este método consiste en hacer pasar un volumen determinado de muestra líquida, o solución en agua o en solvente apropiado a través de un filtro de membrana estéril (diámetro 50 mm, poro 0.45  $\mu\text{m}$ ), colocado en un equipo de filtración. Los filtros pueden ser de distintos materiales; en microbiología se emplean de nitrato o acetato de celulosa.

Luego de enjuagar con soluciones estériles apropiadas se retira el filtro, y se lo coloca sobre la superficie de una placa de Petri con el medio de cultivo a utilizar y se incuba.

Transcurrido el tiempo de incubación, se cuentan las colonias desarrolladas en el filtro. Se considera que las condiciones óptimas del método se dan cuando se desarrollan entre 20 y 200 colonias en el filtro. Se utilizan filtros reticulados y toda vez que se utilice el promedio por cuadrado, el recuento se informa como **estimado**.



La membrana de celulosa retiene a los microorganismos en su malla con poros de 0.25-0.45  $\mu\text{m}$ . Esta membrana se transfiere a un medio de cultivo para el desarrollo de colonias.





### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Vortex		1
2	Mecheros Bunsen		1
3	Balanzas		1
4	Cocina eléctrica (Mesa 1)		1
5	Rejilla de Asbesto		1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Vaso de precipitación	100 ml	1
2	Espátulas o cucharitas		1
3	Asas de Digraskly		1
4	Gradillas		1
5	Botellas con 100 ml de alcohol		1
7	Pisetas con agua destilada		1
8	Tubos de ensayo con 1ml de Agua destilada estéril		1
9	Botella con 90 ml de Agua Destilada estéril	200 ml	1
10	Placa Petri estéril vacía		1
11	Placa Petri con Agar Nutritivo		1
12	Placa Petri con Agar Saboraud		1
13	Placa Petri con Agar Mc Conkey		1
14	Micropipetas	100 ul	1
15	Micropipeta	1000 ul	1
16	Tips esteriles	100 ul	1
17	Tips esteriles	1000 ul	1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.
- 4.6 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.

### 5. Procedimientos:

#### Recuento en placa:

1. Marcar cada placa con el número de la muestra, la dilución y la fecha, preparando, si es posible, placas duplicadas para cada volumen de muestra examinada.
2. Homogeneizar la muestra, agitando el frasco varias veces.
3. Hacer diluciones seriadas al décimo de las muestras en condiciones de esterilidad.  
**Tubo 1:** dilución (-1): 1 ml muestra + 9 ml solución fisiológica  
**Tubo 2:** dilución (-2): 1 ml dil (-1) + 9 ml solución fisiológica  
**Tubo N:** dilución (N): 1 ml dil. (N-1) + 9 ml dilución fisiológica
4. Tome una pipeta estéril y transferir 1 ml de la muestra de leche a un tubo con 9 mL de ADE (Tubo 1)
5. Con otra pipeta estéril aspire y expela la dilución del tubo 1 varias veces para homogeneizar.
6. Con esa misma pipeta traspase 1 mL al tubo 2
7. Descarte la pipeta y repita la operación para cada uno de los tubos con 9 mL.



8. Luego de la última transferencia, tome otra pipeta y a partir de la última dilución, homogenice e inocule con 0,1 mL una caja de Petri con el medio de cultivo Agar Nutritivo. Si lo considera necesario y sin contaminar la pipeta, repita la operación para la dilución anterior.
9. Disemine con la espátula de vidrio los 0.1 ml inoculados en las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  por la superficie del medio, manteniendo la caja semiabierta. (cada dilución se siembra por duplicado). Generalmente, se siembran no menos de tres diluciones consecutivas
10. Una vez preparadas las diluciones, se siembra dentro de los 15 minutos siguientes
11. Esterilice la espátula con alcohol y llama cada vez que cambia de caja. Tenga la precaución de mantener el contenedor de alcohol alejado de la llama; si se prendiera fuego tápelo con una caja de Petri para apagarlo.  
Etiquete las cajas, lleve a incubar invertidas una vez secas.
12. Las placas se incuban 24 - 48 horas en estufa a 37°C.
13. Contar las colonias obtenidas en cada placa.
14. Elegir la dilución en la cual se hayan obtenido entre 30 y 300 colonias y calcular las unidades formadoras de colonias (ufc) según la fórmula:
15. Calcular el número de bacterias por ml en el cultivo original. Expresar los resultados en UFC/ml

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....

2. ....  
.....  
.....

3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

7.1.....  
7.2.....  
7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.



# Guía de práctica N° 7

## Acción de agentes físicos sobre los microorganismos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Explica como los microorganismos son afectados por agentes físicos como la temperatura, presión osmótica y radiación ultravioleta.

### 2. Fundamento Teórico

Es bien conocido que las actividades vitales de los organismos están condicionadas por su ambiente. Modificando fundamentalmente estos factores, el organismo bien se adapta a las nuevas condiciones o muere; dependiendo esto de la magnitud y tipo de cambio operado. En este aspecto, los microorganismos difieren de las células de plantas superiores y animales.

El conocimiento de varios **factores físicos** que controlan la supervivencia y multiplicación de los microorganismos, hace que la actividad bacteriana pueda ser incrementada, disminuida o destruida completamente.

Las alteraciones en el tiempo de división celular indican que uno de los factores o más han cambiado. El tipo de muerte bacteriana por agentes físicos está relacionado al número de bacterias sobrevivientes, lo que significa que el número de microorganismos muertos por unidad de tiempo es mayor al principio y mucho menor cuando la acción continúa.

### 3.1 FACTORES FISICOS

#### A. TEMPERATURA

Cada especie microbiana requiere un rango de temperatura de crecimiento, que es determinado por la sensibilidad al calor por parte de las enzimas, las membranas, los ribosomas, y otros componentes de la célula. Como consecuencia, el crecimiento microbiano tiene una dependencia de la temperatura, con distintos rangos de temperaturas mínima, máxima, y óptima.

La **temperatura mínima** de crecimiento es la temperatura más baja a la que se producirá el crecimiento; la **temperatura máxima** de crecimiento es la temperatura más alta a la que se producirá el crecimiento; y la **temperatura óptima** de crecimiento es la temperatura a la que la tasa celular de reproducción es más rápida.

La **temperatura óptima** dada para el crecimiento de un microorganismo se correlaciona con la temperatura del hábitat normal del microorganismo. Por ejemplo, la temperatura óptima para el crecimiento de bacterias patógenas para los seres humanos es cerca de la temperatura de la sangre humana (35 ° a 37 ° C).

La mayoría de las bacterias pueden clasificarse en uno de los tres grupos principales en base a sus requerimientos de temperatura:

- **Psicrófilos:** Crecen de 0 -15 ° C y tienen una temperatura de crecimiento óptima de 15 ° C o inferior; la máxima es de alrededor de 20 ° C.
- **Mesófilos:** Tienen un crecimiento óptima entre 20 ° y 45 ° C. La mayoría de las bacterias entran en esta categoría.
- **Termófilos:** Pueden crecer a temperaturas mayores de 55 ° C o temperaturas superiores.
- **Hipertermófilos:** Crecen entre 80 – 113 °C



Tabla 1. Clasificación de tipos fisiológicos en bacterias según la temperatura

Tipo Fisiológico	Temperatura °C
Psicrófilos	0- 15
Mesófilos	20 - 45
Termófilos	>55
Hipertermófilos	80-113

**Temperatura óptima de las cepas bacterianas a usar en la presente práctica:**

*Bacillus subtilis*, es un bacilo Gram positivo formador de espora, que tiene una temperatura óptima crecimiento de 30-40°C

*Escherichia coli*, es un bacilo Gram negativo, facultativo anaerobio, que no forma espora y tiene un temperatura óptima de crecimiento de 37°C

**Rango de muerte térmica:** Es el rango de temperaturas en la que muere un organismo al ser expuesta 10 minutos bajo condiciones controladas.

**Condiciones que varían el rango de muerte térmica:**

- **Contenido de agua del medio:** La muerte de la bacteria por acción del calor es por coagulación de las proteínas del protoplasma. Cuanto mayor es el porcentaje de agua en el medio, menor será la temperatura requerida para matar la bacteria.
- **Contenido de agua de los organismos:** A menor cantidad de agua, los microorganismos se secan y se produce mayor resistencia a la temperatura.
- **Concentración de hidrogeniones:** Los organismos mueren fácilmente en condiciones acidas o alcalinas, requiriéndose temperaturas menores que en medios neutros.
- **Composición del medio:** Los medios que contienen alta concentración de proteínas incrementan la temperatura requerida para destruir bacterias, ya que las proteínas forman una película alrededor de los microorganismos protegiéndolos de influencias desfavorables.
- **Edad de las células:** Las células viejas son más resistentes que las células jóvenes a las condiciones adversas.

**B. PRESIÓN OSMÓTICA****Definiciones previas:**

- **Presión osmótica:** Es la fuerza desarrollada cuando dos soluciones de diferente concentración de solutos están separados por una membrana que es permeable únicamente al solvente. El solvente es el líquido, normalmente agua, que disuelve a una sustancia, que en este caso es el soluto.
- **Osmorregulación:** Mantiene los solutos (moléculas pequeñas y iones) a valores óptimos para la actividad metabólica, incluso cuando la osmolaridad del medio varía en un margen ampliamente grande.
- **Cloruro de Sodio (NaCl) o Sal común,** no se lo considera como aditivo. El cloruro de sodio es un excelente agente osmótico. Su bajo peso molecular (de 58.44 g/gmol) permite una alta tasa de pérdida de agua y gran solubilidad, pero también ocasiona alta impregnación en el tejido animal. Además de ser un agente osmótico, es un agente antimicrobiano (conservante), esencialmente por su efecto depresor de la actividad de agua. El cloruro sódico se ha usado para estabilizar ciertos alimentos, entre ellos pescados. Además de lograr la estabilidad de ciertos productos, ciertas concentraciones de cloruro sódico permiten inhibir microorganismos patógenos en los alimentos.
- **La disponibilidad de agua,** se expresa cuantitativamente en términos de actividad de agua ( $a_w$ ). El agua pura tiene un  $a_w = 1,00$ , mientras que los cereales y otros alimentos secos pueden tener valores de  $a_w = 0,60$  o inferior.



Puesto que las bacterias se separan de su entorno externo por una membrana plasmática selectiva permeable, las bacterias pueden ser afectadas por cambios en la presión osmótica o en la disponibilidad de agua de su entorno.

Las bacterias varían ampliamente en sus requerimientos osmóticos. Algunas pueden crecer en soluciones diluidas o soluciones saturadas de NaCl. Los microorganismos que crecen en disoluciones de alta osmolaridad reciben el nombre de **osmófilos**. La mayor parte de ambientes naturales con elevada osmolaridad contienen concentraciones altas de cloruro sódico (NaCl). Las bacterias que crecen en estos ambientes se llaman **halófilos**.

La mayoría de bacterias no necesitan regular su **osmolaridad** interna con precisión porque están protegidas con una **pared celular** capaz de resistir una considerable presión osmótica interna. Las bacterias, en la naturaleza siempre mantienen su osmolaridad muy por encima de la del medio.

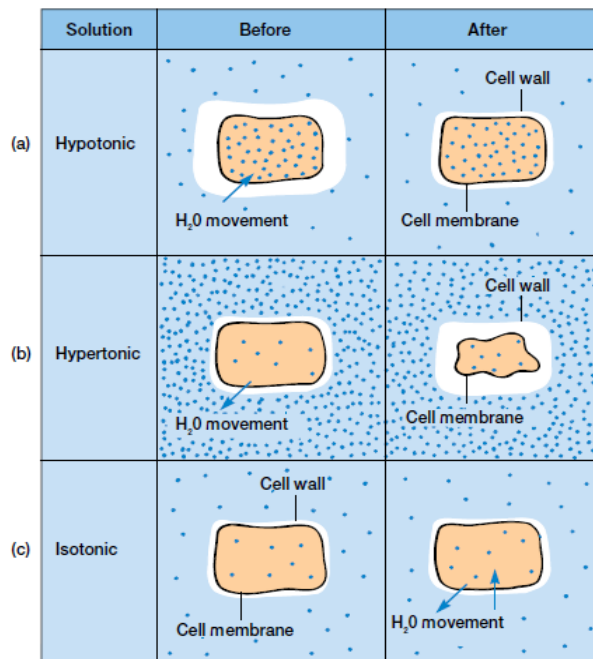
Si una bacteria es colocada en una **solución hipotónica** (baja concentración de solutos y alta en contenido de agua), el agua entrará en el interior de la célula hasta hincharse y estallar (la pared celular se disuelve y la membrana celular se rompe en pequeños fragmentos) proceso denominado **lisis**. (Figura 41.1a) a menos que se haga algo para evitar este influjo. La mayoría de las bacterias tienen paredes celulares rígidas que mantienen la forma y la integridad de la célula; por lo tanto, las soluciones hipotónicas no son perjudiciales para estas bacterias.

Cuando las bacterias se colocan en una **solución hipertónica** (alto nivel de solutos, baja en contenido de agua), el agua sale del interior de la célula, y la membrana citoplasmática se contrae lejos de la pared (figura 41.1b), proceso conocido como **plasmolisis**. Esto deshidrata la célula y la arruga.

En las Gram positivas esto provoca que la membrana celular se separe de la pared, se dice que la célula se ha **plasmolizado**. Las bacterias Gram negativas no experimentan plasmólisis, dado que la pared se retrae junto con la membrana, hecho que también daña a ésta

En una solución isotónica, la concentración de solutos es el mismo (iso significa igual) tanto en el exterior e interior de la bacteria. La bacteria está en equilibrio osmótico con su entorno y por lo tanto no cambia el volumen de la célula (figura 41.1c).

**Figure 41.1** Effect of Osmotic Pressure on a Bacterial Cell. The dots represent solute (NaCl) molecules. The shaded area represents water (solvent).





Aunque en general, las bacterias toleran cierta variación en la presión osmótica del ambiente, el crecimiento de la mayoría se inhibe si se colocan en un medio con una alta presión osmótica (superior al 2% NaCl). Si estas se colocan en un medio como tal, sufren el fenómeno de **plasmólisis**. La mayoría de bacterias no son capaces de reproducirse en un medio de presión osmótica elevada, sin embargo hay algunos microorganismos que pueden crecer en soluciones concentradas de cloruro de sodio, es decir en medios alta osmolaridad

- **Los microorganismos Extremófilos**, están adaptados a condiciones ambientales muy difíciles de soportar para la mayoría de los seres vivos. Los ambientes extremos incluyen aquellos con temperaturas muy elevadas (55-121°C) o bajas (2 - -20°C), alta salinidad (NaCl 2- 5M) y alta alcalinidad (pH arriba de 8) o alta acidez (pH menor de 4). El descubrimiento de microorganismos que habitan en ambientes extremos ha despertado el interés de su estudio desde el punto de vista biotecnológico debido a las características de estos microorganismos ya que sus biomoléculas son necesariamente resistentes a las condiciones agresivas de su entorno.

### Halófilos

Los organismos halófilos forman parte de los organismos extremófilos ya que viven en condiciones extremas, en este caso, en entornos con mucha sal como zonas litorales, salinas y lagunas salobres. Se llaman halófilos a aquellos organismos que requieren cierta concentración de NaCl para su desarrollo y crecimiento. Pueden ser clasificados en función de la cantidad de sal que requieren en 4 categorías con respecto a su tolerancia de sal:

**Tabla 1.** Clasificación de tipos fisiológicos en bacterias según su tolerancia a la sal

Tipo Fisiológico	Concentración de NaCl (%)	Concentración Molar
No halófilos	0- 2 %	< 0.02 M
Halófilos ligeros	2 - 5 %	0.2 -0.85 M
Halófilos moderados	5-20 %	0.85 - 3.4 M
Halófilos extremos	20-30 %	3.4 -5.1 M

Los organismos **halotolerantes** son aquellos que pueden crecer en presencia y en ausencia de altas concentraciones de sal. Muchos organismos **halófilos y halotolerantes** pueden crecer dentro de un amplio margen de concentración de sal, con requerimiento o tolerancia para algunas sales, dependiendo del medio y de los factores nutricionales.

- **Tolerancia osmótica:**

Tolerancia osmótica, es la capacidad de un microorganismo para crecer en un medio con osmolaridades muy variadas. Se ha demostrado que muchas bacterias concentran  $K^+$  en su intracelular mucho más que  $Na^+$ . Además existe una correlación entre tolerancia osmótica en las bacterias y su contenido en  $K^+$ . Los estudios en *E. coli*, demuestran que la concentración intracelular de  $K^+$  aumenta progresivamente con el aumento de la osmolaridad (concentración de NaCl) del medio de crecimiento. Como consecuencia, se aumenta la osmolaridad como la fuerza iónica interna de la célula.

El mantenimiento de una fuerza iónica relativamente constante dentro de la célula es de extrema importancia fisiológica ya que la estabilidad y el comportamiento de las enzimas y otras moléculas biológicas dependen de este factor.

- **Requerimiento de  $Na^+$  en las bacterias**

El **sodio, el cloruro y el magnesio**, son requeridos para mantener la estructura y rigidez de la célula.

En la mayoría de bacterias no halófilas no se ha podido demostrar un requerimiento específico de Na. Por ejemplo *E. coli* (bacteria no halófila) necesita un mínimo de  $Na^+$  para crecer, pero eso no demuestra la dependencia absoluta de  $Na^+$  para su crecimiento. Por el contrario, las bacterias halófitas moderadas y extremas, necesitan siempre  $Na^+$  para crecer, a concentraciones tan altas, que su dependencia absoluta a este catión  $Na^+$ , se demuestra experimentalmente.



En el caso de bacterias halófitas moderadas, el Na<sup>+</sup> asegura en correcto funcionamiento de los mecanismos de transporte. En los halófilos extremos, una elevada concentración de NaCl es esencial para mantener tanto la estabilidad como la actividad catalítica de las enzimas.

▪ **Adaptaciones**

La membrana citoplasmática constituye una barrera que separa el citoplasma del medio externo en el que pueden producirse cambios en la concentración de sales, por lo que debe jugar un papel importante en la respuesta de la célula a dichos cambios. Se ha demostrado que la adaptación de la composición lipídica de las membranas celulares frente a una nueva situación de estrés osmótico incluye modificaciones en el tipo de fosfolípidos existentes en las membranas, y en el tipo de ácidos grasos que forman parte de los lípidos

La principal estrategia que desarrollan los microorganismos halófilos para adaptarse al estrés osmótico se basa en la acumulación masiva de compuestos en el citoplasma para compensar la presión osmótica del medio externo. Los compuestos acumulados pueden ser iónicos o no iónicos, según el tipo de microorganismo, lo que determina de forma general la existencia de dos mecanismos principales de acumulación:

**Mecanismo "salt-in":** Acumulan en su citoplasma iones inorgánicos, principalmente K<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>. El aumento en la concentración de KCl en el citoplasma conlleva a una adaptación a las altas concentraciones salinas de todas las proteínas y otros componentes celulares como los ribosomas. Es típico de Arqueas (bacterias halófilas moderadas)

**Mecanismo "salt out",** es el que utilizan las bacterias tanto halófilas. Estos microorganismos, en respuesta al estrés osmótico, acumulan en su citoplasma compuestos orgánicos que mantienen el equilibrio osmótico sin interferir con el metabolismo celular, por lo que se denominan **solutos compatibles** y que constituyen la base fundamental de la tolerancia a la sal de estos microorganismos. Se trata de un sistema mucho más flexible, ya que permite la adaptación a las fluctuaciones en la presión osmótica del medio. Los solutos compatibles pueden acumularse tras su transporte al interior celular desde el medio externo, o bien mediante síntesis, como sucede, por ejemplo cuando las bacterias se cultivan en un medio mínimo. Los principales solutos compatibles descritos a la fecha son: aminoácidos, azúcares, glicina betaína, ectoína e hidroxiectoína

▪ **Tolerancia osmótica de algunas Bacterias**

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo. *S. aureus* puede crecer en presencia de 15% (alrededor de 2.5 M) de Cloruro de Sodio (NaCl) o con un aw=0.86

*Bacillus subtilis* es una bacteria Gram positiva, Catalasa-positiva, aerobio comúnmente encontrada en el suelo. Entre sus principales características se encuentra su capacidad para formar esporas en diversas condiciones de estrés, crecer en un intervalo amplio de temperaturas (desde 15 hasta 55 °C) y sobrevivir en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl)

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, es un habitante normal de la flora intestinal en la parte baja del intestino de animales de sangre caliente. *E. coli* es muy sensible a las altas concentraciones de sal, no tiene tolerancia osmótica y no puede crecer debajo de un aw=0.95.

Tipo Fisiológico	Concentración de NaCl (%)	Concentración Molar	Organismo	Rango de concentración de NaCl tolerado en el crecimiento (% , g/100 ml)
No halófilos	0- 2 %	< 0.02 M	<i>Escherichia coli</i>	0 -1 %
Halófilos ligeros	2 - 5 %	0.2 -0.85 M	<i>Pseudomonas marinas</i>	0,1 -5 %
Halófilos moderados	5-20 %	0.85 - 3.4 M	<i>Saphilococcus aureus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	10-15 % < 7 %
Halófilos extremos	20-30 %	3.4 -5.1 M	<i>Halobacterium salinarum</i>	12-36 %



### Información de cepas bacterianas a usar:

En la presente práctica, vamos a examinar el efecto de diferentes concentraciones de NaCl (presión osmótica o actividad de agua, aw) en el crecimiento de dos especies de bacterias:

- *Bacillus subtilis*, es un bacilo Gram positivo, formador de spora, y sobrevive en concentraciones salinas (hasta el 7% de NaCl)
- *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, es muy sensitivo a las altas concentraciones de sal, no tiene tolerancia osmótica y no puede crecer debajo de un aw=0.95

#### ■ **Aplicaciones de bacterias halófilas**

Las bacterias halófilas han demostrado ser un grupo de extremófilos con un gran potencial biotecnológico, debido a que no solo producen compuestos de enorme interés industrial, como enzimas, biopolímeros o solutos compatibles, sino que además presentan algunas propiedades fisiológicas que facilitan su explotación comercial. A continuación se describen algunas de las más interesantes aplicaciones de estos microorganismos.

- **Biodegradación de residuos.** Las bacterias halófilas constituyen una importante alternativa a los tratamientos microbiológicos convencionales en aquellos casos en los que éstos sean ineficaces, como son los procesos industriales que generan aguas residuales hipersalinas. Esto sucede por ejemplo en la producción de diversas sustancias químicas como los pesticidas, determinados productos farmacéuticos y herbicidas, y los procesos de extracción de petróleo y gas
- **Alimentos fermentados.** Las bacterias halófilas también tienen diversas aplicaciones en el campo de la alimentación. Así en la elaboración de la salsa de soya, etc.
- **Polímeros.** Los polímeros bacterianos tienen gran importancia en la industria petrolera. Gracias a sus propiedades surfactantes y emulsionantes pueden aumentar la eficacia de los procesos de extracción de crudo del subsuelo incrementando la viscosidad del agua que se inyecta alrededor de las bolsas, disminuyendo así su tensión superficial. Las bolsas de petróleo suelen presentar una elevada salinidad, lo que hace especialmente interesante la utilización directa de bacterias halófilas moderadas productoras de biopolímeros.

### C.- ACCIÓN GERMICIDA DE LA LUZ ULTRAVIOLETA

Los rayos ultravioleta son componentes invisibles de la radiación solar. Todos los microorganismos: hongos, levaduras, bacterias, virus y esporas son sensibles al tratamiento UV. Sin embargo, las esporas requieren mayor tiempo de exposición para tener el mismo porcentaje de reducción que las células vegetativas.

El poder de penetración de la luz depende de la cantidad de materia suspendida. La experiencia demuestra que 1 minuto de exposición a la luz UV provoca la muerte del 70% de bacterias G(-) y 60% de G(+) contenidas en cubos de hielo de 30 mm de grosor.

Los rayos UV son absorbidos por las proteínas, el DNA, RNA y otros compuestos orgánicos; siendo las bases pirimídicas las más sensibles.

La UV altera el DNA causando dímeros de timina y citosina, lo que provoca mutaciones en la célula irradiada y cuando la intensidad de irradiación es mayor el efecto puede ser letal.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina eléctrica		1
2	Mecheros Bunsen		1
3	Rejilla de Asbesto		1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mecheros de alcohol		1
2	Asas bacteriológicas		1
3	Gradillas		1
4	Botellas con alcohol de 70°	100 ml	1
5	Pisetas con agua destilada		1
7	Vaso de precipitación	100 ml	1
8	Pinzas de madera		2
9	Tubos con caldo de nutritivo de <i>B. subtilis</i> de 24 h	4 ml	1





10	Tubos con caldo nutritivo de <i>E. coli</i> de 24 horas	4 ml	1
11	Tubos de ensayo estériles con tapa de algodón		4
12	Placas Petri estériles vacías.		4
13	Placas con AN con concentraciones de NaCl al 0%		1
14	Placas con AN con concentraciones de NaCl al 5%		1
15	Placas con AN con concentración de NaCl al 20%		1
16	Espátulas de Digraskly		1
17	Micropipetas de 1 ml		1
18	Tips esteriles de 1 ml		4

### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en latas vacías.
- 4.3 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.

### 5. Procedimientos:

#### A. EFECTO DE LA TEMPERATURA

1. Tomar los 7 tubos y rotularlos con su respectiva bacteria y enumerar los tubos de acuerdo a la temperatura a la que le toca ser sometido.
2. Distribuir 2 ml del cultivo de *E. coli* a cada uno tubos.
3. Llevar el primer tubo a baño maría por 10 minutos a 121 °C.
4. Transcurrido este tiempo, enfriarlo bruscamente en agua fría.
5. Una vez enfriado, tomar 1 ml y colocarlo en una placa Petri estéril vacía.
6. Luego verter el agar fundido de 45° C en la placa, mezclar bien y dejar solidificar.
7. Proceder en igual forma con los 6 tubos restantes, pero disminuyendo la temperatura cada vez que se coloca un nuevo tubo a 100, 80, 60, 37, 30, 20.
8. Incubar a 37 C durante 24-48 hrs
9. Hacer las lecturas y determinar EL RANGO DE MUERTE TERMICA. Observar los resultados y anotar.
10. Reportar el crecimiento como:  
No hubo crecimiento: -  
Crecimiento moderado: +, ++, +++  
Máximo crecimiento: ++++

#### B.-ACCIÓN DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

1. Con plumón indeleble, dividir la placa en 2 mitades iguales.
2. Colocar el nombre de la bacteria, la concentración de NaCl y la fecha
3. Sembrar la respectiva bacteria por estría simple en cada mitad de la placa, en cada una de las 5 diferentes placas con concentraciones crecientes de sacarosa o NaCl al 0%, 5%, 10%, 15%
4. Incubar las placas en posición invertida por 24-48 h a 37 °C
5. Observar la relativa cantidad de crecimiento en cada sección de cada concentración de sal de las placas. Comparar el crecimiento con la placa control (Concentración al 5% de NaCl) sembrada con bacteria.
6. Reportar el crecimiento como:  
No hubo crecimiento: -  
Crecimiento moderado: +, ++, +++  
Máximo crecimiento: ++++



**C.- ACCIÓN GERMICIDA DE LA LUZ ULTRAVIOLETA**

1. Con la pipeta capilar colocar de 1 a 2 gotas de uno de los cultivos en el centro de la placa.
2. Con la espátula de Drigalsky extender la siembra por toda la superficie del medio.
3. Trazar con el lápiz graso cuatro cuadrantes perpendiculares sobre el dorso de la placa, enumerándolos del 1 al 4.
4. Colocar la placa sembrada a 32 cm de la lámpara de rayos UV (aún no encender la lámpara de UV)
5. Cambiar la tapa por el círculo de cartón.
6. Encender la lámpara y exponer el cuadrante libre (1) a la radiación por 30 seg. Luego apagar la lámpara.
7. Rotar el círculo de cartón dejando libre el cuadrante (2) y exponer a la luz uV por 60 seg. Apagar la lámpara.
8. Rotar el círculo de cartón dejando libre el cuadrante (3) y exponer a la luz uV por 90 seg. Apagar la lámpara.
9. El cuadrante (4) no se expone.
10. Cubrir con su tapa el cultivo e incubar a 37°C por 24 hrs.
11. Anotar los resultados.

**6. Resultados**

**A. EFECTO DE LA TEMPERATURA**

Basados en tus observaciones del crecimiento bacteriano, anota tus observaciones:

Bacteria	Crecimiento (+) o (-)					Tipo Fisiológico
	20 °C	37 °C	60 °C	80 °C	100 °C	
<i>E. coli</i>						
<i>B. subtilis</i>						

- Cuál es el rango de muerte térmica para ambas bacterias? \_\_\_\_\_

**B. ACCIÓN DE LA PRESIÓN OSMÓTICA**

Reportar la cantidad de crecimiento de dos bacterias, en la siguiente tabla:

Use -, +, ++, +++, +++++ para indicar la cantidad de crecimiento.

Medio de Cultivo	Crecimiento (+, ++, +++, +++++) o (-)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
0 % NaCl		
5 % NaCl		
10 % NaCl		
20% NaCl		

- Cuál de estas dos bacterias tolera más la sal? \_\_\_\_\_
- Cuál de estas dos bacterias tolera un amplio rango de sal? \_\_\_\_\_

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....



**7. Conclusiones**

- 7.1.....  
.
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Efecto de los factores físicos y químicos. [on line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
[https://books.google.com.pe/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA218&lpg=PA218&dq=bacterias+que+pueden+crecer+en+altas+concentraciones+de+cloruro+de+sodio&source=bl&ots=4UjfmewFM&sig=LyrG2wb9KdGsOeJ\\_h433\\_tSJvRs&hl=en&sa=X&ved=0ahUKewjji6GWuJ7MAhUF4SYKHV4cC8MQ6AEIjAB#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA218&lpg=PA218&dq=bacterias+que+pueden+crecer+en+altas+concentraciones+de+cloruro+de+sodio&source=bl&ots=4UjfmewFM&sig=LyrG2wb9KdGsOeJ_h433_tSJvRs&hl=en&sa=X&ved=0ahUKewjji6GWuJ7MAhUF4SYKHV4cC8MQ6AEIjAB#v=onepage&q&f=false)  
<http://www.redalyc.org/pdf/579/57937307.pdf>  
[http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562004000100004](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100004)  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v07\\_n2/pdf/cap2.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v07_n2/pdf/cap2.pdf)  
<https://books.google.com.pe/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA219&lpg=PA219&dq=tolerancia+osmotica+de+bacterias&source=bl&ots=4Ujfn5pKNv&sig=4QmZRQjkjd6TIJ-LLPIOtH1AIHg&hl=en&sa=X&ved=0ahUKewis3cWhxZ7MAhWJVz4KHW0ZC8YQ6AEIGjAA#v=onepage&q=tolerancia%20osmotica%20de%20bacterias&f=false>



## Guía de práctica N° 8

### Acción de agentes químicos sobre los microorganismos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

#### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Explica como los microorganismos son afectados por agentes químicos como pH, colorantes, metales pesados y desinfectantes.

#### 3. Fundamento Teórico

Los agentes químicos se usan para el control del crecimiento microbiano tanto en tejidos vivos como objetos inanimados. A continuación trataremos los principales agentes químicos para el control del crecimiento microbiano:

##### 2.1 pH

La acidez o alcalinidad de una solución se expresa por su **pH** en una escala en la que la neutralidad es pH 7. La escala de pH se extiende de 0 a 14. Los valores de pH por debajo de 7 son *ácidos* y los mayores de 7 son *alcalinos* (o *básicos*).

No es sorprendente que el pH afecte dramáticamente el crecimiento bacteriano. El pH afecta a la actividad de las enzimas, especialmente las que están involucrados en la biosíntesis y el crecimiento. Cada especie microbiana posee un rango definido de pH para su crecimiento y un pH óptimo

Tipo Fisiológico	pH óptimo de crecimiento
<b>Acidófilos</b>	0.0 - 5.5
<b>Neutrófilos</b>	5.5 - 8.0
<b>Alcalófilos</b>	8.5 -11.5
<b>Alcalófilos extremos</b>	>10

En general, cada grupo de microorganismo posee preferencias de pH características:

- La mayoría de bacterias y protozoos son neutrófilos, sin embargo hay bacterias alcalófilas como *Bacillus*.
- La mayor parte de los hongos (mohos y levaduras) y algas prefieren medios ligeramente ácidos (pH 4 a 6)

La mayoría de los ambientes naturales tienen un valor de pH entre 5 y 9, y los organismos con pH óptimos de este orden son los más comunes. Sólo unas cuantas especies pueden crecer por debajo de 2 o por encima de 10. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios con un amplio rango de pH, su tolerancia tiene un límite.

En general, los procariotas mantienen un pH neutro en el citoplasma y mueren si este pH interno desciende por debajo de 5.5. Los cambios en el PH externo pueden modificar también la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo, por ello su disponibilidad para el organismo.

Los microorganismos tienen que adaptarse a menudo a cambios de pH para sobrevivir. Ejemplo: Cuando el pH baja hasta valores de 5.6 a 6, *E. coli* sintetiza un grupo de nuevas proteínas, como parte de una respuesta de tolerancia al medio ácido.

En los medios de cultivo suelen añadirse **bufferes** para evitar la inhibición del crecimiento por cambios grandes de pH siendo el buffer fosfato el más común. Muchas bacterias producen ácidos metabólicos que pueden bajar el pH e inhibir su crecimiento. Para evitar esto, los buffers (tampones) producen equilibrio en el pH, se añaden a medios de cultivo para neutralizar estos ácidos. Por ejemplo, las peptonas en medios complejos actúan como buffers (amortiguadores). A menudo se añaden sales de fosfato como amortiguadores en medios químicamente definidos.

**Mecanismo de Acción del pH:** Variaciones intensas en el pH pueden dañar a los microorganismos alterando la membrana citoplasmática o inhibiendo la actividad de las enzimas y las proteínas transportadoras. Los cambios en el pH externo pueden modificar la ionización de las moléculas de nutrientes, disminuyendo por ello su disponibilidad para el microorganismo.

## 2.2 Colorante: Cristal Violeta

En general, la acción de los colorantes sobre las bacterias es bacteriostática (detiene la multiplicación de las mismas, sin matarlas). En general son más activos contra bacterias Gram positivas y algunos hongos.

El cristal Violeta es un colorante básico derivado del grupo de trifenil metano. Es un colorante bacteriostático potente, ya que inhibe el crecimiento de los Gram (+). Las bacterias gram negativas son alteradas en poco grado.

Parece que hay alguna relación entre la acción bacteriostática y el comportamiento de la bacteria frente a la coloración Gram. Es por este motivo que resultan más susceptibles a la acción de los colorantes los microorganismos Gram (+).

El cristal violeta se emplea en medio de cultivo selectivo, antiséptico de piel y membrana bucales,

**Mecanismo de Acción del Cristal Violeta:** Los colorantes básicos como el cristal violeta reacciona intensamente con las cargas negativas de las proteínas de la pared celular de las Gram positivas, interfiriendo así en la síntesis de la pared celular de las Gram positivas.

## 3.3 Acción Oligodinámica de los Metales Pesados

Varios metales pesados como la plata, el cobre y el mercurio pueden ser germicidas o antisépticos. La propiedad de los metales pesados (en especial de plata y cobre) de ejercer efectos letales sobre los microorganismos en cantidades pequeñísimas se conoce como acción oligodinámica (oligo significa poco; dinamis significa fuerza, poder).

Este efecto puede observarse cuando se coloca una moneda o pieza de metal que contenga plata o cobre sobre una placa de Petri inoculada previamente con algún microorganismo. Cantidades ínfimas del metal se difunden desde la moneda e inhiben el crecimiento de las bacterias a cierta distancia alrededor de ella (Figura1) Después de la incubación se observa un halo de inhibición (no crecimiento, alrededor del metal)



**FIGURA 7.8 Acción oligodinámica de los metales pesados.** Alrededor de la moneda de diez centavos y del sombrero se observan zonas claras donde se ha inhibido el crecimiento bacteriano. El sombrero y la moneda de diez centavos son de plata; el penique es de cobre.



La plata se usa como antiséptico en una solución de Nitrato de plata al 1%, esto se aplica a menudo en los ojos de los niños para prevenir la gonorrea oftálmica.

El cobre, en la forma de Sulfato de Cobre al 5%, se utiliza para destruir las algas verdes que crecen en reservorios, estanques, piscinas.

**Mecanismo de Acción de los metales pesados:** La acción antimicrobiana es producida por la acción de los iones de los metales pesados sobre los microorganismos. Cuando estos iones metálicos se combinan con los grupos sulfhidrilo existentes en las proteínas celulares se produce la desnaturalización de las proteínas, las células bacterianas se inactivan, precipitan y finalmente mueren.

### 3.4 Desinfectantes

#### Halógenos

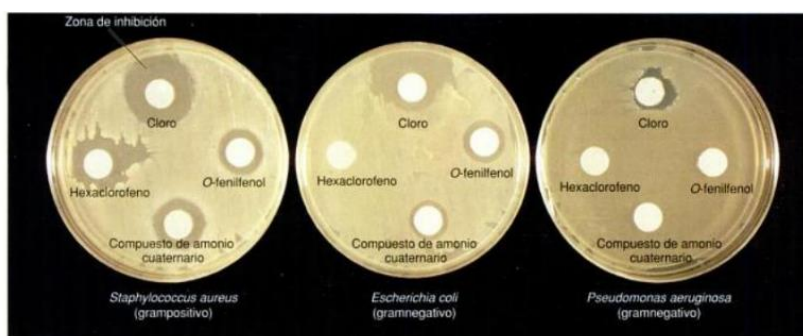
**a) Yodo (I<sub>2</sub>):** Yodo se utiliza como antiséptico cutáneo. Actúa contra toda clase de bacterias. En concentraciones elevadas puede incluso destruir esporas

**Mecanismo de acción:** El Yodo altera la síntesis proteica y las membranas celulares, al parecer por la formación de complejos con los aminoácidos y los ácidos grasos, es decir puede formar compuestos de yodo con las proteínas celulares.

**b) Cloro (Cl<sub>2</sub>):** El Cloro (Cl<sub>2</sub>) como gas o en combinación con otras sustancias químicas, se usa como desinfectante. Puede aplicarse como Cloro gas, hipoclorito sódico o cálcico, todos ellos producen ácido hipocloroso (HClO). Su acción germicida está determinada por el ácido hipocloroso (HClO) que se forma cuando el Cloro se agrega al agua.

El hipoclorito de Sodio (NaOCl) Clorox® se emplea como desinfectante y blanqueador doméstico y como desinfectante en establecimientos de productos lácteos y de procesamiento de alimentos.

**Mecanismo de acción:** El ácido hipocloroso (HClO), es un agente oxidante fuerte que impide el funcionamiento del sistema enzimático celular de los microorganismos. El resultado es la oxidación de materiales celulares y la destrucción bacterias vegetativas y hongos, aunque no esporas. La destrucción de los microorganismos se produce en 30 minutos. La materia orgánica interfiere con la acción de cloro al reaccionar con éste, por ello se añade un exceso de cloro para asegurar la destrucción microbiana.



**FIGURA 7.6** Evaluación de los desinfectantes por el método de difusión con disco. En este experimento los discos de papel de filtro se embeben en una solución del desinfectante y se colocan sobre la superficie de un medio nutritivo sembrado con las bacterias de prueba para producir un crecimiento uniforme. En la parte superior de cada placa las pruebas muestran que el cloro (como hipoclorito de sodio) fue eficaz contra todas las bacterias de prueba pero fue más activo contra las bacterias grampositivas. En la parte inferior de cada placa se observa que los compuestos de amonio cuaternario también fueron más efectivos contra las bacterias grampositivas pero no actuaron contra *Pseudomonas*. A la izquierda de cada placa se observa que el hexaclorofeno sólo fue eficaz contra las bacterias grampositivas. A la derecha de cada placa el O-fenilfenol no fue eficaz contra *Pseudomonas* pero tuvo una eficacia casi igual.

En la presente práctica, se cómo las variaciones de pH, el colorante cristal violeta, los metales pesados y los desinfectantes afectan el crecimiento de *E. coli* y *B. subtilis*.



#### 4. Equipos, Materiales y Reactivos

##### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1			1

##### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos con 3 ml CN a pH 3		1
2	Tubos con 3 ml CN a pH 5		1
3	Tubos con 3 ml CN pH 7		1
4	Tubos con 3 ml CN a pH 9		1
5	Tubos con 3 ml CN a pH 11		1
7	Placas con AN con concentración de Cristal Violeta al 0.01 %		1
8	Placas con AN		1
9	Pinzas de metal		1
10	Tubos conteniendo 2 ml de agua destilada estéril		1

##### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Beaker o frasco con 10 ml de Solución Nitrato de Plata al 1%		1
2	Beaker con 10 ml de Solución Sulfato de Cobre al 5%		1

#### 5. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en latas vacías.
- 4.3 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.

#### 6. Procedimientos:

##### 5.1 Efecto de pH sobre los microorganismos

###### Materiales

1. Cultivos de *E. coli* en Caldo Nutritivo de 24 horas
2. Cultivo de *B. subtilis* en Caldo Nutritivo de 24 horas
3. Tubos con caldo nutritivo estéril previamente ajustadas con HCl 1.0 N y NaOH 1.0 N a valores de pH de 3.0, 5.0, 7.0, 9.0 y 11.0 (1 de cada una) para *E. coli* y *B. subtilis*

###### Procedimiento

1. Rotular cada tubo con sus respectivos pH, colocar sus nombres, fecha y microorganismo inoculado.
2. Usando una pipeta estéril, agregar 0.1 ml de *E. coli* al tubo con caldo nutritivo que tiene pH 3. Hacer lo mismo para los demás tubos con pH 5, 7, 9 y 11.
3. Repetir el paso 2, inocular *B. subtilis* a los tubos con caldo nutritivo previamente graduados su pH.
4. Incubar *E. coli* a 35°C y *B. subtilis* a temperatura ambiente por 5 días.
5. Anotar la cantidad de crecimiento observado al primer, tercer y quinto día, empleando la siguiente escala:  
No hubo crecimiento: -  
Crecimiento moderado: +, ++, +++  
Máximo crecimiento: ++++

##### 5.2 Efecto del colorante Cristal Violeta sobre los microorganismos

###### Materiales

1. Cultivo en caldo nutritivo de *E. coli*, *B. subtilis* de 24 horas
2. 01 placa de agar nutritivo con cristal violeta (concentraciones 10<sup>-3</sup>).



**Procedimiento**

1. Rotular la placa con su respectiva concentración de cristal violeta, colocar sus nombres, fecha y microorganismo inoculado.
2. Dividir la placa en 2 cuadrantes
3. Usando una asa estéril, sembrar en cada cuadrante una cepa distinta: *E. coli* y *B. subtilis* en la placa con concentración  $10^{-3}$  de cristal violeta.
4. Incubar a 37 °C por 24-48 h.
5. Anotar la cantidad de crecimiento observado al primer, tercer y quinto día, empleando la siguiente escala:  
No hubo crecimiento: -  
Crecimiento moderado: +, ++, +++  
Máximo crecimiento: +++++

**5.3 Acción Oligodinámica de los metales pesados**

**Materiales:**

1. Cultivos de *E. coli* y *B. subtilis*
2. 02 placas con Agar Nutritivo.
3. Solución de Sulfato de Cobre al 5 %
4. Solución de Nitrato de Plata al 1%

**Procedimiento:**

1. Dividir las 2 placas de Agar Nutritivo en 3 cuadrantes.
2. Rotular las placas, colocar sus nombres, fecha y microorganismo inoculado.
3. Sembrar por diseminación *E. coli* en la placa 1 y *B. subtilis* en la placa 2.
4. Embeber discos de papel de filtro en una solución de Nitrato Plata al 1% y una solución de Sulfato de Cobre al 5 %.
5. Con pizas estériles, retirar los discos de las soluciones y colocarlo sobre la placa con agar previamente inoculada con *E. coli* y *B. subtilis*.
6. Dejar incubar a 37 °C por 24-48 h.
7. Anotar si existe halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco.

**5.4 Acción de los Desinfectantes**

**Materiales**

1. Cultivos de *E. coli* y *B. subtilis*
2. 02 placas con Agar Nutritivo.
3. Lejía Clorox ®
4. Alcohol Yodado

**Procedimiento**

1. Dividir las 2 placas en 4 cuadrantes.
2. Rotular las placas, colocar sus nombres, fecha y microorganismo inoculado.
3. Sembrar por diseminación *E. coli* en la placa 1 y *B. subtilis* en la placa 2.
4. Embeber discos de papel de filtro en una solución de Lejía Clorox ® y una solución de Alcohol Yodado.
5. Con pizas estériles, retirar los discos de las soluciones y colocarlo sobre la placa con agar previamente inoculada con *E. coli* y *B. subtilis*.
6. Dejar incubar a 37 °C por 24-48 h.
7. Anotar si existe halos de inhibición del crecimiento alrededor de cada disco.





7. Resultados

Tabla 1. Efecto del pH en el crecimiento microbiano

Microorganismo	pH	Día 1
		Crecimiento (+, ++, +++, +++) o (-)
<i>E. coli</i>	3	
	5	
	7	
	9	
	11	
<i>B. subtilis</i>	3	
	5	
	7	
	9	
	11	

Responder las siguientes preguntas:

Que microorganismo creció mejor en un pH ácido? \_\_\_\_\_

Que microorganismo creció mejor en un pH neutro? \_\_\_\_\_

Que microorganismo creció mejor en un pH alcalino? \_\_\_\_\_

Que microorganismo presentó el rango más amplio de pH? \_\_\_\_\_

Que microorganismo presentó el rango menos amplio de pH? \_\_\_\_\_

Tabla 2. Efecto del colorante cristal violeta en el crecimiento microbiano

Medio de Cultivo	Crecimiento (+, ++, +++, +++) o (-)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
AN + Cristal Violeta		

Tabla 3. Acción Oligodinámica de los Metales Pesados en el crecimiento microbiano

Metal Pesado	Presencia de Halos de Inhibición del Crecimiento	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Nitrato de Plata		
Sulfato de Cobre		



Tabla 4. Acción los Desinfectantes en el crecimiento microbiano

Metal Pesado	Presencia de Halos de Inhibición del Crecimiento	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
Lejía Clorox®		
Alcohol Yodado		

8. Conclusiones

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

9. Sugerencias y /o recomendaciones

.....

.....

.....

.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Efecto de los factores físicos y químicos. [on line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
<http://es.slideshare.net/lauram9104/agentes-quimicos-16073956>  
  
[https://books.google.com.pe/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA114&lpg=PA114&dq=accion+del+colorante+cristal+violeta+sobre+el+crecimiento+microbiano&source=bl&ots=QILviGC6pR&sig=JsXxe\\_0peYyNcdCEkBpnYz9Lhpw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjfx5X7y6zMAhUKMyYKHqAowQ6AEILTAD#v=onepage&q=accion%20del%20colorante%20cristal%20violeta%20sobre%20el%20crecimiento%20microbiano&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=Gxmui-vjZBgC&pg=PA114&lpg=PA114&dq=accion+del+colorante+cristal+violeta+sobre+el+crecimiento+microbiano&source=bl&ots=QILviGC6pR&sig=JsXxe_0peYyNcdCEkBpnYz9Lhpw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjfx5X7y6zMAhUKMyYKHqAowQ6AEILTAD#v=onepage&q=accion%20del%20colorante%20cristal%20violeta%20sobre%20el%20crecimiento%20microbiano&f=false)  
  
<http://es.slideshare.net/jcustodio91/guia-ii>



# Guía de práctica N° 9

## Hidrólisis de carbohidratos, proteínas y lípidos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica y comprende la hidrólisis de carbohidratos y proteínas por los microorganismos para su aplicación en procesos de industriales y ambientales.

### 2. Fundamento Teórico

Las enzimas son proteínas muy específicas que realizan sólo una reacción química en el metabolismo de la bacteria. Las complejas reacciones químicas que debe efectuar un microorganismo son producto de la acción colectiva de grupos enzimáticos, que llevan a cabo la síntesis o degradación de cierto sustrato, por ejemplo, la oxidación de la glucosa hasta dióxido de carbono y agua es producto de enzimas encargadas de la glicólisis, el ciclo de Krebs y la cadena respiratoria. Las enzimas son producidas en la célula, pero de acuerdo al lugar donde efectúan su acción se pueden clasificar en endoenzimas y exoenzimas. Las primeras son intracelulares y su función está relacionada con las reacciones de degradación y síntesis de sustratos en el interior de la célula, en tanto que las exoenzimas son excretadas a través de la pared celular con el fin de producir los cambios necesarios en los nutrientes del medio ambiente y así permitir el ingreso de éstos a la célula.

Según sus propiedades, las pruebas bioquímicas se pueden clasificar en:

#### Enzimas extracelulares:

Hidrólisis del almidón  
Hidrólisis de los lípidos  
Hidrólisis de la caseína  
Hidrólisis de la gelatina

#### Enzimas intracelulares:

Fermentación de los carbohidratos  
Reducción de los nitratos  
Test de la ureasa  
Agar tres azúcares (TSI)

### 2.1 Hidrólisis de Carbohidratos

#### A. Caldo base fermentación:

El caldo base con rojo fenol es un medio adecuado para la determinación de fermentación de azúcares; el medio es estable, de composición uniforme y permite hacer determinaciones en base a un viraje de color. Cuando el microorganismo fermenta el azúcar estudiado, el pH del medio baja; entonces el rojo fenol vira de rojo a amarillo. Si no fermenta el azúcar no produce ácido y por lo tanto el color sigue siendo rojo. También se busca conocer si existió la formación de CO<sub>2</sub>, esto se realiza por medio de las campanas de Durham.

En la presente práctica, se sustituye el rojo de fenol por el rojo de metilo, que es un indicador de pH, el cual vira a color amarillo en medio alcalino y color rojo en medio ácido, este indicador se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación ácido mixta.

El caldo base de fermentación se usa para determinar la fermentación de ciertos azúcares (glucosa, lactosa, sacarosa) y producción de gas.

*E. coli* fermenta la glucosa y produce gas.

*B. subtilis* no fermenta glucosa y no produce gas.

#### B. Agar Triple AZÚCAR (TSI)

Medio universalmente empleado para la clasificación de enterobacterias que permite investigar la capacidad de fermentar glucosa, lactosa, sacarosa y liberar sulfuros.

Este medio nos permite determinar:

- Acidez o alcalinidad.
- Producción de gas.
- Producción de H<sub>2</sub>S.



- En este medio, la fermentación de los azúcares, que da lugar a la producción de Ácidos, se detecta mediante el indicador de rojo fenol los cambios de color, amarillo para un medio ácido y rojo para un medio alcalino. El tiosulfato sódico se reduce a sulfuro de hidrógeno el cual reacciona después con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro, negro.
- La degradación de la lactosa ocurre en la parte superior (pico de flauta), de la sacarosa en la parte intermedia y la glucosa es fermentada en la parte profunda (taco) y en condiciones anaeróbicas.
- La presencia de cavidad en el medio es debido a la formación de gas CO<sub>2</sub> producto de la fermentación. (Mendo Rubio M).
- El medio está compuesto por tres azúcares; glucosa al 0.1%, lactosa al 1% y sacarosa al 0,1%. La glucosa a las 6 horas ya ha sido metabolizada, por el microorganismo en estudio, entonces debido a la producción de acidez el medio se torna amarillo.
- Si la glucosa se acaba y el microorganismo es incapaz de degradar la sacarosa y la lactosa, éste, empieza a metabolizar las peptonas que hay en el medio lo que va a producir sustancias alcalinas, las cuales al volatilizar van a hacer que el pico de flauta se torne alcalino y el viraje del medio empieza en el pico de flauta (rojo-fucsia).
- El medio tiene como indicador el rojo fenol el cual en acidez se torna amarillo, y en alcalinidad rojo.
- El sulfato férrico y el tiosulfato de sodio presentes, al reaccionar con el H<sub>2</sub>S van a dar lugar a la formación de FeS el cual da una coloración negra al medio.

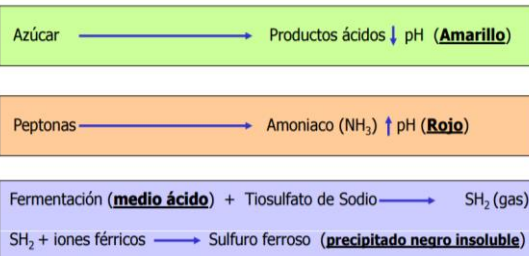
La lectura en este medio es de la siguiente manera:

K/A → Significa que degrada la glucosa, pero no la sacarosa ni lactosa.

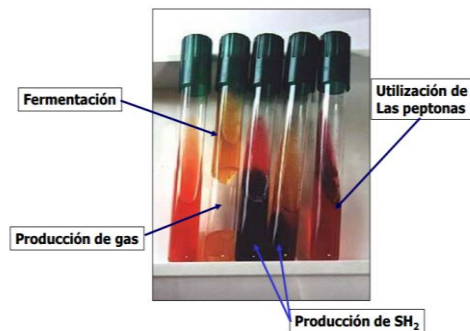
A/A → Hay degradación de glucosa, lactosa y posiblemente sacarosa.

### Triple Sugar Iron Agar (TSI)

Para diferenciar bacterias basadas en su habilidad para fermentar glucosa, lactosa y/o sacarosa, y para producir sulfuro de hidrógeno. Se usa para distinguir entre bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*. Que además son capaces de fermentar glucosa y producir ácidos como producto final.



### Triple Sugar Iron Agar (TSI)



### C. Agar almidón:

El agar almidón se usa para determinar la capacidad de los microorganismos de degradar el almidón, es decir si presenta la enzima amilasa.

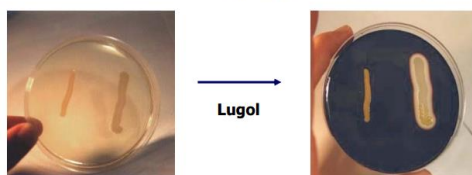
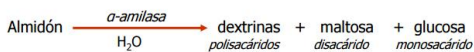
El lugol va a permitir identificar en donde hay almidón por lo tanto si después de agregar el lugol se forma un halo alrededor de la colonia, por lo tanto la bacteria es capaz de degradar al almidón.

*Bacillus subtilis*- Amilasa positivo (Testigo positivo)

*E.coli*- Amilasa Negativo (Testigo Negativo)

### Prueba de hidrólisis de Almidón

Determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizar el almidón mediante enzimas del tipo *amilasas*



(-) (+)



## 2.2 Hidrólisis de Proteínas

### A. Agar Urea:


Es un medio de diferenciación bioquímico para la detección de bacterias productoras de ureasa, en particular de miembros del género *Proteus*.

Determina la capacidad de un organismo de desdoblar la urea a dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) dos moléculas de amoníaco (NH<sub>3</sub>) por acción del enzima ureasa. El amoníaco producido confiere reacción alcalina al medio, lo cual se demuestra por un viraje de amarillo a rojo-púrpura del indicador de pH rojo fenol.

**Prueba de ureasa**

**Determinar la capacidad de un microorganismo de desdoblar la urea, formando dos moléculas de amoníaco por acción de la enzima ureasa**

Urea + 2 H<sub>2</sub>O  $\xrightarrow{\text{ureasa}}$  CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + 2 NH<sub>3</sub> → (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>



**1. No inoculado**

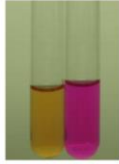
**2. *Proteus vulgaris*: Positivo**

**3. *Escherichia coli*: Negativo**

**Ureasa**


Caldo urea o agar urea de Cristensen.  
Sustrato: Urea.  
Enzima: Ureasa.  
Producto: Amoníaco.  
Indicador: Rojo de fenol.

La hidrólisis de la urea por la enzima ureasa libera dos moléculas de amoníaco que alcaliniza el medio, entonces se vira el indicador de pH, en el caso del rojo de fenol una prueba positiva es color bugambilia.



Prueba negativa

Prueba positiva

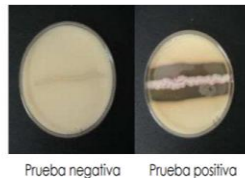


### B. Agar Caseína

Este medio se usa para la investigación de microorganismos proteolíticos. Estos son capaces de degradar la caseína y aparecen con un halo transparente alrededor de las colonias. Si el halo no es visible agregar ácido acético 1N, que refuerza la opacidad del medio por desnaturalización de la caseína y se destaca el halo de degradación.

#### Degradación de la caseína

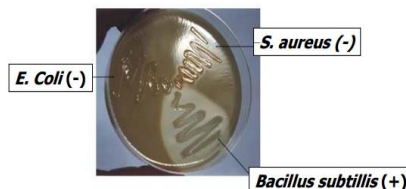
Agar Leche Descremada  
Sustrato: Caseína (proteína).  
Enzima: Caseinasa (Proteasa, exoenzima).  
Producto: Aminoácidos.  
Revelador: No requiere.



Las proteasas son excretadas al medio para la degradación de proteínas, la caseína es la proteína de la leche que le confiere el color blanco, cuando la caseína es hidrolizada desaparece el color blanco alrededor del crecimiento microbiano.

#### Prueba de hidrólisis de caseína

**Determinar la capacidad de producir enzimas proteolíticas capaces de hidrolizar la caseína**



## 2.3 Hidrólisis de Lípidos

### A. Agar Lecitina

Se aprecia la degradación de la lecitina, mediante la formación de un halo claro alrededor de la colonia por acción de la enzima lecitinasa. *Bacillus subtilis*, no posee la enzima lecitinasa, la cual es una fosfolipasa que hidroliza la lecitina de la yema de huevo, cuyos productos precipitan dando un halo blanco alrededor de las colonias.

### B. Agar Tributirina

Algunas bacterias excretan lipasas extracelulares que pueden hidrolizar lípidos grandes en sustratos de bajo peso molecular que son transportados al interior de la célula para ser utilizados en el crecimiento. Este medio de cultivo como sustancia reaccionante contiene a la tributirina, cuya degradación puede reconocerse por la formación de halos claros alrededor de las colonias lipolíticas (presenes en la caspa).

Este medio se utiliza para la identificación de microorganismos lipolíticos. La degradación de la tributirina produce halos de aclaramiento alrededor de las colonias, en contraste con el resto del medio que permanece turbio. La incubación es de hasta 72 horas en condiciones óptimas.



### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Incubadora		1
2	Mecheros bunsen		1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Asas bacteriológicas		1
2	Asas bacteriológicas con punta en aguja		1
3	Tubos 4 ml de CBF + Glucosa con campana durham		1
4	Tubos 4 ml de TSI		1
5	Placas con Agar Almidón.		1
7	Tubos 4 ml de Agar urea		1
8	Matraz con 100 ml de agar nutritivo		1
9	Placas con agar lecitina		1
10	Placas con agar tributirina		1
11	Placas de AN sembrados con E. coli de 24 h		1
12	Placas de AN sembrados con B. subtilis de 24 h		1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Frasco con 20 ml Lugol		1

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.7 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.8 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.9 Tener cuidado cuando se trabaja con E. coli, ya que es patógena para el hombre.
- 4.10 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.

### 5. Procedimientos:

#### Primero

##### 5.1 Hidrólisis de Carbohidratos

###### A. Caldo Base de Fermentación (CBF)

1. Preparar 2 tubos de CBF + Glucosa
2. Sembrar en cada tubo E. coli y B. subtilis.
3. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C
4. Reportar los resultados

###### B. Agar TSI

1. Preparar 2 tubos de TSI
2. Sembrar en cada tubo E. coli y B. subtilis. Para sembrar en el medio, se hace una picadura profunda y al retirar el asa se estría en el pico de flauta. Tapar el tubo con algodón.
3. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C
4. Reportar los resultados

###### C. Agar Almidón

1. Dividir la placa en 2 mitades y sembrar por puntura B. subtilis y E.coli
2. Sembrar en cada placa los siguientes microorganismos:
3. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C.
4. Después de la incubación se debe agregar lugol a toda la placa para hacer la lectura.
5. Observar la presencia o ausencia de halos



**5.2 Hidrólisis de Proteínas**

**A. Agar Urea**

1. Preparar 2 tubos inclinados de Agar Urea
2. Sembrar en cada tubo los cultivos puros de 18-24 horas de *E. coli* y *B. subtilis*
3. Estriar la superficie del pico de flauta. Se recomienda no punzar la capa profunda para controlar el color.
4. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C.
5. Los microorganismos que producen urea, producen un viraje del indicador hacia el rojo y turbidez del medio de cultivo.

**B. Agar Caseína**

1. Dividir la placa en 2 mitades y sembrar por puntura
2. Sembrar en cada placa los siguientes microorganismos: *B. subtilis* y *E.coli*
3. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C.
4. Observar la presencia o ausencia de halos. Los microorganismos proteolíticos son capaces de degradar la caseína y aparecen con un halo transparente alrededor de las colonias. Si el halo no es visible agregar ácido acético 1N, que refuerza la opacidad del medio por desnaturalización de la caseína y se destaca el halo de degradación.

**5.3 Hidrólisis de Lípidos**

**A. Agar Lecitina**

1. Dividir la placa en 2 mitades
2. Sembrar por puntura en cada mitad de la placa *subtilis* y *E.coli*
3. Incubar en aerobiosis, durante 24-48 horas a 35-37 °C.
4. Observar la presencia o ausencia de halos de precipitado insoluble o traslúcido alrededor del área de crecimiento de los microorganismos testeados.

**B. Agar Tributirina**

1. Abrir la placa de Agar Tributirina y rociar caspa de la cabeza de algún compañero
2. Incubar en aerobiosis, durante 48- 72 horas a 35-37 °C.
3. Observar la presencia de halos

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....



**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Lansing M. Prescott. (2004). Microbiología. 5ta ed. Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Lansing M. Prescott. (2004). Laboratory exercises in Microbiology. 5ta ed. Madrid: Mc Graw Hill.





# Guía de práctica N° 10

## Microbiología del suelo

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica microorganismos a partir de muestras naturales de suelo.

### 2. Fundamento Teórico

Los microorganismos del suelo juegan un papel muy importante manteniendo la fertilidad de los suelos. Elementos esenciales para el crecimiento, tales como oxígeno, nitrógeno, carbón, azufre y fósforo, son reciclados por microorganismos del suelo.

#### 2.1 BACTERIAS.

En general, el grupo más numeroso de bacterias en el suelo son los Actinomicetos que resisten condiciones secas y pueden sobrevivir en suelos desérticos.

Los géneros de bacterias más comunes son: *Rhizobium*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*.

- A. **Rhizobium:** Es una  $\alpha$ -proteobacterias, bacilo gram negativo, lleva a cabo la fijación biológica del Nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) del aire y lo transforma en amonio ( $NH_4$ ), el que actúa como un fertilizante natural para la planta ya que proporciona le proporciona nutrientes a la planta. Las plantas que forman simbiosis con las **bacterias fijadoras de nitrógeno** del genero **Rhizobium** son las llamadas leguminosas.

La simbiosis planta –Rhizobium forma nódulos, que son estructuras que se forman en las raíces de las leguminosas, alojan a las bacterias en su interior. En estas estructuras las bacterias se transforman en bacteroides, que son los encargados de fijar el nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amoniaco ( $NH_4$ ) gracias a la enzima nitrogenasa. Debido a esta simbiosis, la planta recibe nitrógeno en forma de aminoácidos que puede utilizar para sí misma, mientras que las bacterias utilizan los carbohidratos que les proporciona la planta producto de la fotosíntesis. No todas las especies de leguminosas forman simbiosis con Rhizobium. Las más conocidas son las que tienen valor comercial y alimentario para el ser humano o para el ganado, como el fríjol, la soja, el chícharo, la lenteja, el haba y la alfalfa.

- B. **Actinomyces:** Los actinomicetos son un grupo de microorganismos unicelulares, muy abundantes en el suelo, aguas estancadas, estiércoles y, en general en lugares donde los restos vegetales se descomponen aeróbicamente. En general prefieren los medios alcalinos y son predominantemente saprófitos aunque se conocen patógenos de plantas, animales domésticos e incluso humanos.

Se pueden atribuir a estos microorganismos las siguientes funciones:

- Descomposición de los residuos animales y vegetales con liberación de ácidos orgánicos de los compuestos carbonados y amoniaco de las sustancias nitrogenadas.
- Participación activa en los procesos de humificación y en particular en la formación de sustancias melánicas.
- Mineralización del humus con la consiguiente liberación de principios útiles para la nutrición de las plantas.
- Secreción de sustancias antibióticas como estreptomina, tetraciclina y otros, a fin de producir equilibrios genéricos o antagónicos específicos hacia los componentes de la microflora bacteriana.
- Acción fitopatógena ejercida por algunas especies sobre plantas de interés agrícola.



Entre los Actinomicetos y microorganismos relacionados se incluyen géneros de interés como: *Nocardia*, *Streptomyces* y *Frankia*. Las bacterias del género *Streptomyces* además de producir antibióticos, producen metabolitos llamados geosminas las cuales dan al suelo su olor característico.

- C. **Bacillus**: Se caracteriza por ser bacilos gram positivos, formadores de endosporas, comprendiendo microorganismos de amplia distribución en la naturaleza. Cumplen una función fundamental en el ciclo de la materia, ya sea degradando compuestos orgánicos o fijando elementos inorgánicos tales como nitrógeno, azufre y fósforo. Algunos pueden estar asociados a hospederos vertebrados o invertebrados pudiendo producir patogenicidad.
- Los miembros de la familia Bacillaceae, usualmente son móviles y poseen flagelos peritricos. De acuerdo a las concentraciones de oxígeno pueden ser aerobios estrictos, microaerófilos y anaerobios facultativos y anaerobios.

## 2.2 HONGOS

Los géneros de hongos varían con el tipo de suelo y sus propiedades fisicoquímicas. Algunos son de vida libre y otros como las Micorrizas, en forma simbiótica con las raíces de plantas. Son comunes, especies de los géneros *Candida*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor*. Algunos hongos son importantes patógenos de plantas atacando trigo y maíz entre otros.

Los hongos del suelo son extremadamente importantes en la descomposición de materia de plantas, degradando y utilizando macromoléculas complejas tales como celulosa y lignina.

## 3 Equipos, Materiales y Reactivos

### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina eléctrica		1
2	Rejilla de asbesto		1
3	Balanza		1
4			1
5			1

### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mecheros de alcohol		1
2	Asas bacteriológicas		1
3	Pinza de madera		1
4	Pinza de metal		1
5	Espátulas		1
7	Botellas de alcohol de 70°		1
8	Embudos de vidrio o plástico		1
9	Gradillas		1
10	Placa con LMA-RC		1
11	Placa con Agar Czapek		1
12	Placa con Agar nutritivo		1
13	Beaker de 100 ml		1
14	Botella con 90 ml de agua destilada estéril	200 ml	1
15	Beaker	500 ml o 1000 ml	1
16	Tubos con 0,01 ml agua destilada estéril	13x100	1
17	Asas de Digraskly		1
18	Cajitas de cintas indicadoras de pH		1
19	Micropita	100 ul	1
20	Tips	100 ul	1

### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			



#### 4 Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.

#### 5 Procedimientos:

##### 5.1 BACTERIAS:

###### A. Aislamiento de *Rhizobium*

###### Primero: Recolección de nódulos radiculares

1. Seleccionar raíces de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) ó trébol, con nódulos que se observan de color rojizo a simple vista.
2. Recolectar las raíces con nódulos en bolsas de primer uso, y trasladarlo al laboratorio para su posterior procesamiento

###### Segundo: Aislamiento de *Rhizobium* (Seguir la metodología de Somasegaran y Hoben)

1. Desinfectar la superficie de los nódulos se realizó por inmersión sucesiva en alcohol al 95% por un minuto
2. Luego sumergir los nódulos en hipoclorito de sodio al 3% durante tres minutos,
3. Posteriormente, enjuagar varias veces con agua destilada estéril (ADE) hasta que no se perciba el olor a lejía
4. A continuación se colocan los nódulos desinfectados sobre una placa Petri y se aplasta el nódulo desinfectado dentro de unas gotas de agua destilada estéril utilizando las pinzas,
5. Luego las muestras del machacado fueron sembradas por estría en placas conteniendo Agar Manitol Extracto de Levadura-Rojo de Congo (LMA-RC)
6. Incubar a 28°C por 2 – 10 días.
7. Observar diariamente el crecimiento de las colonias características de rizobios de acuerdo al manual del CIAT (CIAT, 1988).
8. En el medio LMA-RC, los *Rhizobios* no absorben el Rojo de Congo cuando se incuban en oscuridad, permaneciendo blancas o liegramente rosadas

###### Tercero: Identificación presuntiva de *Rhizobium*:

1. Los cultivos seleccionados fueron analizados tanto en sus características macroscópicas y microscópicas.

**Características macroscópicas:** Se evaluaron el color, el diámetro, la apariencia y la forma de las colonias, la cantidad de goma producida y la textura. Cuando se determinaron las características macromorfológicas se encontró que tenían tamaño variable entre 1 y 7mm, circulares, borde entero, consistencia gelatinosa, de color blanquecino a rosado y tiempo de generación entre 3 y 10 días.

**Características macroscópicas:** Son Gram negativas

###### Cuarto: Reportar los resultados obtenidos:

1. Describir la morfología de las colonias en de *Rhizobium* en LMA-RC
2. Reportar las UFC/g de *Rhizobium* en la dilución sembrada.
3. Observación microscópica de la Coloración Gram

###### B. Aislamiento de *Bacillus*

###### Primero: Recolección de muestras de Rizósfera

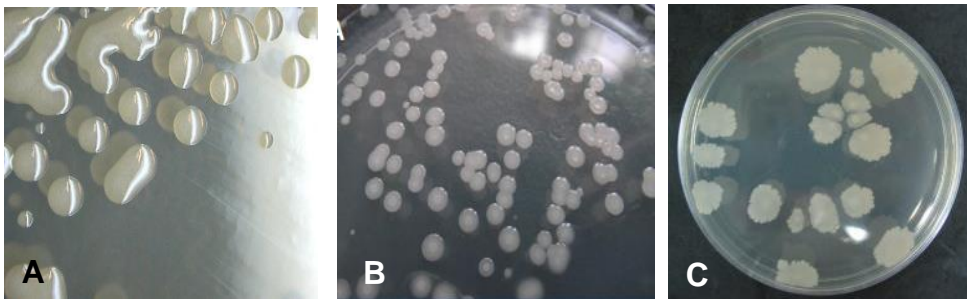
1. Seleccionar muestras de rizósfera (recolectar el suelo alrededor de la raíz, e incluir las raíces de la planta y hojarascas de alrededor)
2. Recolectar la rizósfera en bolsas de primer uso, y trasladarlo al laboratorio para su posterior procesamiento

**Segundo: Aislamiento de Bacillus**

1. Pesar 10 g de tierra agrícola y colocarlo en 90 ml de agua peptona ( $10^{-2}$ )
2. Realizar diluciones seriadas de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  de la muestra en agua peptona.
3. Someter las diluciones  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  a tratamiento térmico en baño maría a  $80^{\circ}\text{C}$  x 15 minutos
4. Luego enfriar bruscamente sometiéndolo a chorro continuo de agua de caño ó agua helada.
5. Sembrar alícuotas de 0.1 mL de cada dilución en agar nutritivo por el método de diseminación en placas de agar nutritivo.
6. Incubar las placas en aerobiosis a  $28^{\circ}\text{C}$  x 24 a 48 horas

**Tercero: Identificación presuntiva de Bacillus:****Características macroscópicas:**

Las colonias de *Bacillus* en agar nutritivo son grandes, opacas, secas, pocas elevadas, a veces corrugadas, mucosas, con bordes irregulares y muchas veces con proyecciones a manera de cabellera despeinada.



**Figura 1.2.** Diferentes morfologías de colonias de *Bacillus* sp en el medio sólido Agar Nutritivo después de 48 horas de incubación a  $28^{\circ}\text{C}$

**Características microscópicas:** Son Bacilos Gram positivos grandes, con extremos generalmente rectangulares y dispuestos en cadena. Si se colorean cultivos de más de 48 horas de incubación pueden observarse bacilos gram negativos.

**Cuarto: Reportar los resultados obtenidos:**

1. Describir la morfología de las colonias de *Bacillus* en Agar Nutritivo
2. Reportar las UFC/g de *Bacillus* en la dilución sembrada.
3. Observación microscópica de la coloración Gram

**C. Aislamiento de Streptomyces****Primero: Recolección de muestras de Rizósfera**

1. Seleccionar muestras de rizósfera (recolectar el suelo alrededor de la raíz, e incluir las raíces de la planta y hojarasca de alrededor) de suelos naturales, preferentemente no abonados o tratados con sustancias químicas (herbicidas, insecticidas u otros).
2. Las muestras deben ser colectadas, con ayuda de cucharas estériles, en frascos estériles con tapa rosca o bolsas de polipropileno de primer uso, que una vez selladas deben ser transportadas de inmediato al laboratorio para su procesamiento.

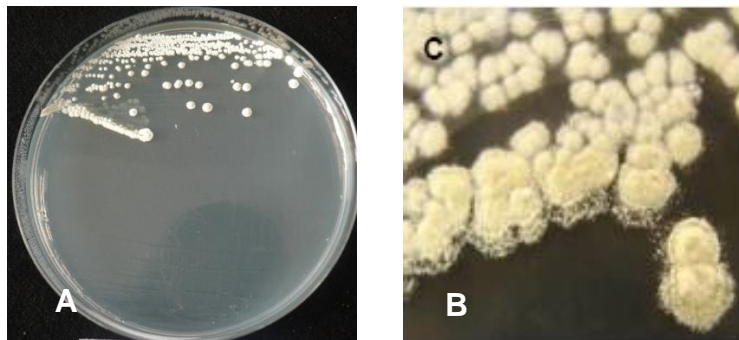
**Segundo: Aislamiento de Streptomyces**

1. Suspender aproximadamente 10 gr de la muestra en 90 ml de agua peptona y homogenizar con bageta hasta disolución total. Realizar diluciones seriadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ )
2. Sembrar por diseminación 0.1 ml de cada uno de los tubos de las dos últimas diluciones en placas de Agar Czapek- Dox.
3. Incubar en aerobiosis a 28-30°C x 3 – 10 días.

**Tercero: Identificación presuntiva de Streptomyces:**

**Características macroscópicas:**

Presenta colonias secas, pulverulentas y con olor característico (olor a suelo húmedo por producción de geosminas), adheridas al agar y algunas de color blanco, o colores oscuros.



**Figura 1.6** A, Colonias aisladas de *Actinomyces* sp. en el medio AN a las 96 horas de incubación a 28 °C. B, Colonia blancas, pulverulentas, secas típicas del género *Actinomyces* sp. en el medio AN después de 96 horas de incubación a 28°C.

**Características microscópicas:** Son Bacilos Gram positivos

**Cuarto: Reportar los resultados obtenidos:**

1. Describir la morfología de las colonias de Streptomyces en Czapeck-Dox
2. Reportar las UFC/g de Streptomyces en la dilución sembrada.
3. Observación microscópica de la coloración Gram

**6 Resultados**

**Tabla 1.** Descripción morfológica los microorganismos aislados.

Microorganism o	Características morfológicas de la colonia						
	Tamaño	Forma	Superficie	Borde	Consistencia	Color	Díametro (mm)
Ejemplo	Mediana <sub>s</sub>	Circular	Convexa	Redondeado <sub>s</sub>	Cremosa	Blanquecina <sub>s</sub>	2



**Tabla 2.** Calculo de Ufc/ml de las muestras analizadas

**Figura 1.** Coloración Gram de las muestras analizadas

1. ....  
.....  
.....

2. ....  
.....  
.....

3. ....  
.....  
.....

**7 Conclusiones**

7.1.....  
7.2.....  
7.3.....

**8 Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.



# Guía de práctica N° 11

## Aislamiento de los hongos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica los distintos tipos de hongos que se pueden encontrar en muestra biológicas y determina su importancia ambiental

### 1. Fundamento Teórico

Los hongos son organismos que se encuentran normalmente en diferentes hábitats (suelo, agua, aire o en sustancias orgánicas en descomposición), de acuerdo a sus exigencias nutricionales y ambientales muchos de ellos se adaptan a la vida parasitaria, causando enfermedades a las plantas, animales o al hombre.

Existen hongos que tienen un hábitat específico, a ellos se les puede clasificar como geofílicos, acuáticos, zoofílicos, fitofílicos o antropofílicos.

Hay diversidad de técnicas que permiten aislar diferentes especies de hongos a partir de variados substratos. En algunos casos es necesario utilizar medios especiales que faciliten el aislamiento y mantenimiento de dichos hongos.

### 2.1 Aislamiento de Zygomycetes

#### A. Aislamiento de Zygomycetes Acuáticos.

Los zigomycetes acuáticos son hongos que normalmente viven en el agua y que se reproducen asexualmente por esporangiosporas. Varían de tamaño, desde unicelulares microscópicas hasta aquellos con micelio fácil de observar.

#### B. Aislamiento de Zygomycetes Acuáticos.

Se aíslan a partir de muestras de estiércol de vacuno.

### 2.2 Aislamiento de Ascomycetes

Como característica común presentan la formación de ascos, dentro de los cuales se lleva a cabo la fusión nuclear y posterior meiosis, seguido de un proceso mitótico. La estructura básica de los ascomicetos, es una típica célula eucariota rodeada de una gruesa pared celular. Pueden estar constituidos por una célula (talo levaduriforme) o formar parte de largos filamentos tubulares denominados hifas (talo miceliar), los cuales están divididos en segmentos mediante septos (o tabiques) transversales.

Los individuos de la división Ascomycota son heterótrofos y obtienen los nutrientes esenciales a partir de otros organismos vivos (parásitos o biótrofos) o muertos (saprofitos). Como saprofitos (o saprobios) juegan un papel muy importante en el reciclaje de material vegetal en descomposición. Como biótrofos, son capaces de formar simbiosis mutualistas con algas (dando lugar a la formación de líquenes), con raíces (micorrizas) o con hojas y/o tallos de plantas (endofitos o endobiontes). Otras asociaciones mutualistas se evidencian con artrópodos, tales como las termitas y hormigas.

### 2.3 Aislamiento de Deuteromycetes

Son llamados **hongos imperfectos** porque no se conoce en ellas la fase sexual de reproducción. De ordinario, se trata de hongos de los filos Ascomycota y Basidiomycota que se reproducen asexualmente. Son de gran importancia para el hombre por ser el filo de mayor patogenicidad humana dentro del Reino Fungi y tienen un gran peso en el campo de la Biotecnología. Entre sus miembros asimismo se encuentran los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, entre otros.



## 2.4 Aislamiento de Basidiomycetes

Constituyen aproximadamente el 30% de los hongos en general, semejan por sus exigencias nutricionales a los ascomycetos. Mayormente son especies saprófitas o parásitas de plantas y muy raramente de animales. La mayoría no forman cuerpos fructíferos en cultivo, aunque muchos producen micelio; por consiguiente es ...

## 3. Equipos, Materiales y Reactivos

### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina eléctrica		1
2	Mallas de asbesto		1
3			1
4			1
5			1

### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Mecheros bunsen		1
2	Asas bacteriológicas en anillo		1
3	Asas bacteriológicas con punta recta		1
4	Botellas con 100 ml de alcohol		1
5	Pizetas con agua destilada		1
7	Placas Petri estériles		1
8	Pinza de metal		1
9	Vaso de precipitación de 100 ml		1
10	Goteros de plástico		1
11	Espátulas Drigalsky		1
12	Placas de Agar Papa Dextrosa PDA + Cloranfenicol		1
13	Placas con agar extracto de lavadura-malta más cloranfenicol (YM)		1
14	Placas con agar Sabouraud glucosado + Cloranfenicol		1
15	Placas con Agar Mac Conkey		1

### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

## 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.





## 5. Procedimientos:

### Primero

#### 5.1 Aislamiento de Zigomycetes

##### 5.1.1 Aislamiento de Zigomycetes Acuáticos

- **Material biológico:** agua de charco (de la zona estancada de arroyo) y **Camada:** moscas, cabellos, uñas

- **Procedimiento:**

1. Depositar aproximadamente 15 ml de agua de charco o acequia en una placa Petri estéril.
2. Con ayuda de una pinza depositar 2 a 3 camadas (moscas, cabellos, uñas), previamente cortadas en trozos pequeños y sometidos a una sumersión rápida en agua hirviendo, sobre la superficie del agua de charco.
3. Dejar en incubación por 3 a 4 días, a temperatura ambiente.
4. Para la observación microscópica recoger con ayuda del asa de siembra y pinzas, la camada (moscas, cabellos, uñas, etc) que se encuentra recubierta por hifas y depositarlas sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. (Anexo 12)
5. Para el aislamiento puede transferirse una camada a un tubo con agar extracto de levadura-almidón. De lo contrario mantener la camada en un frasco que contenga agua destilada estéril con camadas iguales nuevas.
6. Reportar los siguientes resultados:
  - Observación microscópica de las siguientes estructuras: **esporangioforos, esporangios, esporangiosporas, hifas cenocíticas.** (Anexo 01).
  - Observación macroscópica de las colonias fúngicas. (Anexo 10).

##### 5.1.2 Aislamiento de Zigomycetes Terrestres.-

- **Material biológico:** estiércol de vacuno.

- **Procedimiento:**

1. Depositar un pequeño trozo de estiércol, en cada extremo de una placa de agar papa dextrosa.
2. Dejar en incubación por 3 a 4 días, a temperatura ambiente.
3. Observación macromorfológica de las colonias fúngicas
4. Observación microscópica de las colonias fúngicas. Con el asa de siembra en punta roma, recoger parte de la colonia y depositarla sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. Observar al Microscopio a 40 x (Anexo 12)
5. Estos hongos en su mayoría pueden ser aislados en cultivos puros, transfiriendo los micelios o esporangioforos a tubos con agar papa dextrosa.
6. Reportar los siguientes resultados:
  - Observación microscópica de Mucor sp. y señalar las siguientes estructuras: **esporangioforos, esporangios, esporangiosporas, hifas cenocíticas, columnela.** (Anexo 2).
  - Observación macromorfológica de las colonias fúngicas. (Anexo 10).

#### 5.2 Aislamiento de Ascomycetes

##### 5.2.1 Levaduriformes

- **Material biológico:** frutas maduras colocadas previamente en cámaras húmedas por varios días, jugos fruta fermentados, sedimento de bebidas alcohólicas como chicha de jora.

- **Procedimiento:**

1. Se siembra la fruta madura (zona húmeda), jugo de fruta fermentado o bebida alcohólica en una placa de agar extracto de levadura-malta (YM), por agotamiento.
2. Se incuba a temperatura ambiente por 2 a 3 días.
3. Se observa la formación de colonias elevadas, opacas, grandes y bien definidas.
4. Con el asa de siembra en punta roma, recoger parte de la colonia y depositarla sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. Observar al Microscopio a 40 x. (Ver Anexo)
5. Reportar los siguientes resultados:



- Observación microscópica de levaduras como *S. cerevisiae*: Observar formación de ascas con 4 ascosporas haploides. U observar la formación de blastoconidias (Anexo 3)
- Observación macromorfológica de las colonias fúngicas de *S. cerevisiae*. (Anexo 10).

### 5.3 Aislamiento de Deuteromycetes

#### 5.3.1 Filamentosos

- **Muestra:** tubérculos, frutas (cascaras) u hortalizas contaminadas (papa, yuca, naranja, tomate, coliflor, etc.).

**Procedimiento:**

1. Con ayuda de una asa de siembra, depositar una pequeña porción de la muestra sobre un tubo con agar papa dextrosa.
2. Incubar a temperatura ambiente por 3 a 4 días.
3. Hacer el estudio de las colonias que desarrollan.
4. Observación microscopica de la colonia fúngica. Con el asa de siembra en punta roma, recoger parte de la colonia y depositarla sobre una gota de azul de Lactofenol en una lámina y cubrir con una laminilla. Observar al Microscopio a 40 x. (Anexo 12)
5. Reportar los siguientes resultados:
  - Observación microscópica de hongos filamentosos como *Penicillium* y *Aspergillus*: Observar formación de estructuras fúngicas y señalar. (Anexo 5 y 6)
  - Observación macromorfológica de las colonias fúngicas de *Penicillium* y *Aspergillus*. (Anexo 10).

#### 5.3.2 Levaduriformes

- **Muestra:** flora normal de piel.

**-Procedimiento:**

1. Utilizar un hisopo estéril, bien lavado y esterilizado en autoclave.
2. Frotar la superficie de la piel (de preferencia planta y espacios interdigitales de los pies) enérgicamente en sentido circular.
3. Agitar el tapiz sobre un placa con agar Sabouraud glucosado más Cloranfenicol.
4. Incubar a temperatura ambiente, sin invertir la placa, durante 48 horas.
5. Hacer el estudio de las levaduras aisladas.
6. Reportar los siguientes resultados:
  - Observación macromorfológica de las colonias fúngicas de *Candida* sp. (Anexo 10).

### 4. Aislamiento de Basidiomycetes-

- **Material biológico:** planta con carbones (grass) o hongos macroscópicos, comestibles o de vida libre.

**-Procedimiento:**

1. Identificar los Soros cerrados en plantas infectadas.
2. Abrir el soro, con asa de siembra estéril, tomar una muestra de las esporas y sembrar en una placa con agar extracto de malta.
3. Incubar a temperatura ambiente por 3 a 4 días.
4. Observar el desarrollo de colonias y resembrar el micelio en tubos con agar extracto de malta.



**6. Resultados**

- 1. ....  
.....  
.....
- 2. ....  
.....  
.....
- 3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

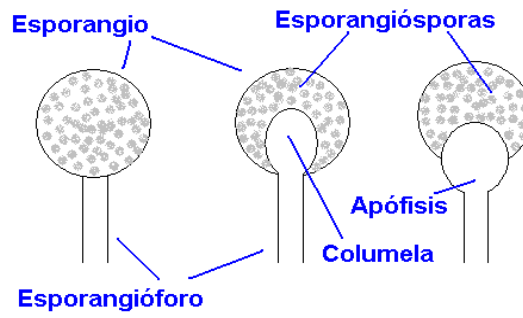
**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

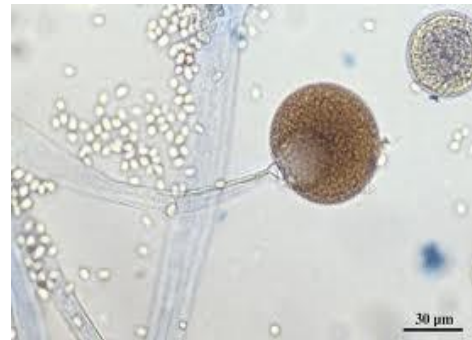
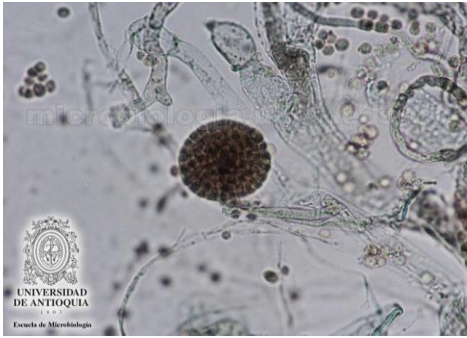
**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.).Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Aislamiento de hongos. [on line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
<https://www.youtube.com/watch?v=Kn-DCPgj3ck>  
<https://www.youtube.com/watch?v=P-kiFFZ7NvU>

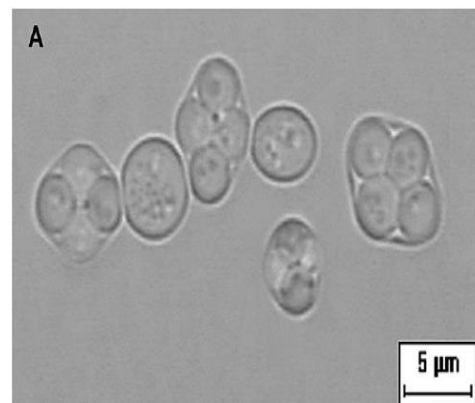
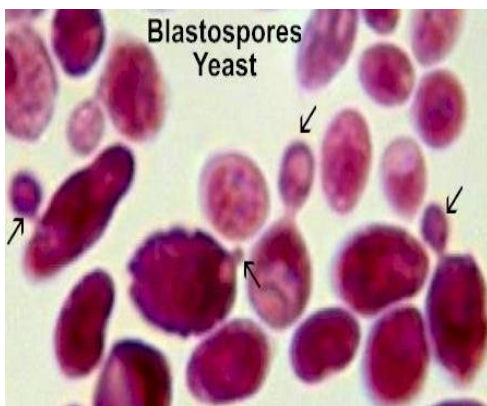
Anexo 01



Anexo 02



Anexo 03

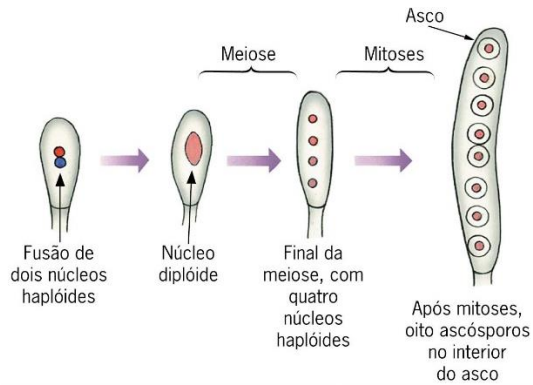


*Saccharomyces cerevisiae*:

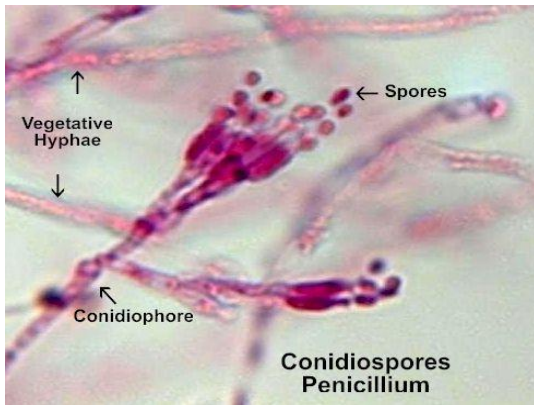
*Blastosporas formadas por gemación.*

*Saccharomyces*: ascas con cuatro ascosporas en sus interior

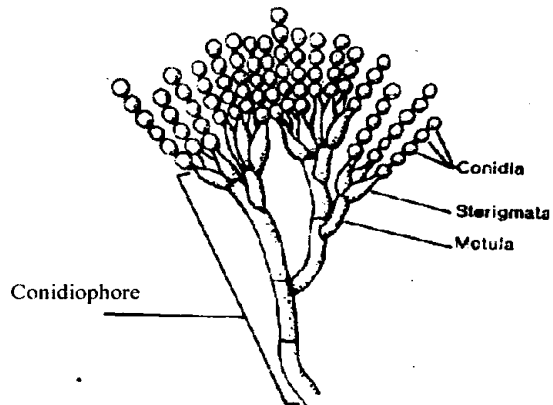
Anexo 04



Anexo 05

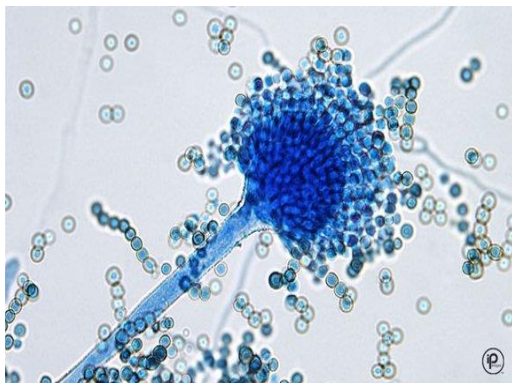


*Penicillium: Conidioforo y conidiosporas o conidias*

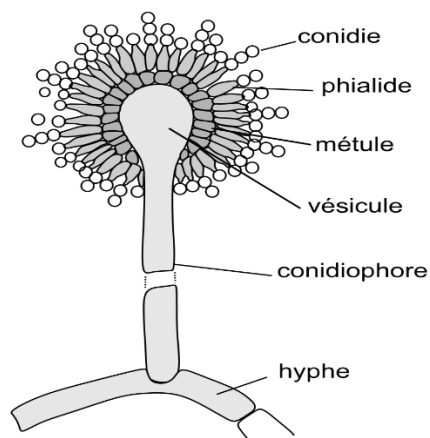


*Penicillium: Conidioforo, médula y conidiosporas o conidias*

Anexo 06

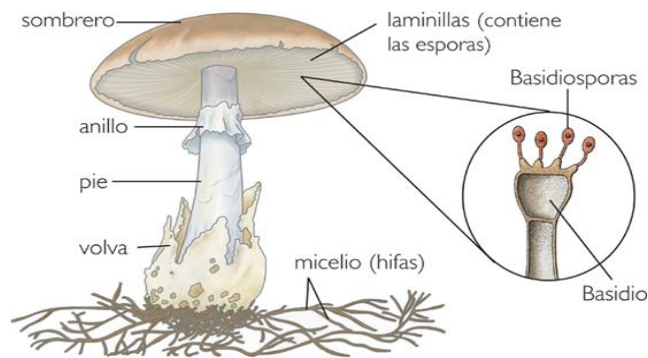


*Aspergillus: Conidioforo y conidiosporas o conidias*



*Aspergillus: Conidioforo, médula y conidiosporas o conidias*

Anexo 07



Anexo 10

**CARACTERÍSTICAS MACROMORFOLOGICAS DE COLONIAS FÚNGICAS**

**COLOR**

- ANVERSO
- REVERSO producción de pigmento

**SUPERFICIE**

- LISA
- ACUMINADA
- CRATERIFORME
- RADIADA
- UMBILICADA
- CEREBRIFORME

**BORDE**

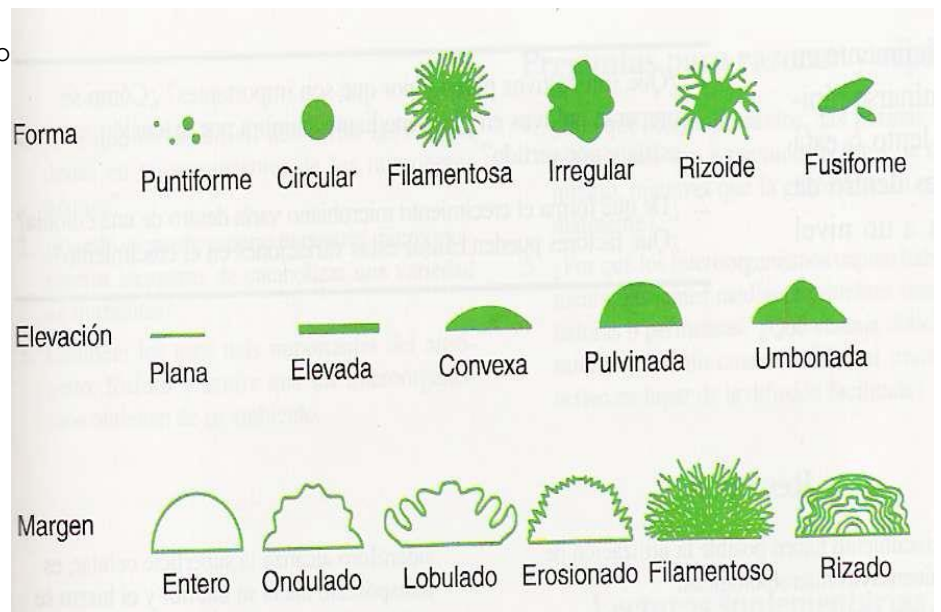
- LISO
- RADIADO
- FESTONEADO
- LOBULADO

**CONSISTENCIA**

- BLANDA
- FILANTE
- ADHERENTE
- LEÑOSA

**ASPECTO**

- CREMOSO
- YESOSO
- CEREBRIFORME
- ALGODONOSO
- AFELPADO
- ATERCIOPELADO



Anexo 12

Coloración con Azul de Lactofenol:

Preparación de la impronta

1. Colocar el material necesario en la campana de seguridad tipo 2A.
2. Seleccionar las colonias para realizar las improntas.
3. Cortar segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm<sup>2</sup>.
4. Pegar los segmentos de cinta en un asa micológica.
5. Poner una gota de azul de lactofenol en el portaobjetos limpio.
3. Abrir la caja Petri cerca del mechero y presionar suavemente la cinta adhesiva sobre la periferia de la colonia.
6. Con el lado adhesivo de la cinta, tocar la parte superior de hongo.
7. Colocar suavemente la cinta sobre la gota de azul de algodón evitando la formación de burbujas para no alterar las estructuras. y poner otra gota de azul de lactofenol.
8. Poner un cubreobjetos sobre la preparación.
5. Dejar reposar durante 3-5 minutos y hacer observaciones en el microscopio con los objetivos de 10X y 40X.
9. Observar con los objetivos de 10x y 40x. Localizar y observar hifas, estructuras especializadas como esporangióforos, esporangios, conidióforos, conidias y rizoides; determinar si las hifas presentan divisiones (septos)

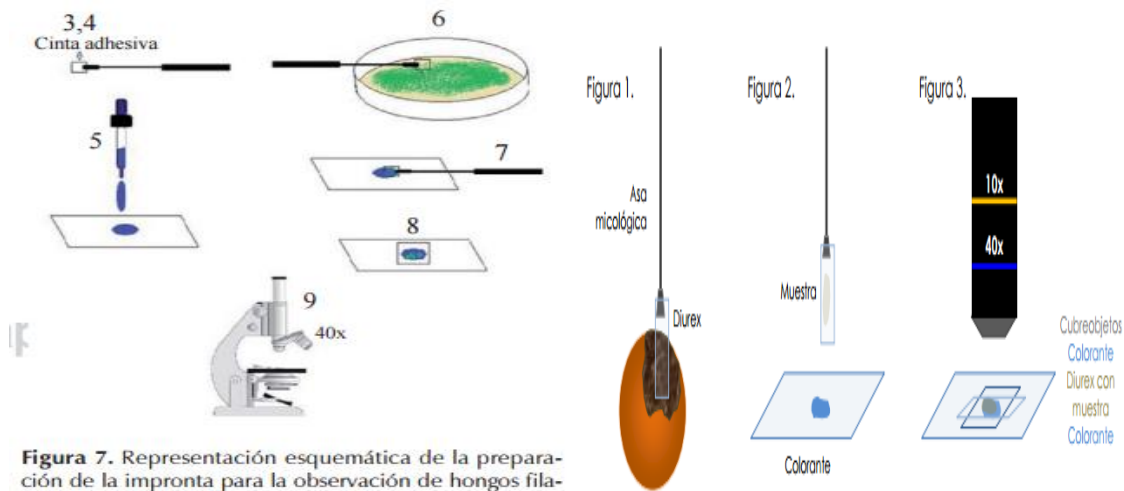


Figura 7. Representación esquemática de la preparación de la impronta para la observación de hongos filamentosos (paso 3 a 9).



Anexo 13

**MEDIO AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)**

Infusión de papa	1000 ml
D-Glucosa	20 g
Agar	15 g

Cloranfenicol 0.4 g

pH: 5.6 ± 0.1

Esterilizar a 121° C y 1lb durante 15 min

Se hace una infusión de papa:

1. Cortar en cuadrados pequeños, con todo y cáscara,
2. Luego pesar 400 g de papa y colocarlo en un litro de agua destilada y hacerlo hervir durante 20 minutos.
3. Luego se filtra el caldo con una gasa con ayuda de un embudo
4. Se añade agua destilada de tal manera hasta completar 1000 ml.

Luego añadir los 20 g de dextrosa y luego los 15 g de agar agar, disolver por calentamiento, esterilizar a 121°C durante 15 minutos y distribuir en tubos de vidrio de 13 x 100 mm en plano inclinado, y en placas Petri.

El medio PDA por sus siglas en inglés, tiene la infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras. El bajo pH (3.5) evita el crecimiento de las bacterias.



# Guía de práctica N° 12

## Diseño de un filtro ecológico de agua

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

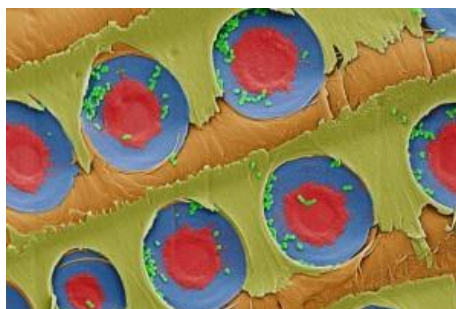
Diseña e implementa un filtro de agua en condiciones de laboratorio

### 2. Fundamento Teórico

Los investigadores del MIT (Instituto tecnológico de Massachusetts) han dado con una solución de baja tecnología para filtrar agua utilizando una simple rama de árbol.

La idea se basa en una serie de estudios que han identificado ciertos compuestos en las membranas que componen la rama de árbol que ayudan a atrapar contaminantes. Un ejercicio simple para determinar esto se puede hacer pelando la corteza de un árbol de pino y haciendo pasar agua a través de él. Este filtro rustico es capaz de atrapar bacterias produciendo así, agua libre de gérmenes y apta para el consumo.

Se realizaron análisis con **una pequeña rama joven de conífera** y es capaz de filtrar cerca del 100% de las bacterias *E. coli* en el agua.



**Figura 1.** Detalle de rama vista al microscopio

Uno de los co-autores del estudio, Rohit Karnik dice que las ramas constituyen un material eficiente y de bajo costo que podrían ayudar a las comunidades rurales que no posean acceso a los sistemas de filtración más sofisticados. Karnik afirma, además, que esta simple idea es práctica porque no es necesario un gran conocimiento técnico para filtrar el agua.

“La idea aquí es que no necesitamos fabricar una membrana, ya que esta se encuentra ya disponible. Uno tan solo debe tomar un pedazo de madera y hacer un filtro con ella “.

El equipo del MIT sigue llevando a cabo más investigaciones para poder especificar el poder de filtraciones de las distintas especies de árboles. Karnik dijo “Hay una gran variedad de árboles, podría haber algunos mucho mejores que otros para este proceso. Lo ideal sería que el filtro fuese una rebanada fina de madera, la cual se puede utilizar durante unos días, y luego reemplazarla casi sin costo. Los investigadores del MIT crearon un prototipo de filtro simple, el cual consiste en una pieza de madera que se ajusta de forma segura en un tubo de plástico o manguera.



**Figura 2.** Sistema de filtro de agua

En este sistema, el filtro procede de una madera joven y verde de una conífera (pino). Por ser madera joven, el agua pasara poco a poco al igual que la savia recorre habitualmente por su interior.

En este sistema se puede filtrar un litro de agua en unas 4 horas, este tiempo es largo pero si estas en el medio de la nada y no tienes muchas más opciones, el saber esto puede ser la diferencia entre vivir o morir, actualmente los científicos se encuentran tratando de perfeccionar técnicas simples para poder dar un uso más masivo a este sistema de filtración. La idea es utilizar una rama de árbol y tener el flujo de agua hacia abajo a través de él para filtrar las impurezas.

En este sistema de filtra bacterias, y sedimentos de tamaño superior a los 200 nanómetros (0,2 micras). La mayoría de los filtros comerciales son de 18 micras o más, por lo que este sistema de filtro usando la rama de una conífera lo filtra prácticamente todo.

¿Como saber cuando cambiar la rama? Cuando deja de gotear es porque el interior se ha tupido de partículas y es necesario usar una nueva.

¿Que tipo de rama se usan? Ramas jóvenes de conífera (pino)



**Figura 3.** Sistema de filtro de agua instalado en campo



### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Pistola de Silicona		
2			
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Agua potable de la ciudad de Huancayo		1
2	Agua potable de zonas alejadas de Huancayo		1
3	Agua turbia (con partículas)		1
4	Rama joven (verde) de un árbol conífera (pino)		1
5	Rama joven (verde) de un árbol angiosperma (eucalipto)		1
6	Manguera de plástico transparente		1
7	Abrazadera		1
8	Bisturí		1
9	Tijera		1
10	Parafilm		1
11	Botella de vidrio de Gaterode estéril		1
12	Papel aluminio		1
13	Botella de plástico		1
14	Placas de EMB		1
			1

#### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Tener cuidado cuando se trabaja con aguas contaminadas
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con el bisturí y la silicona líquida



**5. Procedimientos:**

1. Cortar una rama verde de árbol de pino, eucalipto.
2. Colocar dichas ramas en agua potable hasta el momento de ser usada en la práctica.
3. Quitar la corteza externa de la rama
4. Cortar la rama con una longitud de 5 cm
5. Introducir la rama dentro de la manguera y ajustar con la abrazadera
6. Posteriormente, hacer un agujero en la chapita de la botella de plástico, y por este agujero colocar la manguera con el corcho.
7. Esterilizar la manguera con el corcho ya instalados, y la botella de vidrio
8. Luego de esterilizar, asegurar la manguera conteniendo el corcho con silicona líquida, dejar secar al ambiente.
9. Instalar el sistema de filtro.
10. Dejar que se filtre el agua por 7 días.
11. Evaluar la presencia de *E. coli* en las muestras de agua analizadas en el medio EMB.

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Filtro de agua. [Consulta: 10 de Octubre 2016]. Disponible en web:  
[http://ecocosas.com/eco-ideas/filtro-de-agua-con-una-simple-rama/?utm\\_source=ReviveOldPost&utm\\_medium=social&utm\\_campaign=ReviveOldPost](http://ecocosas.com/eco-ideas/filtro-de-agua-con-una-simple-rama/?utm_source=ReviveOldPost&utm_medium=social&utm_campaign=ReviveOldPost)  
<https://www.youtube.com/watch?v=JZ-vtnKKMEw>  
<https://www.youtube.com/watch?v=WbQRmSdhOIE>



## Guía de práctica N° 13

### Detección de microorganismos productores de enzimas hidrolíticas

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

#### 8.1.1.1 Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica microorganismos del suelo con propiedades enzimáticas hidrolíticas y explica su importancia ambiental.

### 2. Fundamento Teórico

#### 2.1 Microorganismos del Suelo:

La actividad biológica en los suelos se encuentra muy relacionada con las características físicas y químicas del mismo, así como a la presencia de un determinado cultivo vegetal, por lo que se debe estudiar de forma conjunta. Esta compleja relación de interdependencia se mantiene gracias a un intercambio de factores entre planta, suelo y microorganismos. Las plantas aportan minerales y compuestos orgánicos y a la vez reciben de los microorganismos simbiotes y asociados sales minerales, auxinas, citoquininas, vitaminas y aminoácidos (Bioversity, 2003).

El medio donde se desarrollan los microorganismos está dividido en una multitud de microambientes donde las condiciones pueden ser muy diferentes unas de otras, confiriéndole micro heterogeneidad inusual. La dispersión de los microorganismos, con excepción de los fotosintetizantes, sigue la distribución vertical de los nutrientes pero es alterada por varios factores: composición de la atmosfera del suelo, el pH, la humedad, la cantidad de minerales asimilables, la presencia de sustancias antimicrobianas (Carrillo, 2003).

Como los microorganismos del suelo necesitan digerir su alimentación fuera de "su cuerpo" para poder absorberla, excretan sus enzimas en el suelo, por lo tanto el suelo está lleno de enzimas como celulasas, amilasas, etc. que oxidan e hidrolizan la materia orgánica en todas sus formas, a fin de prepararla como alimento para estos. Hablamos pues, del "potencial enzimático" de un suelo, como expresión de su actividad micro orgánica. La cantidad de enzimas en el suelo sería incontrolable si no existiese un equilibrio delicado entre ella y la fase coloidal del suelo, pudiendo los coloides ser tanto de origen mineral (arcilla), como orgánico (humus). El coloide puede absorber la enzima activándola o inactivándola a través de los iones absorbidos en su superficie (Primavesi, 1982). El pH es un determinante en la actividad enzimática y bacteriana ya que cada una de estas actúa en un rango preciso en forma óptima alcanzando su mayor velocidad de reacción, fuera de este pH los procesos químicos ocurren muy lentamente, por lo tanto si el pH es inadecuado estarán prácticamente inactivas, siendo la forma más fácil de influir sobre los microorganismos para alcanzar variaciones importantes en el pH la práctica del encalado, la fertilización mineral, la fertilización orgánica y la rotación de cultivos.

Los principales tipos de micro vida en el suelo son bacterias, hongos, actinomicetos y las algas: Las bacterias son las más activas en la descomposición de la materia orgánica, pero cuando el suelo queda ácido, son substituidas por los hongos, y cuando los suelos son muy secos el trabajo es realizado por actinomicetos (Cantor, 2008).

Los géneros bacterianos más importantes a nivel agrícola por la transformación de compuestos orgánicos e inorgánicos favoreciendo la nutrición de las plantas son: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Azotobacter sp*, *Azospirillum sp*, *Beijerinckia sp*, *Nitrosomonas sp*, *Nitrobacter sp*, *Clostridium sp*, *Thiobacillus sp*, *Lactobacillus sp*, y *Rhizobium sp*, (Delgado, 1997).

Los Hongos producen enzimas y metabolitos que contribuyen al ablandamiento y a la transformación de sustancias orgánicas, también metabolizan compuestos carbonados de muy difícil degradación como las celulosas, las hemicelulosas y las ligninas; degradan azúcares simples, alcoholes, aminoácidos y ácidos nucleicos. Los generos de hongos más importantes asociados a las raíces de las plantas son *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp* y *Trichoderma sp*. El *Aspergillus sp* y el *Penicillium sp* movilizan el fósforo y el nitrógeno del suelo. El *Trichoderma* sostiene la humedad en las raíces en condiciones de sequía (Delgado, 1997).

Los actinomicetos se parecen a los hongos y a las bacterias, sin embargo las características morfológicas de sus células son similares a las de las bacterias. Degradan desde azúcares simples, proteínas, ácidos orgánicos hasta sustratos muy complejos compuestos por hemicelulosas, ligninas, quitinas y parafinas. Por esto son importantes en el proceso de transformación hasta la obtención del humus en el suelo (Carrillo, 2003). Los géneros de actinomicetos del suelo más importantes para la nutrición de las plantas son: *Streptomyces sp*, *Nocardia sp*, *Micromonospora sp*, *Thermoactinomyces sp*, *Frankia sp* y *Actinomyces sp* (Delgado, 1997).

Se han escogido algunas actividades hidrolíticas más frecuentes: **celulásica o celulolítica**, capaz de hidrolizar celulosa o derivados (polímeros lineales de D-glucosa unidos por enlace  $\beta(1,4)$ ); **amilásica o amilolítica**: capaz de hidrolizar almidón (polímero de glucosa con enlaces  $\alpha(1,4)$  y  $\alpha(1,6)$ ); y **proteásica o proteolítica**: capaz de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas.

### A) Microorganismos celulolíticos

La celulosa es un polisacárido lineal formado por residuos de glucosa unidos por enlaces beta 1-4 glucósidos, interaccionando entre sí por medio de puentes de hidrogeno formando microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan la característica de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático (Mejía et al., 2002).



Los organismos capaces de degradar celulosa, se encuentran distribuidos entre: hongos filamentosos y bacterias constituyendo un grupo funcional diverso e importante desde el punto de vista ecológico. Estos organismos poseen enzimas hidrológicas: endo beta- 1,4 glucanasa, exo beta-1,4 glucanasa y beta 1,4 glucosidasa que son inducidas por la presencia de celulosa (Martínez et al., 2001). Los principales factores que intervienen en la degradación de la celulosa en el suelo son: el nivel de nitrógeno disponible, la temperatura, la aireación, la humedad, el pH, la presencia de otros glucósidos y la proporción de lignina en los restos vegetales (Carrillo, 2003).

### B) Microorganismos Amilolíticos

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, poseen enzimas amilasas responsables de la degradación del almidón, hidrolizando los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1-4. Las amilasas se pueden dividir en tres grupos:  $\alpha$  amilasas las cuales rompen al azar los enlaces en el interior del sustrato (endoamilasas);  $\beta$ - amilasas las cuales hidrolizan ordenadamente unidades de maltosa, que liberan unidades de glucosa.

Las  $\beta$ -amilasas están presentes en la mayoría de las plantas superiores, están ausentes en los mamíferos y su existencia en microorganismos es dudosa.



### C) Microorganismos proteolíticos

Los microorganismos proteolíticos fragmentan las proteínas en unidades menores hasta aminoácidos libres es decir son capaces de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas.

La degradación de proteínas en el suelo va seguida de la formación de amonio por la posterior descomposición de los aminoácidos (Carrillo, 2003). La microflora proteolítica actúa en las etapas iniciales de la mineralización de los compuestos orgánicos nitrogenados y a continuación participan los microorganismos amonificantes que rinden amonio como producto final del proceso degradativo. Hay que tener en cuenta, además, que proteólisis y amonificación son dos procesos sucesivos que están asociados, pues existen estirpes de microorganismos que son, a la vez, proteolíticos y amonificantes. La actividad proteolítica en hongos, bacterias aerobias, anaerobias estrictas y facultativas, lo que refleja un grupo funcional muy diverso y heterogéneo. En especies de *Pseudomonas*, *Bacillus*, *clostridium*, *Serratia* y *Micrococcus* hay bacterias que degradan fácilmente proteínas puras. También hay hongos de los géneros los generos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus*, que presentan enzimas proteolíticos. (Pozuelo, 1991).

## 3. Equipos, Materiales y Reactivos

### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanzas (1 balanza/mesa)		1
2	Microscopios		1
3			1
4			1
5			1

### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	botella de alcohol para desinfección de mesas		1
2	Espátulas para pesar		1
3	Tubos de ensayo con 1 ml agua destilada		1
4	Placa con carboximetil celulosa		1
5	Placa con Agar Almidón		1
7	Placa con Agar Caseína		1
8	Micropipeta 1000 ul		1
9	Micropipeta 100 ul		1
10	Tips de 1 ml		1
11	Tips de 0.1 ml		1
12	Asas de Digraskly		1
13	Pinza de Metal		1
14	Mecheros de alcohol		1
15	Asas bacteriológicas con asa en punta		1
16	Asas bacteriológicas con asa en anillo		1

### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Goteros Azul de Metileno		



#### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.

#### 5. Procedimientos:

##### Primero: Recolección de Rizosfera

1. Identificar un hábitat favorable (plantas) donde se desarrollen microorganismos celulíticos, aminolíticos y proteolíticos.
2. Seleccionar 5 plantas para extraer las muestras de rizósfera
3. De cada planta, extraer el sistema radicular y agitar suavemente para desprender el suelo adherido a las raíces (rizosfera) y pesar 20 g de Rizosfera. Hacer el mismo procedimiento para las demás plantas.
4. Finalmente, obtener una muestra compuesta de 100 g de rizosfera a partir de los 5 plantas seleccionadas.

##### Segundo: Procesamiento de las muestras

1. Marcar cada placa con el número de la muestra, la dilución y la fecha.
2. Pesar 10 g de tierra de jardín, y colocar en 90 ml de agua destilada estéril. (Dilución -1)
3. Homogeneizar la muestra, agitando el frasco varias veces.
4. Hacer diluciones seriadas al décimo de las muestras en condiciones de esterilidad.  
**Tubo 1:** dilución (-2): 1 ml muestra + 9 ml agua destilada estéril  
**Tubo 2:** dilución (-3): 1 ml dil (-1) + 9 ml agua destilada estéril  
**Tubo N:** dilución (N): 1 ml dil. (N-1) + 9 ml agua destilada estéril
5. Tome una pipeta estéril y transferir 1 ml de la muestra a un tubo con 9 mL de ADE (Tubo 1)
6. Con otra pipeta estéril aspire y expela la dilución del tubo 1 varias veces para homogeneizar.
7. Con esa misma pipeta traspase 1 mL al tubo 2
8. Descarte la pipeta y repita la operación para cada uno de los tubos con 9 mL.
9. Luego de la última transferencia, tome otra pipeta y a partir de la última dilución, homogenice e inocule con 0,1 mL una caja de Petri con el medio de cultivo correspondiente:  
**Agar carboximetilcelulosa (CMC)**- actividad celulásica;  
**Agar almidón (ALM)**-actividad amilásica;  
**Agar leche (AL)** -actividad proteolítica.
10. Disemine con la espátula de vidrio los 0.1 ml inoculados en las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  por la superficie del medio, manteniendo la caja semiabierta.
11. Esterilice la espátula con alcohol y llama cada vez que cambia de caja. Tenga la precaución de mantener el contenedor de alcohol alejado de la llama; si se prendiera fuego tápelo con una caja de Petri para apagarlo.
12. Etiquete las cajas, una vez secas las placas, lleve a incubar invertidas.
13. Las placas se incuban 24 - 48 horas en estufa a 30°C.
14. Contar las colonias obtenidas en cada placa.
15. Elegir la dilución en la cual se hayan obtenido entre 30 y 300 colonias y calcular las unidades formadoras de colonias (ufc) según la fórmula. Expresar los resultados en UFC/ml



**Tercero: Revelado de los resultados****A) Actividad celulásica****Tinción con Rojo Congo de las placas con CMC**

- Añadir 10 ml de Rojo Congo 0,1 % a cada placa
- Dejar unos 20-30 minutos
- Desteñir con 10 ml de NaCl 1M durante otros 20 minutos, eliminando luego el tinte diluido que sobra

**Resultado:** Tras la tinción las colonias productoras se detectan por presentar un halo amarillento a su alrededor correspondiente a la hidrólisis de la celulosa. El resto de la placa se observa de un color rojo intenso.



*Bacillus* - Celulasa positivo (Testigo positivo)  
*E.coli*- Celulasa Negativo (Testigo Negativo)

**Prueba positiva:** Colonias celulolíticas son aquellas colonias que muestran un área clara alrededor de color amarillo, por degradación de celulosa).

- Hacer el conteo de solamente las colonias celulolíticas (colonias que muestran un área clara alrededor de color amarillo).
- Seleccionar las placas que contengan entre 30-300 UFC celulolíticas.
- Determinar el número de bacterias celulolíticas/ g de muestra

**B) Actividad amilásica****Tinción de la placa que contiene almidón con lugol (I<sub>2</sub>/IK)**

- Añadir unas gotas de lugol a la placa hasta cubrirla y dejar que penetre en el agar.
- El almidón de la placa se tiñe de color violeta, apareciendo halos claros alrededor de las colonias correspondientes a la degradación del almidón. (Con el paso del tiempo la oxidación hace que se produzca una decoloración progresiva)



*Bacillus* - Amilasa positivo (Testigo positivo)  
*E.coli*- Amilasa Negativo (Testigo Negativo)

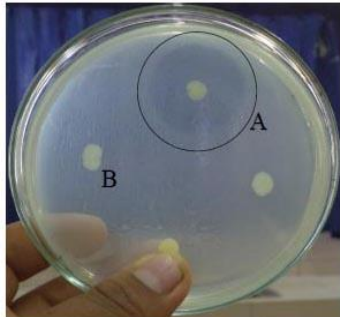
\* **Prueba positiva:** Colonias amilolíticas presentan halos de degradación (marrones o transparentes) alrededor de las colonias sobre fondo azul que indica la presencia de la enzima amilasa.

\* **Prueba negativa:** ausencia de halos; coloración azul alrededor de las colonias (presencia de complejo Iodo-almidón), que indica ausencia de la enzima amilasa.

- Hacer el conteo de solamente las colonias amilolíticas (muestras un área clara alrededor de la colonia).
- Seleccionar las placas que contengan entre 30-300 UFC amilolíticas.
- Determinar el número de bacterias amilolíticas/ g de muestra

**C) Actividad proteolítica**

Observación directa en las placas con leche de la aparición de un halo transparente alrededor de las colonias productoras de proteasas, correspondiente a la degradación de proteínas de la leche. (La definición del halo puede mejorarse mediante la adición de ácido tricloacético (TCA) al 10%)



*Bacillus* - Amilasa positivo (Testigo positivo)  
*E.coli*- Amilasa Negativo (Testigo Negativo)

**Figura 2.** Agar leche cultivado con enterobacterias nativas durante 48 horas. (A) Halo de hidrolisis (zona clara) alrededor de la colonia evidenciando la actividad proteolítica. (B) Colonia sin halo de hidrolisis considerada como no proteolítica.

- Hacer el conteo de solamente las colonias proteolíticas (las que muestren un área clara alrededor, por degradación de caseína).
- Seleccionar las placas que contengan entre 30-300 UFC proteolíticas.
- Determine el número de bacterias proteolíticas/ g de muestra

Para determinar el tamaño de la población se calcula usando la siguiente fórmula:

$$UFC/ml = \frac{N \times \text{Inversa de dilución}}{Vol}$$

donde:

- UFC** : unidades formadoras de colonias
- N** : número promedio de colonias obtenidas para una dilución dada.
- vol**: volumen de inóculo (ml)
- Inversa de dilución**: Inversa de la dilución

**6. Resultados**

- 2. ....
- 3. ....
- 4. ....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....



**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, LM. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Efecto de los factores físicos y químicos. [on line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362015000100001&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362015000100001&script=sci_arttext)  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis274.pdf>  
[http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3777/1/Tamariz\\_ac.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3777/1/Tamariz_ac.pdf)  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/bitstream/123456789/1568/1/uy24-16513.pdf>



**ANEXOS**

**Anexo 01**

**PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACION DEL AGAR CARBOXIMETILCELULOSA (CMC)**

**Formula:**

Carboximetilcelulosa.....	10g
Extracto de levadura.....	2.5g
Peptona.....	2.5g
Sulfato de amonio .....	0.5g
Cloruro de calcio, 6 H <sub>2</sub> O.....	0.5g
Fosfato monobásico de potasio .....	0.1 g
Fosfato difásico de potasio .....	0.1 g
Agar- agar .....	15 g

Ajustar el pH a 7

**Anexo 02**

**PROCEDIMIENTO DE AGAR ALMIDON**

**Fórmula:**

Ingredientes por litro.

- Peptona.....10g
- NaCl.....5g
- Extracto de carne.....5g
- Almidón soluble.....2g
- Agar-agar.....20g
- Agua destilada.....1000ml

Disolver en el agua todos los componentes y ajustar el pH a 7.2.

Estilizar en la olla a presión durante una hora y posteriormente repartir en placas de Petri estériles.

**Anexo 03**

**PROCEDIMIENTO PARA EL AGAR CASEINA**

**Formula:**

Peptona .....	5 g
Extracto de carne.....	3 g
NaCl .....	5 g
Caseína .....	2,5 g
ClCa <sub>2</sub> .....	0,05 g
Agar Agar.....	15 g
Agua destilada .....	1000 ml



# Guía de práctica N° 14

## Microbiología del agua

Sección : .....Docente: .....

Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Identifica y analiza el método para identificar Coliformes en muestras de agua

### 2. Fundamento Teórico

Debido a que un gran número de enfermedades son transmitidas por vía fecal-oral utilizando como vehículo los alimentos y el agua, es necesario contar con microorganismos que funcionen como indicador de contaminación fecal. Estos deben de ser constantes, abundantes y exclusivos de la materia fecal, deben tener una sobrevivencia similar a la de los patógenos intestinales y deben ser capaces de desarrollarse extraintestinalmente.

El grupo coliforme constituyen un grupo heterogéneo con hábitat primordialmente intestinal para la mayoría de las especies que involucra, es constante, abundante y casi exclusivo de la materia fecal, su capacidad de sobrevivencia y multiplicación fuera del intestino también se observan en aguas potables, por lo que este grupo se utiliza como indicador de contaminación fecal en agua; encontrándose que mientras mayor sea el número de coliformes en agua, mayor será la probabilidad de estar frente a una contaminación reciente. Cuando los coliformes llegan a los alimentos, no sólo sobreviven, sino que se multiplican, por lo que en los alimentos el grupo coliforme adquiere un significado distinto al que recibe en el agua. Cuando los productos alimenticios han recibido un tratamiento térmico (pasteurización, horneado, cocción, etc.), estos microorganismos se utilizan como indicadores de malas prácticas sanitarias. Para su estudio, se dividen en dos grupos. El grupo de bacterias **coliformes totales** el cual comprende a todos los bacilos Gram-negativos aerobios o anaerobios facultativos, no esporulados, que fermentan la lactosa con producción de gas en un lapso máximo de 48 h. a  $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Este grupo está conformado por 4 géneros principalmente: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. El grupo de **coliformes fecales**, está constituido por bacterias Gram-negativas capaces de fermentar la lactosa con producción de gas a las 48 h de incubación a  $44.5 \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ . Este grupo incluye la especie *Escherichia coli*.

*Escherichia coli* es un bacilo corto Gram negativo que se encuentra clasificado dentro de la familia Enterobacteriaceae (bacterias entéricas), existe como comensal en el intestino delgado de humanos y animales. Sin embargo, existen algunas cepas de *E. coli* patógenas que provocan enfermedades diarreicas.

La demostración y el recuento de organismos coliformes, puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales.

**FUNDAMENTO** La determinación de microorganismos **coliformes totales** por el método del Número más Probable (NMP), se fundamenta en la capacidad de este grupo microbiano de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas al incubarlos a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 24-48 h., Esta determinación consta de dos fases, la **fase presuntiva** y la **fase confirmativa**.



En la **fase presuntiva** el medio de cultivo que se utiliza es el **caldo lauril Triptosa** el cual permite la recuperación de los microorganismos dañados que se encuentren presentes en la muestra y que sean capaces de utilizar a la lactosa como fuente de carbono.

Durante la **fase confirmativa** para determinar del número más probable (NMP) de **Coliformes totales** se emplea como medio de cultivo **caldo lactosado bilis verde brillante (BRILLA)** el cual es selectivo y solo permite el desarrollo de aquellos microorganismos capaces de tolerar tanto las sales biliares en el medio BRILLA. La determinación del número más probable (NMP) de **Coliformes fecales** se realiza a partir de los tubos positivos de la prueba presuntiva y se fundamenta en la capacidad de las bacterias para fermentar la lactosa y producir gas cuando son incubados a una temperatura de  $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  por un periodo de 24 a 48 h en el medio EC.

Finalmente, la **Fase Completa** para la búsqueda de *Escherichia coli* se realiza a partir de los tubos positivos de **caldo EC**, los cuales se siembran por agotamiento en medios selectivos y diferenciales como Agar Mac Conkey, Agar eosina azul de metileno (**EMB**) y posteriormente realizando las pruebas bioquímicas básicas (IMViC) a las colonias típicas.

#### **Técnica de tubos múltiples.**

La prueba de tubos múltiples constituye un método estandarizado para la determinación de la densidad de bacterias indicadoras de contaminación. En esta prueba, réplicas de tubos de medios de cultivo específicos, son inoculados con diluciones decimales de una muestra dada de agua. La densidad bacteriana es calculada por medio de fórmulas de probabilidad que estiman el número más probable de bacterias para producir ciertas combinaciones de resultados positivos (como turbidez o formación de gas) y negativos.

Cuando se trata de agua no potable, se inoculan los tubos con cantidades decimales del agua. La selección de éstas va a depender de la densidad probable de coliformes y la experiencia del analista. Esta técnica puede también ser usada para sedimentos, haciendo una dilución de  $10^2$ . Se pesan 50 gr de muestra (sólida o semisólida) y se adicionan 450 mL de agua de dilución y se agita por 1 ó 2 minutos.

Los resultados del análisis de los tubos de réplica y diluciones son reportados en términos de Número Más Probable (NMP).

El valor numérico de la estimación del contenido bacteriano es determinado por la dilución que mostró ambos resultados positivos y negativos.

La mejor evaluación de la calidad sanitaria del agua depende de la interpretación de resultados de la técnica de los tubos múltiples o de otros métodos, posiblemente más precisos y de toda la demás información relativa al agua que pueda ser obtenida por reconocimiento de la zona.

La mayoría de las tablas se basan en el uso de tres volúmenes diferentes de muestra en orden decimal decreciente (10, 1, 0.1, 0.01 mL etc.). Existen tablas para diferente número de réplicas de cada dilución. Las más comunes son de 5 y 3 réplicas por dilución respectivamente. Sólo si en los resultados aparecen tubos positivos y negativos cuando menos en una dilución, el número más probable proporciona un estimado significativo de la densidad bacteriana. La precisión de la estimación del NMP se incrementa al aumentar el número de réplicas por dilución.



### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Cocina electrica		1
2	Rejilla de asbesto		1
3	Incubadora		1

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Micropita de 1000 ul		1
2	Tips para 1000 ul		1
3	Beaker de 1000 ml		1
4	Pipeta de vidrio esteril de 10 ml		1
5	Pipeta de vidrio esteril de 1 ml		1
7	Tubos de tapa rosca con campana Durham con 10 ml Lauril Sulfato doble concentrado		1
8	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml Lauril Sulfato		1
9	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml de BRILLA		1
10	Tubos con tapa rosca con campana Durham con 10 ml de EC		1
11	Placas de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB)		1
12	Asas bacteriológicas (01 asa/mesa)		1
13	Botellas de alcohol de 70°		1
14	Pinza de metal		1
15	Gradillas para que ingresen tubos de tapa rosca		1
16			1
17	Botella con 90 ml de agua destilada estéril		1
18	Tubos de 13x 100 con 3 ml de agua destilada estéril		1

#### 3.3. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.3 Mantenga todos los tubos de cultivo en posición vertical en gradillas.
- 4.4 Tener cuidado cuando se trabaja con *E. coli*, ya que es patógena para el hombre.
- 4.5 Tener cuidado con las llamas del quemador Bunsen y los bucles de las asas bacteriológicas al rojo vivo.



## 5. Procedimientos:

### Primero

**Muestra:** Agua ó hielo

#### A. Prueba Presuntiva: Numeración de Coliformes

Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces para lograr una distribución uniforme de los microorganismos. Dependiendo del origen de la muestra y el contenido bacteriano esperado preparar diluciones.

Agitar la muestra y transferir volúmenes de acuerdo con el cuadro 1, a cada uno de los tubos con **caldo lauril sulfato de sodio** que se hayan seleccionado. Agitar los tubos para homogeneizar la muestra.

**CUADRO 1. Preparación de inóculo con caldo lauril sulfato de sodio**

INOCULO (mL)	CANTIDAD DE MEDIO POR TUBO (mL)	VOLUMEN DE MEDIO MAS INOCULO (mL)	CALDO LAURIL TRIPTOSA REQUERIDO g/L	CONCENTRACIÓN
1	10 o más	11 o más	35,6	1 X
10	10	20	71,2	2 X
10	20	30	53,4	1.5 X
20	10	30	106,8	3 X
100	50	150	106,8	3 X
100	35	135	124.6	3.5 X
100	20	120	142.4	4 X

1. Transferir 10, 1 y 0.1 ml de la muestra previamente homogeneizada a tubos con 10 ml de caldo lauril sulfato triptosa. Utilizar 3 tubos por cada muestra de 10, 1 y 0.1.

2. Incubar los tubos a 35-37°C durante 24 a 48 horas. Examinar los tubos a las 24 h., observar si hay formación de gas (desplazamiento del medio en la campana de Durham); si no se observa producción de gas, incubar 24 h. más.

3. Escoger los tubos positivos (aquellos que presentan gas y turbidez y anotar el resultado). Calcular el **NMP para Coliformes/ 100 ml (Ver Tabla N°3)**

### Segundo

#### B. Prueba Confirmatoria: Numeración de Coliformes Totales

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de Caldo Lauril Triptosa obtenido durante la prueba presuntiva, a tubos que contiene 10 ml de caldo de bilis verde brillante (BRILLA), con campana de Durham.
- Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
- Incubar a 35 ± 2°C durante 24 a 48 h.
- Registrar como positivos aquellos tubos en donde se observe turbidez (crecimiento) y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48 h.
- Consultar la **Tabla 3** de NMP para conocer el número más probable NMP Coliformes Totales/100 mL.





Tercero

**C. Prueba Confirmatoria: Numeración de Coliformes fecales**

- Transferir de 2 a 3 asadas de cada tubo positivo de Caldo Lauril Triptosa obtenido durante la prueba presuntiva a tubos con 10 ml de caldo EC.
- Agitar suavemente los tubos para su homogeneización.
- Incubar a  $44.5 \pm 0.1^\circ\text{C}$  en incubadora o un baño de agua con circulación durante 24 a 48 h.
- Seleccionar como positivos todos los tubos en donde se observe crecimiento y producción de gas después de un período de incubación de 24 a 48 h.
- Consultar la **Tabla 3** para conocer el número más probable NMP coliformes fecales/ 100 mL.

**D. Prueba confirmativa para *Escherichia coli***

- Tomar una asada de cada uno de los tubos positivos de caldo EC y sembrar por estría cruzada en agar eosina azul de metileno (EMB) para su aislamiento.
- Incubar las placas invertidas a  $35^\circ\text{C}$  por 18-24 h.
- Seleccionar dos colonias de cada placa con la siguiente morfología colonial: Colonias con centro negro, planas con o sin brillo metálico. Si no hay colonias con morfología típica, probar una o más colonias lo más parecido *E. coli* de cada placa y sembrarlas en agar cuenta estándar para realizar las pruebas de morfología microscópica y pruebas bioquímicas.
- Incubar las placas a  $35^\circ\text{C}$  por 18-24 h.
- Hacer un frotis y teñirlo por Gram. Observar al microscopio la presencia de bacilos cortos o cocobacilos Gram-negativos.

**Todos los cultivos que:**

- Sean bacilos o cocobacilos Gram-negativos, no esporulados, fermenten la lactosa con producción de gas dentro de las 48 h. a  $35^\circ\text{C}$ . son consideradas como *Escherichia coli*.
- Para calcular el NMP de *E. coli* utilizar a proporción de los tubos positivos de la prueba confirmatoria en caldo EC.

**CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS**

Calcular la densidad microbiana con base en el número más probable conforme al procedimiento señalado en la tabla 1, para estimar la población de bacterias coliformes totales, bacterias coliformes fecales y *Escherichia coli* en muestras de agua.

**Determinación del número más probable (NMP)**

Codificar los resultados de la serie de diluciones en los tubos de la siguiente manera: si inicialmente son inoculadas 5 porciones de 10 mL de muestra, 5 de 1 mL y 5 de 0,1 mL, y los resultados positivos fuesen respectivamente 5, 3 y 0, éstos se codificarán como 5-3-0. El código obtenido es buscado en la tabla del NMP (Tabla 2 y 3) y se registra directamente el NMP en 100 mL.

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....



**7. Conclusiones**

7.1.....

7.2.....

7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....  
.....

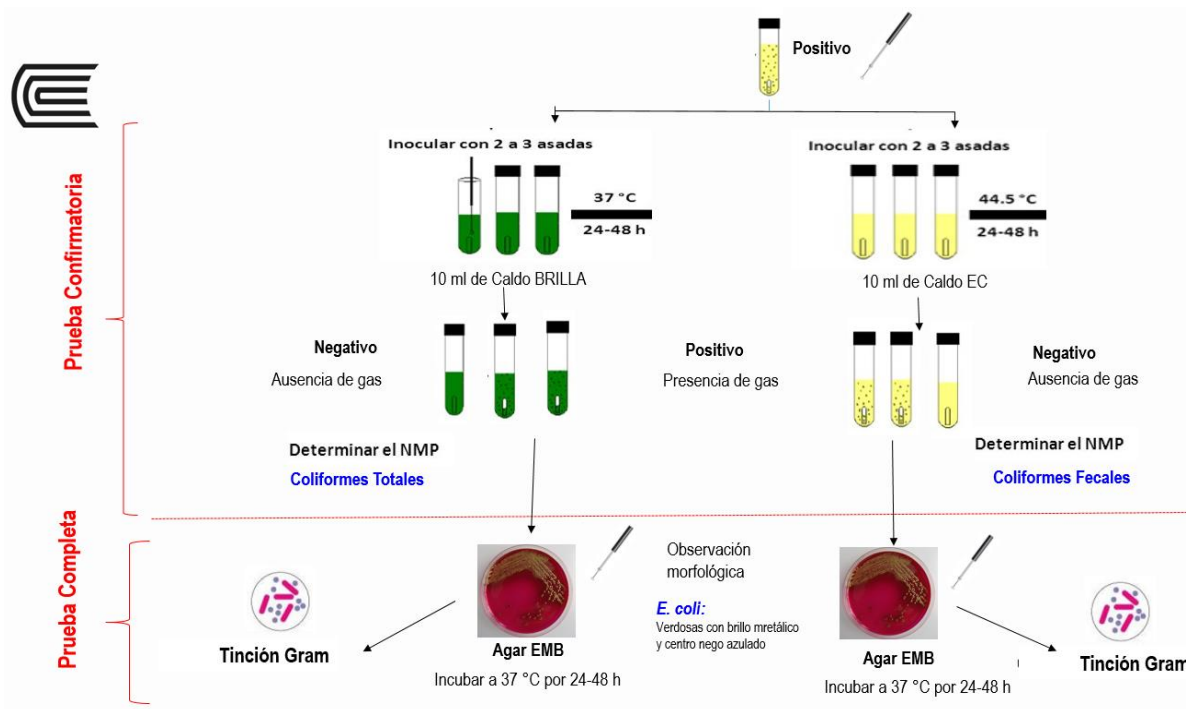
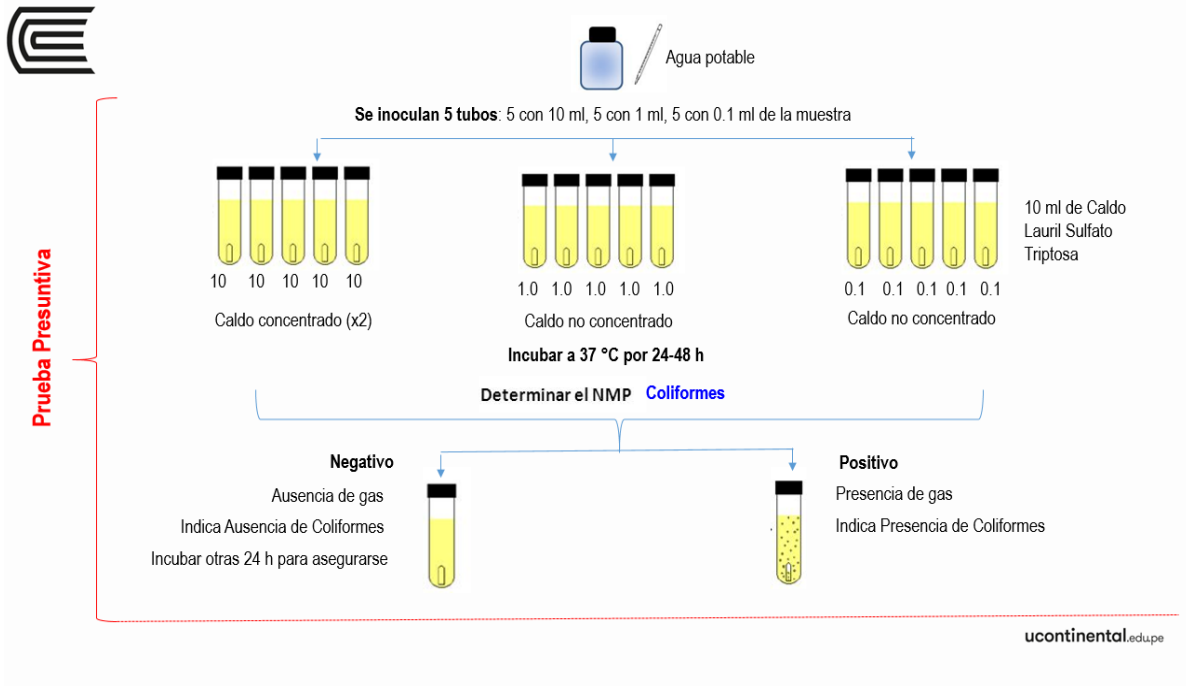
**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L.M. (2004). Microbiología (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill. Disponible en Biblioteca UC: 616.01 / P85 2004)
- Prescott, L.M. (2004). Laboratory exercises in microbiology (5ª ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Efecto de los factores físicos y químicos. [on line. [Consulta: 10 de agosto de 2016]]. Disponible en web:  
[http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis\\_Agua\\_NMP\\_22309.pdf](http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Analisis_Agua_NMP_22309.pdf)  
[http://www.upemor.edu.mx/labo/tarchivos/archivos/HEAL/practica\\_7.pdf](http://www.upemor.edu.mx/labo/tarchivos/archivos/HEAL/practica_7.pdf)



### ANEXO 01

#### NUMERACION DE COLIFORMES EN MUESTRAS DE AGUA





**ANEXO 02**  
Tablas de NMP para tres y cinco tubos.

Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE COMPLIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 2		
0 - 0 - 1	2	< 0.5	7
0 - 1 - 0	2	< 0.5	7
0 - 2 - 0	4	< 0.5	11
1 - 0 - 0	2	< 0.5	7
1 - 0 - 1	4	< 0.5	11
1 - 1 - 0	4	< 0.5	11
1 - 1 - 1	6	< 0.5	15
1 - 2 - 0	6	< 0.5	15
2 - 0 - 0	5	< 0.5	13
2 - 0 - 1	7	1	17
2 - 1 - 0	7	1	17
2 - 1 - 1	9	2	21
2 - 2 - 0	9	2	21
2 - 3 - 0	12	3	28
3 - 0 - 0	8	1	19
3 - 0 - 1	11	2	25
3 - 1 - 0	11	2	25
3 - 1 - 1	14	4	34
3 - 2 - 0	14	4	34
3 - 2 - 1	17	5	46
3 - 3 - 0	17	5	46
4 - 0 - 0	13	3	31
4 - 0 - 1	17	5	46
4 - 1 - 0	17	5	46
4 - 1 - 1	21	7	63
4 - 1 - 2	26	9	78
4 - 2 - 0	22	7	67
4 - 2 - 1	26	9	78
4 - 3 - 0	27	9	80
4 - 3 - 1	33	11	93
4 - 4 - 0	34	12	93



Tabla No 2. Números más probables por 100 ml. Usando cinco tubos de  
Continuación de 10 mL, cinco tubos de 1 mL y cinco tubos de 0.1 mL.

COMBINACIÓN DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
5 - 0 - 0	23	7	70
5 - 0 - 1	31	11	89
5 - 0 - 2	43	15	110
5 - 1 - 0	33	11	93
5 - 1 - 1	46	16	120
5 - 1 - 2	63	21	150
5 - 2 - 0	49	17	130
5 - 2 - 1	70	23	170
5 - 2 - 2	94	28	220
5 - 3 - 0	79	25	190
5 - 3 - 1	110	31	250
5 - 3 - 2	140	37	340
5 - 3 - 3	180	44	500
5 - 4 - 0	130	35	300
5 - 4 - 1	170	43	490
5 - 4 - 2	220	57	700
5 - 4 - 3	280	90	850
5 - 4 - 4	350	120	1,000
5 - 5 - 0	240	68	750
5 - 5 - 1	350	120	1,000
5 - 5 - 2	540	180	1,400
5 - 5 - 3	920	300	3,200
5 - 5 - 4	1,600	640	5,800
5 - 5 - 5	≥ 2,400		



Tabla No 3. Número más probable por 100 mL. Usando tres tubos de 10 mL, tres tubos de 1 mL y tres tubos de 0.1 mL.

COMBINACION DE TUBOS POSITIVOS	NMP 100 ML	LIMITE DE CONFIANZA 95%	
		LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0 - 0 - 0	< 3		
0 - 0 - 1	3	< 0.5	9
0 - 1 - 0	3	< 0.5	13
1 - 0 - 0	4	< 0.5	20
1 - 0 - 1	7	1	21
1 - 1 - 0	7	1	23
1 - 1 - 1	11	3	36
2 - 0 - 0	9	1	36
2 - 0 - 1	14	3	37
2 - 1 - 0	15	3	44
2 - 1 - 1	20	7	89
2 - 2 - 0	21	4	47
2 - 2 - 1	28	10	150
3 - 0 - 0	23	4	120
3 - 0 - 1	39	7	130
3 - 0 - 2	64	15	380
3 - 1 - 0	43	7	210
3 - 1 - 1	75	14	230
3 - 1 - 2	120	30	380
3 - 2 - 0	93	15	380
3 - 2 - 1	150	30	440
3 - 2 - 2	210	35	470
3 - 3 - 0	240	36	1,300
3 - 3 - 1	460	71	2,400
3 - 3 - 2	1,100	150	4,800
3 - 3 - 3	≥ 2,400		



# Guía de práctica N° 15

## Columna de Winogradsky

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

Observa la distribución de las poblaciones microbianas en la columna de Winogradsky y explica como se desarrollan las diferentes poblaciones heterótrofas y fotoautótrofas.

### 2. Fundamento Teórico

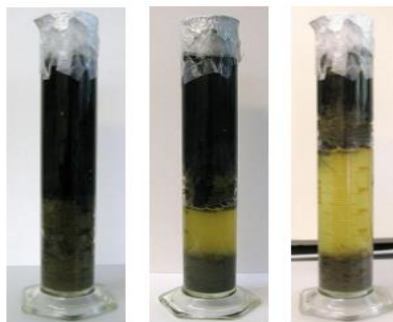
La **columna de Winogradski** es un dispositivo simple que permite el cultivo de una gran diversidad de microorganismos y que, como su nombre indica, fue un invento de Serguéi Winogradski.

El aparato consiste en una columna llena de agua y fango. Incubando esta columna bajo luz solar durante meses, se forma un gradiente de oxígeno y otro de sulfuros, que determinan una amplia variedad de ambientes en las que se disponen diferentes especies de microorganismos.

La columna de Winogradsky es una demostración clásica de cómo los microorganismos ocupan "microespacios" altamente específicos de acuerdo con sus tolerancias medio ambientales y sus necesidades vitales (requerimientos de carbono y energía).

Por otro lado, la columna de Winogradsky puede ser utilizada para establecer cultivos de enriquecimiento de diferentes tipos microbianos. Por ejemplo para el caso de bacterias fotosintéticas al menos cuatro grupos pueden ser encontrados: cianobacterias (antes conocidas como azul-verdosas), verdes sulfurosas, púrpuras sulfurosas y púrpuras no sulfurosas.

Finalmente las columnas pueden adaptarse a la exposición de diferentes factores y de esta manera investigar cómo los diferentes tipos de luz, pH, temperatura, etc., afectan sobre la composición del ecosistema que se desarrolla en este microambiente.



**Figura 1.** Columna de Winogradsky después de un mes (izquierda), dos meses (centro) y tres meses (derecha). La estratificación se hace cada vez más evidente.



### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Balanza	De precisión de 3 ejes	1
2	Calibrador pie de rey (Vernier)	Lectura digital	1
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	botellas de plástico	2 L	2
2	bolsa negra		1
3	Papel aluminio		1
4	Papel periódico finamente cortado		1
5	huevo cocido (yema de huevo)		1
6	Restos de raíces de plantas, aserrín, fruta descompuesta		1
7	carne picada	50 g	1
8	varilla de vidrio		1
9	Tijera		1
10	Cinta adhesiva		1
11	hilo nylon	2 m	1
12	laminas		2

#### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	CaCO <sub>3</sub> o cascara pulverizada de huevo	4 g	1
2	CaSO <sub>4</sub> ó yeso	4 g	1
3	NaHCO <sub>3</sub>	2 g	1
4	NH <sub>4</sub> Cl	2 g	1
5	Solución Tampón fosfato pH 7,3	2 ml	1

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.6 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.7 Pipetear las diluciones de la muestra con una bombilla u otro dispositivo. No usar la boca para pipetear.
- 4.8 Tener cuidado cuando se trabaja con NH<sub>4</sub>Cl ya que es reactivo cancerígeno..

### 5. Procedimientos:

#### Primero: Recolección de la muestra

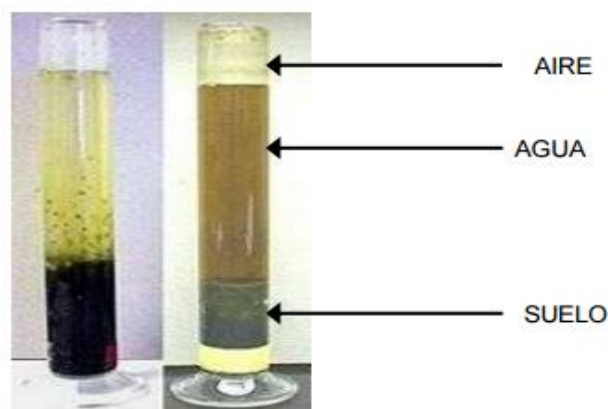
1. **Recolectar** 500 g Muestra de lodo de un estanque, lago o pantano, costa de mar o río rica en materia orgánica (sedimento superficial o subsuperficial).
2. Recolectar 1 L de agua de estanque, lago o pantano, costa de mar o río de donde se sacó la misma muestra de lodo.

#### Segundo: Preparación de la columna

1. Se usa 2 columnas grandes de cristal (una probeta de 100 ml) o de plástico transparente ( botella de 2 L).
2. Recolectar una cantidad de barro o lodo, retirar las piedras y restos de tamaño grande de este lodo.



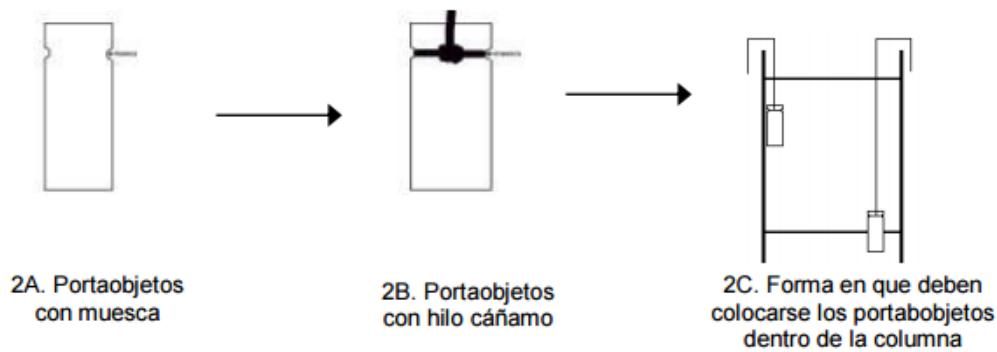
3. Se añaden restos orgánicos de diferente origen como: tiras de papel de periódico, aserrín, restos de raíces de plantas y carne picada, etc como **Fuente de carbono**. Es importante que la celulosa permanezca en el fondo o en la zona intermedia, pero no en la zona superficial, ya que las bacterias que degradan la celulosa son anaeróbicas. Deben evitarse los sustratos fácilmente fermentables, que pueden producir una formación excesiva de gas
4. Llenar la columna con lodo hasta 1/3 de su volumen total.
5. Se añade las sales:  
**Fuente de sulfato:** 1 g sulfato de calcio, (CaSO<sub>4</sub>)  
**Agente tamponador de pH:** 1 g de carbonato cálcico (CaCO<sub>3</sub>)
6. El lodo también puede mezclarse con el contenido de la yema de huevo desmenuzada que sirve como **fuentes de azufre**. Se añade también 1g bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub>), y 1ml tampón fosfato pH 7,3.
7. Compactar esta mezcla (lodo + sales + restos orgánicos) con la ayuda de una espátula a fin de eliminar las burbujas de aire. Obtener una capa de 10 cm aproximadamente.
8. Añadir el agua procedente del estanque a la mezcla hasta una altura cercana al borde del recipiente (3 a 5 cm por debajo del borde). La mezcla se debe adicionar lentamente para no resuspender la muestra. (El recipiente debe estar ligeramente inclinado y luego adicionar lentamente la mezcla para evitar la formación de burbujas). Esperar 30 minutos. La capa de agua en la parte superior deberá medir por lo menos dos cm de altura. Agregar agua, si fuera necesario. Considere que la proporción de las capas inferior de lodo y superior de agua pueden variar.
9. Con la varilla de vidrio eliminar las burbujas de aire generadas.
10. Cubrir la boca de la columna con papel aluminio o parafina para evitar tanto el depósito de polvo como la evaporación de agua.
11. Registrar y dibujar la imagen final de la columna (color del sedimento y del líquido).



**FIGURA 1.** Forma de montar la columna de Winogradsky.

12. Tomar 2 portaobjetos y hacerles unas muescas (Fig. 2A). Sobre ellas amarrar un extremo del hilo cáñamo de tal forma que se pueda jalar el portaobjetos con el otro extremo (figura 2B).

- Colocar los 2 portaobjetos en una posición vertical a diferentes niveles, uno sobre el sustrato inclinados contra la pared del recipiente dejando que el extremo de hilo suelto quede suspendido fuera de la botella y uno en los primeros 10 cm de la superficie. (Fig. 2C).



**FIGURA 2.** Secuencia de pasos para colocar los portaobjetos con muesca en la columna de Winogradsky

- Incubar a temperatura ambiente cerca de una ventana para que reciba luz solar o de lo contrario usar luz artificial.
- Se examinará la columna periódicamente, anotando los cambios de color y grosor de las diferentes capas. Registre los cambios macroscópicos observados. Se tomarán muestras de las capas para estudiar los diferentes tipos de microorganismos al final del experimento (11 y 12 de Junio del 2016).
- En caso se evapore el agua, mantenga su volumen agregando agua destilada.
- Para el estudio de las bacterias de la columna de Winogradsky, se puede introducir una pipeta larga para recoger una pequeña muestra de lodo o agua, que puede ser usada en microscopía con aumentos de 10 y 40 de aumento, para el caso de bacterias se utilizaran en aumento de 100.
- Una columna se usa como muestra problema y otra columna como muestra control (sin luz y cubierta con bolsa negra)

### Tercero




- Dejar incubar por 3 meses y anotar los resultados observados en la columna.



6. Resultados




Se examinará la columna periódicamente, anotando los cambios de color y presencia de las diferentes capas o franjas.

**Tabla 1.** Reporte de observaciones para la columna de Winogradsky – Columna Problema

Evaluaciones	Columna	Observaciones
Evaluación 1 (Semana 0) ...../...../.....		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> Uniforme o presencia de bandas? <b>Presencia de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>
Evaluación 2 (Semana ) .. .../...../.....		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> <b>Presencia y color de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>
Evaluación 3 (Semana ) ...../...../.....		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> <b>Presencia y color de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>



**Tabla 2.** Reporte de observaciones para la columna de Winogradsky – Columna Control

Evaluaciones	Columna	Observaciones
Evaluación 1 (Semana 0) 16/04/2016		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> Uniforme o presencia de bandas? <b>Presencia de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>
Evaluación 2 (Semana ) 14/05/2016		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> <b>Presencia y color de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>
Evaluación 3 (Semana ) 11/06/2016		<b>Sedimentación:</b> <b>Color:</b> <b>Presencia y color de franjas:</b> <b>Formación de burbujas:</b> <b>Olor Característico:</b> <b>pH:</b> <b>Observación microscópica:</b>

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
 .....  
 .....



**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- Prescott, L. M., Harley, J. P. y D.A. (1999). Microbiología (4a ed.). México: Mc Graw Hill Interamericana.
- Moreno, J. y col. (2012). Microbiología ambiental y ecología microbiana en el estudio de microorganismos en ambientes extremos. Reduca (Biología). Serie Microbiología. 5 (5): 94-109. ISSN: 1989-3620. Argentina: San Miguel de Tucumán.



## Guía de práctica N° 16

### Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Sección : .....Docente: .....  
Fecha : ...../...../..... Duración: 90 minutos

**Instrucciones:** El alumno debe ingresar al Laboratorio portando su guardapolvo y equipo de protección personal (guantes, mascarilla, cofia).

#### 1. Propósito /Objetivo (de la práctica):

#### 2. Fundamento Teórico

La perforación de pozos genera alrededor de 144,000 toneladas por año de residuos o lodos impregnados con diesel y otros hidrocarburos a los cuales hay que darles una salida medioambiental. Se sabe que la disposición no controlada de estos materiales puede crear problemas tales como la contaminación de aguas subterráneas y contaminación atmosférica.

La agencia de protección ambiental europea, sensibilizada cada vez más por la problemática que éstos pueden llegar a ocasionar, incluyó 16 hidrocarburos en la lista de contaminantes prioritarios. En la zona, estos materiales son sometidos a tratamiento físico para reducir la concentración de tales sustancias para confinarlos posteriormente en un relleno sanitario, sin embargo dicho tratamiento deja residuos de entre el 2 y el 3 % de hidrocarburos.

Entre las técnicas de recuperación de los suelos contaminados con hidrocarburos se pueden citar: a la extracción de hidrocarburos por vacío, incineración, y la recuperación electrocinética. Debido al elevado costo de las técnicas mencionadas, se buscan alternativas viables para la eliminación de los hidrocarburos contenidos en estos suelos. Se pretenden que estas alternativas sean ambientalmente correctas, simples y económicas. Se tienen así técnicas de tratamiento que se aplican a desechos peligrosos o materiales contaminados, y que persiguen alterar su estado en forma permanente por medios químicos, biológicos o físicos. Una alternativa viable para resolver este tipo de problemas, puede ser la **biorremediación** en la cual se utilizan una variedad de organismos vivos, principalmente microorganismos como las bacterias y levaduras, para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. En el caso de los microorganismos estos eliminan el contaminante por biodegradación proceso mediante el cual los microbios son capaces de aceptar como sustrato sustancias orgánicas y transformarlas en compuestos menos tóxicos o inocuos o, mejor aún, eliminarlos de forma total produciendo CO<sub>2</sub>, agua y biomasa microbiana. Los hidrocarburos en el medio ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos. Ambos son relativamente abundantes en el suelo, aunque las bacterias asumen un rol predominante en medios marinos, mientras que los hongos lo hacen en ecosistemas terrestres. Las bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos en ambos medios, acuático y terrestre, son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas spp* y *Coryneforms*. Entre los hongos encontramos *Aureobasidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, y *Sporobolomyces spp*, como los más comunes en medio acuático, y *Trichoderma* y *Mortierella spp*. en suelos.

El conocimiento de los diversos aspectos de la ecología microbiana y su relación con la fisiología es esencial para estudiar el potencial que presentan los microorganismos para degradar petróleo en ambientes acuáticos y terrestres (Soto *et al.*, 1996). La presencia de microorganismos a la hora de diseñar un proceso de biorremediación es esencial, ya que son los responsables de eliminar el contaminante. Por otro lado, los suelos contaminados con hidrocarburos requieren de una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos así como de microorganismos heterótrofos no específicos (Ercoli *et al.*, 2000). Si esta masa crítica no es suficiente se pueden incorporar microorganismos al suelo mediante inoculación, a través del proceso conocido como "bioaumentación".

Se sabe que microorganismos individuales sólo son capaces de metabolizar un rango limitado de hidrocarburos, haciéndose necesario usar una mezcla de poblaciones que posean una amplia capacidad enzimática a fin de poder degradar grupos complejos de hidrocarburos en suelo



El **Objetivo** de este trabajo fue el de detectar la presencia de microorganismos capaces de utilizar hidrocarburos como fuente de carbono en suelos contaminados provenientes de suelos contaminados los cuales puedan ser utilizados para degradar, mediante la inoculación, a estos compuestos derivados del petróleo.

### 3. Equipos, Materiales y Reactivos

#### 3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Shaker		1
2	Balanza	4 ejes	1
3			

#### 3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Medio basal líquido	0 °C a 100 °C	1
2	Extracto de Levadura	50 ml	1
3	Probeta	100 ml	1
4	Matraces	500 ml	
5	Placas con medio basal sólido		6
6	Pipeta	1 ml	6
7	Placas Petri con medio EMB		9

#### 3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1			

### 4. Indicaciones/instrucciones:

- 4.1 Desinfecte el área de trabajo con un germicida comercial aprobado por la EPA o blanqueador doméstico (hipoclorito de sodio) antes y después de trabajar.
- 4.2 Realice correctamente el muestreo de las muestras de suelo contaminado y no contaminado.
- 4.3 Verificar las condiciones de la incubadora y el shaker para asegurar el crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos,

### 5. Procedimientos:

#### Primera Fase

1. Colectar muestras de suelo contaminado con petróleo y no contaminado de la misma zona
2. Trasladar las muestras de suelo al laboratorio
3. A cada matraz conteniendo 100 ml de medio basal + levadura + aceite o diésel se le agraga 1 g de suelo no contaminado y contaminado, para conformar los siguientes tratamientos que a continuación se muestran:

**Tabla 1.** Tratamientos de la Primera Fase

Tratamientos	Composición
T1	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 g Suelo no contaminado
T2	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 g Suelo contaminado
T3	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 ml Aceite + 1 g Suelo no contaminado
T4	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 ml Diesel + 1 g Suelo no contaminado
T5	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 ml Aceite + 1g Suelo contaminado
T6	100 ml de Medio Basal + 0.4% Levadura + 1 ml Diesel + 1 g Suelo contaminado

4. Cada matraz incubar a temperatura ambiente y en agitación a 220 rpm durante 48 h

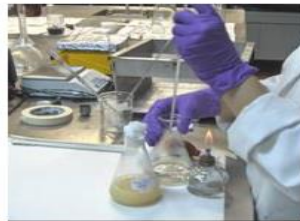


**Figura 1.** Matracas conteniendo medio basal más levadura conformando los diferentes tratamientos.

5. Observar crecimiento por la presencia de turbidez en el medio, y corroborarlo a través de un frotis y tinción Gram.

**Segunda Fase**

6. Transferir 1 ml de medio de los tratamientos que resultaron positivos, a 100 ml de medio basal sin levadura previamente esterilizado. Tres matraces contenían solo el medio basal, otros 3 se les añadió 1 ml de aceite y a otra serie de 3, se añadió 1 ml de diesel.



**Figura 1.** Transferencia del cultivo microbiano inicial

**Tabla 1.** Tratamientos de la Segunda Fase

Tratamientos	Composición
T1*	100 ml de Medio Basal +
T2*	100 ml de Medio Basal +
T3*	100 ml de Medio Basal +
T4*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Aceite
T5*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Aceite
T6*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Aceite
T7*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Diesel
T8*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Diesel
T9*	100 ml de Medio Basal + 1 ml Diesel

7. Incubar los matraces a temperatura ambiente (25-28°C), en agitación a 220 rpm durante 48 h.
8. Transcurrido el tiempo de incubación, observar el crecimiento microbiano en los matraces que contenían, además del medio basal, aceite o diésel.





**Tercera Fase**

9. Preparar cajas Petri con el medio basal solidificado con agar, incorporando separadamente al medio tanto aceite como diésel en una concentración del 1% con el objetivo de observar el crecimiento de los microorganismos que utilicen los hidrocarburos o sus derivados como fuente de carbono (diésel y aceite)
10. Sembrar por estría a partir de los cultivos microbianos obtenidos de la etapa anterior.
11. Incubar a 37° C durante 48 h
12. Anotar las características morfológicas de las colonias observadas.

**6. Resultados**

1. ....  
.....  
.....
2. ....  
.....  
.....
3. ....  
.....  
.....

**7. Conclusiones**

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

**8. Sugerencias y /o recomendaciones**

.....  
.....  
.....

**Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados**

- De la Garza. (1997). Aislamiento de microorganismos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos. México: Universidad Autónoma de Tamaulipas.



**ANEXO 01**

**Composición del medio basal**

$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	7.0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5.7 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2.3 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.2 g
Agua destilada	1000 ml

Diluir todos los componentes y distribuir 100 ml en matraces de 250 ml. Esterilizar a 15 libras de presión, a 120 °C durante 15 minutos.