

# **Introducción al Análisis Bacteriológico**

## **Manual de Prácticas**

### **Autores**

**Joel Castillo Castillo, Ana Ma. Gurrola Togasi, Ma. Teresa  
Herrera Islas, Yeni Islas Fonseca**

# ***Introducción al Análisis Bacteriológico***

---

## **CONTENIDO**

Práctica No. 1	Esterilización de material en autoclave.
Práctica No. 2	Preparación y esterilización de medios de cultivo
Práctica No. 3	Técnicas de sembrado bacteriano
Práctica No. 4	Técnicas de aislamiento bacteriano
Práctica No. 5	Morfología colonial
Práctica No. 6	Tinción de Gram
Práctica No. 7	Aislamiento de bacterias a partir de una muestra problema

---

---

**Esterilización de material en autoclave.**

***Propósitos:***

Que el alumno:

- Conozca el fundamento de la esterilización por calor húmedo (autoclave).
- Maneje el autoclave con las adecuadas medidas de seguridad.
- Esterilice adecuadamente material de cristal en autoclave.

***Fundamento:***

Para estudiar a los microorganismos debemos tener cultivos puros, es decir, bacterias de una sola especie. Para lograrlo se debe eliminar cualquier microorganismo contaminante de los objetos que estarán en contacto con el cultivo como son el medio de cultivo y el recipiente que lo contendrá. La esterilización es un proceso por medio del cual se destruyen o eliminan de objetos, sustancias, soportes y superficies a los microorganismos tanto en su estado vegetativo como esporulado. La esterilidad es un término absoluto, es decir, un objeto o sustancia está estéril o no.

La esterilización se puede llevar a cabo por métodos físicos o químicos, la elección del método depende del tipo de material.

El método más utilizado es el calor húmedo y requiere de un equipo llamado autoclave, este consiste en: una cámara cuyo fondo es un depósito para agua destilada que se calentará por medio de una resistencia eléctrica o una fuente externa de calor y que genera vapor. La cámara se cierra herméticamente por medio de una tapa en la cual se encuentran el termómetro, el manómetro y una válvula de seguridad que regula la presión evitando accidentes. En la parte inferior y exterior de la cámara existe un dispositivo que mide el nivel de agua destilada, así como una llave de salida de agua y un termostato. El material a esterilizar se coloca en una canastilla ubicada sobre el depósito de agua. Ver la figura No.1.



**Figura No. 1**  
**Autoclave**

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

El proceso consiste en generar vapor de agua a alta presión. Cuando el vapor generado se encuentra con una superficie más fría se condensa cediendo calor, este calor causa la coagulación de las proteínas y la muerte de los microorganismos.

Para saber si un material se encuentra libre de microorganismos se utiliza un control de esterilidad que puede ser químico o biológico. Los métodos químicos consisten en colocar junto con el material a esterilizar sustancias que cambian de color al alcanzar cierta temperatura como la cinta testigo. En los métodos biológicos se colocan ampollitas o tiras impregnadas de esporas de *Bacillus subtilis* o *Bacillus esthearatothermophilus* los cuales se someten a incubación en medios de cultivo adecuados durante 7 días, si el proceso de esterilización se llevó a cabo adecuadamente al final de este tiempo no debe haber crecimiento alguno en los medios.

Para mantener la autoclave en buenas condiciones y libre de accidentes deben tenerse ciertos cuidados:

- Utilizar siempre agua destilada, esto evita que los filtros se tapen por incrustación de sales.
- Nunca se debe conectar ni encender el autoclave si no contiene la cantidad de agua destilada marcada en el nivel.
- Al cerrar, las llaves de la tapa se aprietan de forma encontrada y poco a poco, esto permite una larga duración de los empaques y un cierre uniforme.
- Siempre purgar el aire caliente para que se alcance la temperatura y presión requeridas.
- Durante el tiempo de esterilización el autoclave debe mantenerse en continua vigilancia.
- Al terminar el tiempo de esterilización se debe permitir que la presión llegue a cero y la temperatura sea menor de 70 °C para poder abrirla.
- El usuario debe colocarse de lado al autoclave para abrirla, si se hace de frente el vapor puede causar quemaduras en la cara.
- Después de utilizar el autoclave se debe dejar seco, con el termostato en cero, apagado y desconectado.

<b>Material</b>	<b>Sustancias</b>
Autoclave	Agua
Cajas Petri	destilada
Pipetas	Alcohol.
Matraz	
erlenmeyer	
Tubos de ensaye	
Algodón y gasa	
Papel estroza	
Espátulas	

**Metodología:**

**Preparación del material:**

- Lavar con agua y jabón todo el material de cristal. Cuando el material de laboratorio tenga partículas incrustadas es necesario utilizar HCl concentrado o solución alcohólica de NaOH durante 30 minutos y lavar. Tratar estos desechos adecuadamente.
- Enjuagar con agua destilada todo el material y dejarlo secar.

**Cajas Petri.**

- Cortar trozos rectangulares de papel estraza con un tamaño tal que permita envolver las cajas petri.
- Colocar la caja en el centro del papel y envolver doblando los extremos angostos y luego a lo largo, asegurar la envoltura con cinta adhesiva. Ver figura No. 4.



**Figura No. 4**

**Procedimiento para envolver cajas Petri**

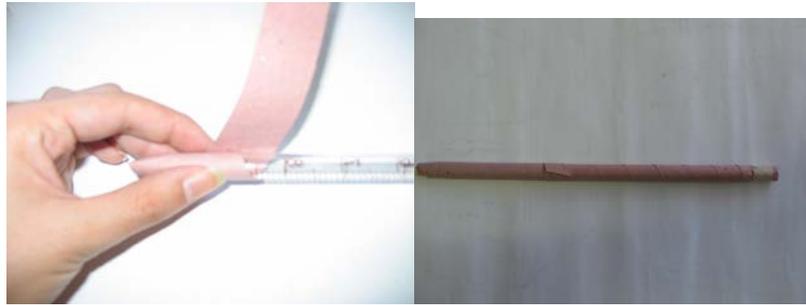
- Pegar un trozo de cinta testigo en la envoltura de cada caja.
- Colocar las cajas dentro de botes y cubrir el bote con papel estraza. Pegar un trozo de cinta testigo.

**Espátulas.**

- Envolver la espátula con papel y colocarla en un bote.
- Pegar un trozo de cinta testigo en la envoltura.

**Pipetas.**

- Colocar una boquilla de algodón en la parte superior de la pipeta, asegurarse que permita el paso del aire.
- Envolver la pipeta con una tira de papel. Marcar el extremo que corresponde a la punta. Ver figura No. 5



**Figura No. 5**  
**Envoltura de pipetas**

- Pegar un trozo de cinta testigo en la envoltura.

**Prendas.**

- Doblar la prenda de tal forma que permita el paso del vapor.
- Envolver la prenda con papel, sujetar la envoltura con cinta adhesiva o cordones.
- Pegar un trozo de cinta testigo en la envoltura.

**Colocación del material en el autoclave:**

- Introducir al autoclave un solo tipo de material, es decir solo cristalería o solo medios de cultivo o disoluciones.
- No se debe esterilizar al mismo tiempo material ya utilizado con material recién lavado y envuelto.
- Colocar el material de manera espaciada sin sobrecargar la canastilla para que la circulación del vapor sea adecuada.

**Proceso de esterilización:**

- Llenar el autoclave con agua destilada hasta el nivel marcado.
  - Encender el autoclave o poner las fuentes externas de calentamiento.
  - Bajar la tapa del autoclave sin apretar las llaves.
  - Apagar el autoclave, abrirlo e introducir la canastilla de material.
- PRECAUCIÓN: el autoclave está muy caliente, tener cuidado para no sufrir una quemadura.**
- Tapar el autoclave y girar todas las llaves de forma encontrada,
  - Apretar al máximo todas las llaves de forma encontrada.
  - Dejar la válvula de seguridad abierta.
  - Iniciar de nuevo el calentamiento colocando el termostato al máximo de calentamiento.
  - Cuando la temperatura sea aproximadamente de 90°C cerrar la válvula de seguridad. Otra forma de verificar el momento en que se debe cerrar la válvula es cuando el vapor de agua que escapa de la válvula se condensa inmediatamente sobre una superficie de vidrio.

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

- Cuando la presión sea de 1.1 kg/cm<sup>2</sup>, esperar 20 minutos vigilando siempre que la presión no suba o baje de este valor. En cualquier caso regular con el termostato. **NUNCA DEJAR DE OBSERVAR EL AUTOCLAVE.**
- Al concluir 20 minutos apagar el autoclave bajando el termostato y desconectarlo.
- Dejar enfriar el autoclave como mínimo 20 minutos. Posteriormente abrir la válvula de seguridad.
- Cuando la temperatura disminuya a 70 °C, abrir la tapa. Utilizar guantes de carnaza o asbesto, las llaves deben aflojarse de la misma forma en que se apretaron, es decir, de forma encontrada.
- **AL ABRIR, COLOCARSE A UN LADO DEL AUTOCLAVE NUNCA DE FRENTE PARA EVITAR QUEMADURAS.**
- Asegurarse que la tapa del autoclave se encuentre completamente abierta.
- Sacar cuidadosamente la canastilla y esperar a que se enfríe.
- Guardar el material ya frío en un lugar asignado por el profesor.

### **Consideraciones:**

- Al cubrir los tapones de algodón con papel no se humedecen y se evita su contaminación.
- Si los tapones son muy apretados será difícil la penetración del vapor, además el material puede romperse durante el proceso.
- Se pueden utilizar también tubos con tapa de plástico resistente a altas temperatura (bakelita), en estos casos las tapas se dejan flojas durante el proceso y se aprietan después de que se enfrían los tubos.

### **Cuestionario:**

1. ¿Por qué es importante vigilar en todo momento la temperatura y presión del autoclave?
2. ¿Qué procedimiento se sigue si la cinta testigo no cambia de color?
3. En el caso de utilizar un indicador biológico ¿cuál es la interpretación si hay crecimiento en el 2do. día?
4. Elaborar una hoja de control de calidad.

### **Bibliografía:**

- 1) Carmona, O. (1997) **Microbiología médica**. Mc Graw Hill Interamericana. Venezuela.
- 2) Capuchino, J. G. y Sherman, N. (1990). **Microbiology. A laboratory Manual**. Cumming Publishing, Co. Inc. USA,
- 3) Alvarez-Manrique. C. I. y Mendoza-Elvira, S. E. (2005). **Manual básico de bacteriología**. FESC, UNAM. México.
- 4) Baker, F. J. (1990). **Manual de técnicas de microbiología médica**. Acribia, Zaragoza España.
- 5) Ramírez-Gama, R. M. (2003) **Manual de prácticas de Microbiología General**. Fac. Química, UNAM. México.
- 6) Vullo, D. L. Wachsman B. M. Alche, L. E. (2000) **Microbiología en práctica. Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de la microbiología básica y aplicada**. Buenos Aires, Argentina.

**Evaluación**

**Instrucciones.** Para verificar que la operación del autoclave se lleve a cabo de acuerdo a las condiciones de seguridad e higiene adecuadas, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

Actividad	Evaluación
1. ¿Llena el autoclave con agua destilada hasta el nivel indicado y baja la tapa.	
2. ¿Conecta y gira la perilla hasta el nivel máximo de calentamiento?.	
3. ¿Introduce la canastilla con los medio de cultivo dentro del autoclave, de manera que no se viertan?	
4. ¿Baja la tapa, aprieta las llaves de forma encontrada y deja abierta la válvula de seguridad.	
5. ¿Gira la perilla en el nivel de calentamiento máximo?.	
6. Al salir vapor seco, ¿cierra la válvula?.	
7. ¿Espera a que la temperatura alcance 120 °C y la presión 1.1 Kg/cm <sup>2</sup> ?	
8. Concluido el tiempo indicado ¿desconecta y deja enfriar el autoclave?	
9. ¿Abrie la válvula de seguridad dejando escapar el vapor?	
10. ¿Afloja las llaves de la tapa de forma encontrada?	
11. ¿Destapa el autoclave colocándose a un costado?	
12. ¿Saca el material y drena el agua dejando seco el autoclave?	
13. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros de equipo?	
14. ¿Su lugar de trabajo está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

---

**Preparación y esterilización de medios de cultivo**

***Propósitos:***

Que el alumno:

- Prepare medios de cultivo de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- Esterilice adecuadamente los diferentes medios de cultivo.
- Dosifique los medios de cultivo en cantidades y recipientes adecuados.

***Fundamento:***

Los microorganismos toman del ambiente las sustancias que requieren para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar un adecuado funcionamiento. Estas sustancias se llaman nutrientes y son compuestos esenciales de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre.

Los medios de cultivo son mezclas de agua, sustancias orgánicas e inorgánicas que contienen los nutrientes necesarios para cubrir los requerimientos de los microorganismos y lograr su crecimiento. En la formulación de un medio se debe considerar los siguientes aspectos:

- Proporcionar una mezcla adecuada de todos los nutrientes.
- Tener concentraciones adecuadas de nutrientes que permitan el crecimiento microbiano.
- Proveer un sistema que permita controlar el pH.
- Evitar la formación de precipitados minerales (la mezcla debe ser uniforme).

Los medios de cultivo pueden variar en su composición, no sólo en función del microorganismo para el cual se utilizan, sino también con respecto a su estado físico y aplicación específica.

Por su composición los medios de cultivo se clasifican en:

- **Sintéticos o de composición química definida:** se adquieren comercialmente y se obtienen disolviendo en agua destilada mezclas que contienen cantidades concretas de distintas sustancias químicas puras de origen orgánico e inorgánico. La composición química de un medio sintético depende de la bacteria que se quiera cultivar, por ejemplo el agar MacConkey sirve para cultivar Enterobacterias. Los medios sintéticos son costosos y se usan principalmente en la investigación científica.
- **Naturales, complejos o de composición químicamente no definida:** se elaboran con ingredientes de composición compleja como extractos de tejidos animales y vegetales, sueros, hidrolizados de proteínas y otras sustancias similares. Este tipo de medios son ampliamente utilizados en cultivos y conservación de microorganismos ya que su preparación resulta más sencilla,

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

son menos costosos y proporcionan los requerimientos nutritivos para un gran número de microorganismos. Ejemplos: caldo nutritivo y agar nutritivo.

Por su estado físico, los medios de cultivo pueden ser:

- **Líquidos o caldos:** son especialmente útiles para cepas sometidas a condiciones adversas, para distribuir el cultivo, hacer diluciones y mezclas.
- **Semisólidos:** se utilizan para determinar la movilidad de los microorganismos. Se preparan agregando a los caldos agar en concentraciones de de 0.4 a 0.8%.
- **Sólidos:** se utilizan para inmovilizar a los microorganismos, lo que permite aislarlos, contarlos y estudiar su morfología colonial. Los agentes solidificantes que más se utilizan son agar, albúmina de huevo y grenetina.

Considerando su aplicación los medios se pueden clasificar en:

- ◆ **Selectivos:** favorecen el crecimiento de un microorganismo específico y suprimen el desarrollo de otros. Ejemplo manitol sal agar.
- ◆ **Enriquecimiento:** favorecen la multiplicación de un grupo de microorganismos con características específicas, generalmente estos medios son líquidos.
- ◆ **Enriquecidos:** permiten el crecimiento de microorganismos con requerimientos nutricionales muy exigentes. Son medios muy ricos en nutrientes y químicamente complejos.
- ◆ **Diferenciales:** contienen sustancias indicadoras y diferenciadoras de alguna actividad metabólica del microorganismo que es diferente al resto. Un ejemplo claro se observa en los medios con sangre, que permiten distinguir a los microorganismos con actividad hemolítica de los que no la tienen.
- ◆ **De mantenimiento:** ayudan a preservar la viabilidad de las células en un cultivo, se caracterizan por tener cantidades muy limitadas de nutrientes.

<b>Material</b>	<b>Sustancias</b>
Balanza granataria	Agua destilada
Tubos de ensayo de 16 x 150 mm	Agar nutritivo
Tubos de ensayo de 13 x 100	Caldo nutritivo
Cajas Petri de vidrio	Caldo lactosado
Probeta de 100 mL	Gelatina nutritiva
Espátula.	Agar EMB
Gradilla	Agar Mac Conkey
Agitador de vidrio	Agar Chapman o Vogel Jonson
Canastilla o botes de lámina	
Pipeta de 1 y 10 mL	

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

Matraz Erlenmeyer de 1000 mL	
Vaso de precipitado de 250 mL	
Parrilla de calentamiento	
Agitador de vidrio	
Algodón y papel estroza	
Autoclave	

### **Metodología.**

1. Leer las instrucciones de preparación que se encuentran en el frasco de cada medio de cultivo.
2. Los medios de cultivo que se prepararán en esta práctica serán usados en las siguientes prácticas de sembrado y aislamiento. Para la práctica de sembrado cada alumno requerirá los siguientes medios: 1 caja de agar nutritivo, 1 tubo de agar nutritivo inclinado, 1 tubo de gelatina nutritiva y 1 tubo de caldo nutritivo. Para la práctica de aislamiento cada alumno necesitará los siguientes medios de cultivo: 1 caja de agar nutritivo, 1 tubo de agar nutritivo sin inclinar, 1 caja de agar EMB o Mac Conkey, 1 caja de agar Chapman o Vogel Jonson y 1 tubo de caldo lactosado.
3. Realizar los cálculos necesarios para preparar los medios indicados. Considerar que cada caja petri contiene aproximadamente 20 mL de agar, los tubos con agar y gelatina aproximadamente 7 mL cada uno y los tubos de caldo contienen aproximadamente 5 mL.

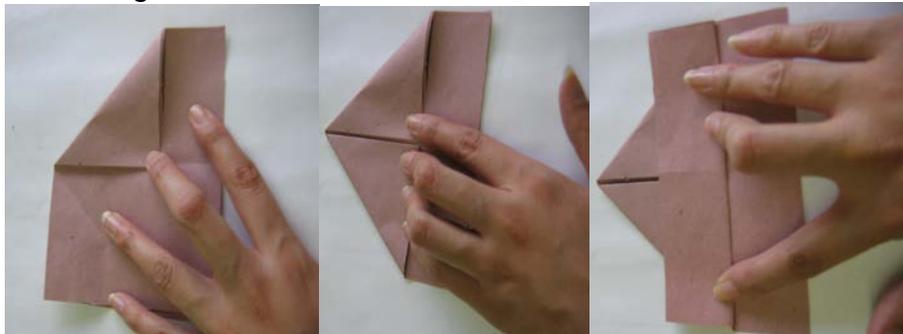
### **Preparación del agar nutritivo:**

1. Pesar en papel encerado la cantidad calculada de medio de cultivo, usando un matraz Erlenmeyer dispersarlo en el volumen correspondiente de agua destilada.
2. Calentar suavemente utilizando una parrilla hasta que se observe una fase homogénea.
3. Agitar durante todo el proceso de calentamiento, evitando que el medio de cultivo se derrame.
4. Colocar 7 mL de agar nutritivo en un tubo de 16 x 150.
5. Elaborar un tapón de algodón para cada matraz y tubo, estos debe ocupar aproximadamente 1/6 parte del tubo o matraz. Ajustar el tamaño del tapón de manera que no queden flojos o entren a presión, para comprobar esto se debe sujetar el tubo o matraz con el dedo meñique y la parte interior de la mano sin ninguna ayuda. Ver figura No. 2.



**Figura No. 2**  
**Tapones de algodón para tubo y matraz**

6. Elaborar una cubierta de papel para la parte superior de los matraces, como se muestra en la figura No. 3.



**Figura No. 3**  
**Procedimiento para doblar cubiertas de papel**

7. Colocar un trozo de cinta testigo en el cuello de cada matraz.
8. Colocar un trozo de cinta testigo en cada tubo de ensayo.
9. Colocar los matraces y tubos en botes de metal o cajas de alambre y en la parte superior se coloca una cubierta de papel con cinta adhesiva y cinta testigo.

#### **Preparación de Gelatina nutritiva.**

1. Pesar en papel encerado la cantidad calculada de medio de cultivo, usando un matraz Erlenmeyer dispersarlo en el volumen correspondiente de agua destilada.
2. Calentar suavemente utilizando una parrilla hasta que se observe una fase homogénea.
3. Agitar durante todo el proceso de calentamiento, evitando que el medio de cultivo se derrame.
4. Colocar 7 mL de gelatina nutritiva en un tubo de 16 x 150.
5. Elaborar un tapón de algodón para cada tubo como se indicó en el apartado anterior.
6. Colocar un trozo de cinta testigo en el cuello de cada matraz.
7. Colocar un trozo de cinta testigo en cada tubo de ensayo.

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

8. Colocar los matraces y tubos en botes de metal o cajas de alambre y en la parte superior se coloca una cubierta de papel con cinta adhesiva y cinta testigo.

### **Preparación de medios líquidos.**

1. Pesar en papel encerado la cantidad calculada de medio de cultivo, usando un matraz Erlenmeyer dispersarlo en el volumen correspondiente de agua destilada.
2. Colocar 5 mL de caldo lactosado en un tubo de 13 x 100
3. Colocar 5 mL de caldo nutritivo en un tubo de 13 x 100.
4. Elaborar un tapón de algodón para cada tubo como se indicó anteriormente.
5. Colocar un trozo de cinta testigo en cada tubo de ensayo.
6. Colocar los tubos en botes de metal o cajas de alambre y en la parte superior se coloca una cubierta de papel con cinta adhesiva y cinta testigo.

### **Esterilización de medios de cultivo.**

1. Tomando en cuenta la práctica de “Esterilización de material de laboratorio”, elaborar una metodología para esterilizar los medios de cultivo preparados. **EL PROCEDIMIENTO DEBE SER AUTORIZADO POR EL PROFESOR.**

### **Enfriamiento de medios.**

2. Una vez concluido el proceso de esterilización, inclinar la mitad de los tubos de 16 x 150 que contienen agar nutritivo, la inclinación debe ser tal que permita al medio cubrir las  $\frac{3}{4}$  partes del tubo, sin tocar el algodón, dejar enfriar para que solidifique el medio.
3. Dejar enfriar en posición vertical la otra mitad de los tubos de 16 X 150 con agar nutritivo.
4. Dejar enfriar en posición vertical los tubos de 16 x 150 de con gelatina nutritiva.
5. Dejar enfriar los tubos de 13 x 100 con caldo en posición vertical.
6. Dejar enfriar el matraz con agar nutritivo hasta que sea soportable tocarlo.

### **Vaciado de agar nutritivo en cajas petri.**

1. Cerca de la flama del mechero, vaciar aproximadamente 20 mL de agar nutritivo en cada una de las cajas previamente esterilizadas, tapar la caja y repetir el procedimiento con los otros tubos.
2. Dejar reposar las cajas durante varios minutos para que solidifique el agar.
3. Guardar las cajas en refrigeración hasta su uso, voltearlas boca a bajo para evitar que se forma agua de condensación en las tapas.
4. Para comprobar la esterilidad de los medios, meter los tubos y las cajas en la estufa e incubar durante 24 horas a 37 °C. Al término de este tiempo, revisar cuidadosamente el material y observar que no haya desarrollo microbiano.
5. Si los medios han registrado desarrollo microbiano el lote tendrá que ser desechado (primero esterilizarlos) de lo contrario pueden ser ocupados para la siguiente práctica.

Nota: Los matraces con agar EMB o Mac Conkey y Chapman o Vogel Jonson deben guardarse en refrigeración hasta ser usados en la práctica de aislamiento.

**Apéndice**

**Caldo nutritivo**

Extracto de carne	3.0 g
Peptona de carne	5.0 g
Agua destilada	1000.0 mL
pH	7.0 ± 0.2

Pesar las cantidades adecuadas y disolver cada uno de los componentes, el medio queda ligeramente amarillo.

**Agar nutritivo o gelosa**

Caldo nutritivo adicionado de 15 a 20 g de agar /litro. Calentar hasta disolución total. En algunos ensayos especiales se adicionan al caldo nutritivo fosfato de sodio monobásico 2.0 g/L y cloruro de sodio 3.0 g/L.

**Agar – eosina azul de metileno – lactosa (EMB)**

Peptona de carne	10.0 g/L de agua
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.0 g
Lactosa	10.0 g
Eosina Y, amarillenta	0.4 g
Azul de metileno	0.065 g
Agar	13.5 g

**Agar Mac Conkey**

Peptona de caseína	17.0 g/L de agua
Peptona de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Lactosa	10.0 g
Mezcla de sales biliares	1.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agar	13.5 g
pH	7.1 ± 0.1

El medio tiene un color rojo ladrillo.

**Agar manitol – sal común – rojo fenol**

## ***Introducción al Análisis Bacteriológico***

Peptona de carne	10 g/L de agua
Extracto de carne	1.0 g
Cloruro de sodio	75.0 g
D – manitol	10.0 g
Rojo fenol	0.025 g
Agar	12.0 g
pH	7.4

Disolver los componentes uno a uno, fundir, ajustar el pH. El medio queda de color anaranjado.

### **Gelatina nutritiva**

Caldo nutritivo	1000.0 mL
Grenetina	120.0 g
pH	6.8 – 7.2

### ***Bibliografía:***

Rámirez-Gama, R. M. (2003) ***Manual de prácticas de Microbiología General***. Fac. Química, UNAM. México.

Volk, W. (1997) ***Microbiología básica***, Harla, México.

Stanier, R. (1996) ***Microbiología***, Reverté, México.

**Evaluación**

**Instrucciones.** Para verificar que la preparación de medios de cultivo se lleve a cabo de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

<b>Actividad</b>	<b>Evaluación</b>
13. ¿Lee las instrucciones del envase del medio de cultivo?	
14. ¿Pesa correctamente la cantidad de medio?	
15. ¿Disuelve el medio en la cantidad de agua indicada?	
16. ¿Calienta adecuadamente el medio para disolverlo?	
17. ¿Permite que el medio se enfríe sin solidificar?	
18. ¿Vierte el medio en cajas y tubos en condiciones asépticas?	
19. ¿Guarda los medios en condiciones adecuadas?	
20. ¿La metodología propuesta para esterilizar los medios es correcta?	
21. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros de equipo?	
22. ¿Su lugar de trabajo está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### **Práctica No.3**

---

#### **Técnicas de sembrado bacteriano**

**Propósitos:**

Que el alumno:

- Siembre en cajas petri por la técnica de estría en agar.
- Siembre en tubos de ensayo por la técnica de estría en agar y por picadura.
- Identifique las principales características de la morfología colonial.

**Fundamento:**

Cultivar microorganismos significa promover de forma intencional su crecimiento en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas. La población de microorganismos desarrollada en un medio se denomina cultivo.

Para favorecer el desarrollo de un microorganismo en particular, es necesario considerar el aspecto nutricional y las condiciones ambientales de su hábitat natural. En cuanto al aspecto nutricional se debe contar con fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, sales y agua además de tener un pH controlado. Al periodo de crecimiento de un cultivo se le llama incubación. Durante la incubación de un microorganismo se deben controlar variables como la temperatura, humedad, luminosidad y aeración. Cada especie bacteriana crece a temperaturas que están dentro de ciertos límites. Por esto podemos clasificarlas en función de su temperatura óptima de crecimiento (temperatura de incubación que permite el desarrollo bacteriano en un período corto de 12 a 24 h), en los siguientes grupos:

1. Psicrófilas son capaces de crecer a 0° C o menos, aunque crecen mejor a temperaturas superiores, cercanas a 15° o 20° C.
2. Mesófilas son bacterias que crecen a temperaturas que se encuentran entre 25° y 40° C. Son las más abundantes.
3. Termófilas, se desarrollan mejor entre 45° y 60°. Los límites de desarrollo de algunas bacterias termófilas pueden llegar a la región mesofílica.

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

Para que los microorganismos de interés se desarrollen en los medios de cultivo es necesario tomar, en condiciones de asepsia, un inóculo o muestra a partir de otro cultivo o de un material contaminado. A este proceso se le denomina sembrado o inoculación.

En el sembrado de microorganismos se emplean agujas, asas de inoculación, hisopos, pipetas graduadas o pipetas Pasteur que deberán esterilizarse previamente. El uso de estos materiales depende del inóculo y del medio en el cual se desea sembrar. Si el inóculo es sólido puede sembrarse en un medio líquido usando un asa bacteriológica o un hisopo. Si el inóculo es líquido, se usa una pipeta graduada o una pipeta Pasteur.

Los medios semisólidos se preparan en tubos, se inoculan con aguja (asa recta) o con pipeta; en este último caso es necesario calentar el medio y cuando se encuentra en estado líquido y a una temperatura de aproximadamente 45° C se agrega el inóculo, se homogeniza y se deja solidificar.

Los medios de cultivo sólidos se preparan en tubos o en matraces dependiendo de la cantidad, después de esterilizarlos estos se inclinan o se vierten en cajas de Petri. La siembra se realiza con el asa, inoculando la superficie del agar con mucha suavidad. En estos medios al multiplicarse los microorganismos forman agregados que se hacen visibles a simple vista. A estos agregados se les denomina colonias que presentan características que varían con el tipo de microorganismo cultivado y el medio de cultivo empleado.

<b>Material</b>	<b>Sustancias</b>
Asa bacteriológica	Por cada alumno se necesita: 1 caja de agar nutritivo 1 tubo con gelatina nutritiva 1 tubo con agar nutritivo inclinado. Disolución de Hipoclorito de sodio al 6% ( cloro comercial). Cepa de <i>Bacillus subtilis</i>

### **Metodología:**

#### **Preparación de la zona aséptica.**

1. Desinfectar la zona de trabajo con disolución comercial de hipoclorito de sodio.
2. Encender el mechero.

#### **Siembra en caja petri:**

3. Usando un plumón permanente marcar la parte trasera de la caja en cuatro cuadrantes.

## **Introducción al Análisis Bacteriológico**

4. Usando la mano derecha, colocar el asa bacteriológica en la zona azul de la flama del mechero. Inclinar el asa para permitir que la mayor parte esté en contacto con la flama hasta que el metal se ponga al rojo vivo.
5. Con la mano izquierda tomar el tubo de ensayo que contiene la cepa de *Bacillus subtilis*, quitar el tapón de algodón y flamear la boca del tubo. Se debe cuidar de no tocar la parte interna del tapón.
6. Introducir el asa bacteriológica al tubo, tocar una zona del medio de cultivo en la que no haya crecimiento para enfriar el asa.
7. Tomar un poco de inóculo de la zona en la que haya crecimiento.
8. Flamear la boca del tubo y colocar el tapón de algodón.
9. Colocar el tubo en la gradilla.
10. Tomar la caja petri en la que se sembrará el inóculo.
11. Usando la mano izquierda, abrir la caja.
12. Con la mano derecha descargar el inóculo en la superficie de la caja petri haciendo estrías y abarcando la mayor área posible. Se debe tener cuidado de pasar suavemente el asa sobre la superficie para evitar hacer surcos en el agar.  
Ver Figura No. 1



**Figura No. 1**  
**Sembrado masivo por estrías en caja petri**

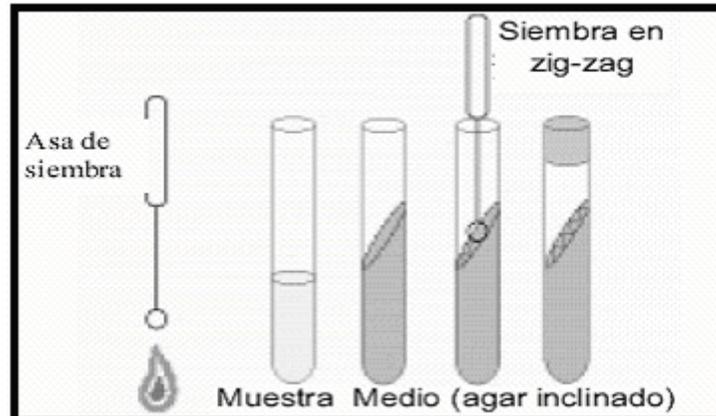
Incubar la caja petri boca abajo para evitar el agua de condensación a 37°C por 24 a 48 horas.

### **Siembra en agar inclinado.**

1. Usando la mano derecha, colocar el asa bacteriológica en la zona azul de la flama del mechero. Inclinar el asa para permitir que la mayor parte esté en contacto con la flama hasta que el metal se ponga al rojo vivo.
2. Con la mano izquierda tomar el tubo de ensayo que contiene la cepa de *Bacillus subtilis*, quitar el tapón de algodón y flamear la boca del tubo. Se debe cuidar de no tocar la parte interna del tapón.
3. Introducir el asa bacteriológica al tubo, tocar una zona del medio de cultivo en la que no haya crecimiento para enfriar el asa.
4. Tomar un poco de inóculo de la zona en la que haya crecimiento.

## Introducción al Análisis Bacteriológico

5. Flamear la boca del tubo y colocar el tapón de algodón.
6. Colocar el tubo en la gradilla.
7. Destapar el tubo de agar inclinado y descargar el inóculo suavemente haciendo estrías sobre la superficie. Ver Figura No. 2
8. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

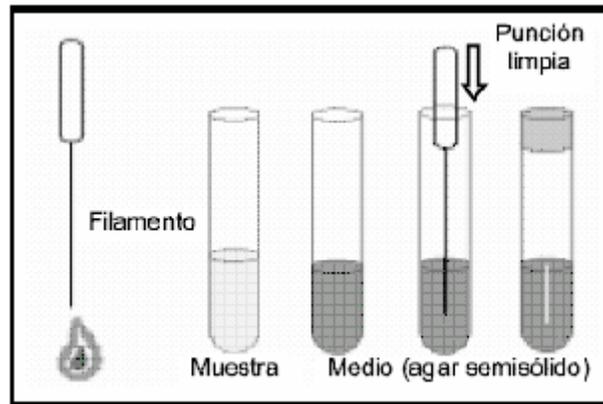


**Figura No. 2**  
**Siembra en agar inclinado**

### Siembra por picadura en gelatina nutritiva.

**Nota: se usará un asa recta para la siembra.**

1. Usando la mano derecha, colocar el asa bacteriológica en la zona azul de la flama del mechero. Inclinar el asa para permitir que la mayor parte esté en contacto con la flama hasta que el metal se ponga al rojo vivo.
2. Con la mano izquierda tomar el tubo de ensayo que contiene la cepa de *Bacillus subtilis*, quitar el tapón de algodón y flamear la boca del tubo. Se debe cuidar de no tocar la parte interna del tapón.
3. Introducir el asa bacteriológica al tubo, tocar una zona del medio de cultivo en la que no haya crecimiento para enfriar el asa.
4. Tomar un poco de inóculo de la zona en la que haya crecimiento.
5. Flamear la boca del tubo y colocar el tapón de algodón.
6. Sembrar por picadura en el tubo de gelatina nutritiva. Ver Figura No. 3



**Figura No. 3**  
**Siembra por picadura**

7. Incubar de 24 a 48 h a 37°C.

#### **Siembra en caldo nutritivo.**

1. Usando la mano derecha, colocar el asa bacteriológica en la zona azul de la flama del mechero. Inclinar el asa para permitir que la mayor parte esté en contacto con la flama hasta que el metal se ponga al rojo vivo.
2. Con la mano izquierda tomar el tubo de ensayo que contiene la cepa de *Bacillus subtilis*, quitar el tapón de algodón y flamear la boca del tubo. Se debe cuidar de no tocar la parte interna del tapón.
3. Introducir el asa bacteriológica al tubo, tocar una zona del medio de cultivo en la que no haya crecimiento para enfriar el asa.
4. Tomar un poco de inóculo de la zona en la que haya crecimiento.
5. Flamear la boca del tubo y colocar el tapón de algodón.
6. Destapar el tubo de caldo nutritivo e introducir el asa bacteriológica, agitar fuertemente el asa en el medio líquido.
7. Incubar a 37°C de 24 a 48 horas.

**Tratamiento de residuos:** Los cultivos deben esterilizarse usando el autoclave, los medios sólidos pueden ser desechados con los residuos orgánicos y los líquidos a la tarja.

#### **Bibliografía:**

1. Baker, F.J., Breach, M.R (1990). **Manual de Técnicas de Microbiología Médica**. Acirbia. Zaragoza. España.
2. Seeley, Harry. W. (1991). **Microbes in action**. W.H. Freeman and Company. New York.
3. Cappuccino, J G., Sherman, N. (1992). **Microbiology. A Laboratory Manual**. The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc. New York..
4. Burrows, W. (1994). **Textbook of Microbiology**. WB Saunders Company. Philadelphia and London.



**Evaluación**

**Instrucciones.** Para verificar que las técnicas de siembra se lleven a cabo de acuerdo a las instrucciones indicadas, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

<b>Actividad</b>	<b>Evaluación</b>
1. ¿Desinfecta la zona de trabajo adecuadamente?	
2. ¿Coloca el material de forma ordenada y cerca de la zona aséptica?	
3. ¿Esteriliza el asa bacteriológica de forma correcta?	
4. ¿En condiciones asépticas, toma una muestra con el asa bacteriológica?	
5. ¿En condiciones asépticas, abre los tubos que contienen las cepas?	
6. ¿En condiciones asépticas, inocula el tubo de agar inclinado?	
7. ¿Daña la superficie del agar inclinado?	
8. ¿Flamea la boca del tubo antes de cerrarlo?	
9. ¿En condiciones asépticas, abre correctamente la caja petri?	
10. ¿En condiciones asépticas, inocula la superficie de la caja sin dañar la superficie?	
11. ¿Asegura la caja con un trozo de cinta y la coloca invertida?	
12. ¿Esteriliza los cultivos antes de desecharlos?	
13. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros de equipo?	
14. ¿Su lugar de trabajo está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

## **Técnicas de aislamiento bacteriano**

### **Propósitos:**

Que el alumno:

- Aplique las principales técnicas de aislamiento de bacterias.
- Aísle diferentes grupos bacterianos de la leche pasteurizada.

### **Fundamento:**

Para efectuar el estudio de los microorganismos se han diseñado diversos métodos que permiten cultivarlos bajo condiciones experimentales controladas, que permite manejar un solo tipo de microorganismos. Cultivar un microorganismo significa promover intencionalmente el desarrollo de éste en medios de cultivo y condiciones de laboratorio controladas, la población de microorganismos desarrollada se denomina cultivo.

Un cultivo es puro cuando todos los microorganismos tienen las mismas características, y la forma más segura y fácil de obtenerlo, es aislando una "clona", es decir una cepa proveniente de un solo individuo. Para ello, los microorganismos deben separarse lo suficiente para permitir que cada colonia sea una clona. Esto se logra mediante diferentes técnicas de aislamiento, que dependen del origen de la muestra y de las características del microorganismo que se desea aislar. Por ejemplo, para muestras con poblaciones muy grandes siempre se recomienda hacer diluciones, en tanto que para muestras con microorganismos que se han sometido a condiciones adversas, como desecación, congelación o falta de nutrientes, conviene hacer un enriquecimiento antes de aislar. A continuación se describen los principales métodos de aislamiento de bacterias.

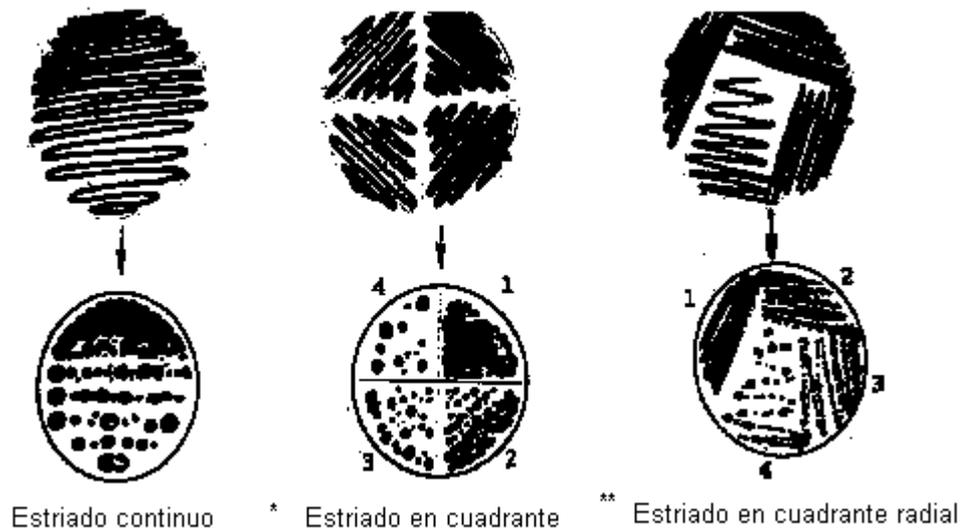
## **Separación física de los microorganismos**

### **Aislamiento en medios líquidos**

En medios de cultivo líquidos el aislamiento se logra fácilmente haciendo una serie muy grande de diluciones para disminuir progresivamente la cantidad de microorganismos en la muestra, de modo que en los últimos tubos se estime que exista un solo tipo de microorganismo, que al reproducirse forme una "clona".

### **Aislamiento en medios sólidos**

En medios de cultivo sólidos, los microorganismos deben inocularse lo suficientemente alejados unos de otros para que inmovilizados en el agar formen colonias puras, procedentes de un solo individuo. Una de las técnicas de aislamiento de microorganismos en medio sólido consiste en el agotamiento del inóculo, siguiendo cualquiera de los siguientes patrones de estriado.



\* La mayor parte del inóculo se descarga en los cuadrantes 1 y 2, lo que permite obtener colonias separadas en 3 y 4.

\*\* Para asegurar el agotamiento del inóculo, sembrar el cuadrante 1, esterilizar el asa, enfriarla tocando las orillas internas de la caja petri o el agar y estriar el cuadrante 2 teniendo cuidado de cruzar el asa sobre la parte final de las estrías del cuadrante anterior. Repetir el mismo procedimiento para el cuadrante 3 y 4.

### **Medios de cultivo selectivos**

Son medios que contienen una sustancia que inhibe a algunos microorganismos pero no afecta a la especie o al grupo que se desea aislar.

La variedad de medios de cultivo selectivos es enorme. Pueden prepararse en el laboratorio agregando algún antibiótico, sal o modificando el pH. También pueden adquirirse en el mercado generalmente deshidratado. Cuando no se cuenta con medios deshidratados, la consideración de las características del microorganismo a aislar y de los contaminantes, permite diseñar un medio selectivo adecuado. Los microorganismos contaminantes son todos aquellos que están presentes en la muestra y que no son de interés.

Cuando los medios selectivos tienen una fuerte acción inhibitoria, puede ser necesario un “enriquecimiento” previo de la muestra, especialmente si ha estado sometida a condiciones desfavorables para los microorganismos.

Por otro lado, el uso de medios selectivos generalmente se combina con alguna técnica de separación física, como diluciones o agotamiento.

La elección del medio depende del microorganismo o grupo microbiano que se desee aislar, así como de las características de los contaminantes.

### **Aprovechamiento de características específicas**

Algunos microorganismos tienen características fisiológicas poco comunes, lo cual facilita su aislamiento. Por ejemplo, los microorganismos que producen o utilizan etanol se pueden aislar fácilmente en un medio con 8% de etanol; los fijadores asimbióticos de nitrógeno se aíslan en medios libres de nitrógeno.

## Introducción al Análisis Bacteriológico

Los microorganismos que tienen esporas (esporulados) se aíslan fácilmente eliminando los microorganismos no esporulados mediante un calentamiento que sólo las esporas pueden resistir. Los microorganismos anaerobios y los facultativos se pueden aislar de los aerobios cultivándolos en ausencia de oxígeno.

Material	Sustancias
Asa bacteriológica 1 caja petri estéril 2 pipetas de 5 mL estériles	Por cada alumno se necesita: 1 caja de agar nutritivo 1 caja de agar EMB o Mac Conkey 1 caja de agar Chapman o Vogel Jonson 1 tubo de agar nutritivo. 1 tubo de caldo lactosado. Leche pasteurizada Disolución de hipoclorito de sodio al 6%

### Metodología:

#### Inoculación de la muestra.

#### Agar nutritivo:

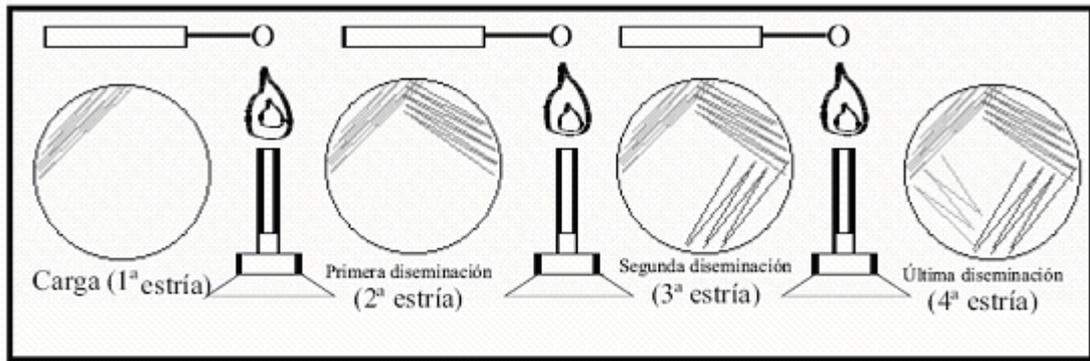
1. En un baño María fundir el agar nutritivo del tubo de ensaye y mantenerlo a una temperatura de aproximadamente 45° C.
2. En zona aséptica usando la pipeta estéril, vaciar 1 mL de la leche en la caja petri estéril y enseguida 25 mL de agar nutritivo.
3. Mover la caja petri en forma circular en sentido de las manecillas del reloj y en forma inversa hasta que el medio quede extendido uniformemente.
4. Dejar que solidifique en una superficie nivelada.
5. Incubar las cajas petri de forma invertida para evitar el agua de condensación durante 24 h a 37° C.
6. Al término de las 24 h de incubación observar si hay crecimiento, en caso de que el crecimiento sea nulo o escaso incubar nuevamente durante 24 h más.

#### Medios selectivos

1. En un baño María fundir el medio de cultivo sólido y mantenerlo a una temperatura de aproximadamente 45° C.
2. En zona aséptica usando la pipeta estéril, vaciar 1 mL de la leche en la caja petri y enseguida 20 mL de los siguientes medios: agar EMB o Mac Conkey (para aislar enterobacterias).
3. En zona aséptica usando la pipeta estéril, vaciar 1 mL de la leche en la caja petri y enseguida 20 mL de los siguientes medios: Chapman o Vogel Jonson (para aislar estafilococos).
4. Mover cada caja petri en forma circular en sentido de las manecillas del reloj y en forma inversa hasta que el medio quede extendido uniformemente.
5. Dejar que solidifique.
6. Incubar las cajas petri de forma invertida para evitar el agua de condensación durante 24 h a 37° C.
7. Al término de las 24 h de incubación observar si hay crecimiento, en caso de que el crecimiento sea nulo o escaso incubar nuevamente durante 24 h más.

**Agotamiento con asa**

1. Invertir la caja petri y usando un marcador dividirla en cuadrantes y numerarlos en el sentido de las manecillas del reloj.
2. En zona aséptica con el asa tomar una muestra de la leche y sembrar en una caja de agar nutritivo de la siguiente forma. Ver Figura No. 1



**Figura No. 1**

**Técnica de aislamiento por estría**

En el primer cuadrante se descarga la mayor parte de la muestra, sin tomar más inóculo se continúa estriando en el segundo, tercer y cuarto cuadrante. Se flamear el asa antes de estriar el siguiente cuadrante.

3. Incubar las cajas petri de forma invertida para evitar el agua de condensación durante 24 h a 37° C.
4. Al término de las 24 h de incubación observar si hay crecimiento, en caso de que el crecimiento sea nulo o escaso incubar nuevamente durante 24 h más.

**Aprovechamiento de características especiales**

1. En zona aséptica usando la pipeta estéril tomar 1 mL de leche y sembrar en el tubo de caldo lactosado.
2. Incubar los tubos de caldo lactosado durante 24 h a 37° C.
3. Al término de las 24 h de incubación observar si hay crecimiento, en caso de que el crecimiento sea nulo o escaso incubar nuevamente durante 24 h más.
4. En un baño Maria fundir el agar nutritivo sólido del tubo de ensaye y mantenerlo a una temperatura de aproximadamente 45° C.
5. En zona aséptica con una pipeta estéril tomar 1 mL del cultivo del tubo de caldo lactosado y agregarlo a la caja de petri.
6. Enseguida vaciar el agar nutritivo a una temperatura de 45 °C.
7. Mover la caja petri en forma circular en sentido de las manecillas del reloj y en forma inversa hasta que el medio quede extendido uniformemente. Dejar que solidifique.
8. Incubar la caja petri de forma invertida para evitar el agua de condensación durante 24 h a 37° C.
9. Al término de las 24 h de incubación observar si hay crecimiento, en caso de que el crecimiento sea nulo o escaso incubar nuevamente durante 24 h más.

**Tratamiento de residuos:** Los cultivos deben esterilizarse usando el autoclave, los medios sólidos pueden ser desechados con los residuos orgánicos y los líquidos a la tarja.

**Bibliografía:**

1. Baker, F.J.; Breach, M.R (1990). **Manual de Técnicas de Microbiología Médica**. ACRIBIA. Zaragoza. España.
2. Seeley, Harry. W. **Microbes in action** (1991). W.H. Freeman and Company. New York.
3. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. (1992). **Microbiology. A Laboratory Manual**. The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc. New York.
4. Burrows, W. **Textbook of Microbiology** (1994). WB Saunders Company. Philadelphia and London.

**Evaluación**

**Instrucciones.** Para verificar que las técnicas de aislamiento se lleven a cabo de acuerdo a las instrucciones indicadas, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

<b>Actividad</b>	<b>Evaluación</b>
1. ¿Desinfecta la zona de trabajo adecuadamente?	
2. ¿Coloca el material de forma ordenada y cerca de la zona aséptica?	
3. ¿Esteriliza el asa bacteriológica de forma correcta?	
4. ¿En condiciones asépticas, toma la muestra de leche con la pipeta estéril?	
5. ¿En condiciones asépticas, vierte el agar a la temperatura adecuada?	
6. ¿Marca los cuadrantes de la caja de petri?	
7. ¿En condiciones asépticas, abre correctamente la caja petri?	
8. ¿En condiciones asépticas, descarga el inóculo en el primer cuadrante de la caja sin dañar la superficie?	
9. ¿Gira la caja para inocular el siguiente cuadrante?	
10. ¿Flamea el asa antes de estriar el siguiente cuadrante?	
11. ¿Asegura la caja con un trozo de cinta y la coloca invertida?	
12. ¿Esteriliza los cultivos antes de desecharlos?	
13. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros de equipo?	
14. ¿Su lugar de trabajo está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

---

---

**Morfología colonial**

**Propósitos:**

Que el alumno:

- Identifique las principales características morfológicas de las colonias bacterianas.
- Relacione las características morfológicas como parámetros de identificación bacteriana.

**Fundamento:**

Cuando los microorganismos crecen en diferentes medios pueden mostrar diferencias en la forma de sus colonias. Estas diferencias, llamadas características coloniales, son usadas como base para clasificar a los microorganismos dentro de grupos taxonómicos. Las características de los microorganismos conocidos se encuentran en el Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Estas características se obtienen cultivando los microorganismos en placas de agar nutritivo, agar inclinado, en caldo nutritivo y en gelatina nutritiva.

**Guía de Observación.**

Los parámetros que se observan para tipificar la morfología macroscópica en agar inclinado son los siguientes:

1. Abundancia de crecimiento: La cantidad de crecimiento se reporta como ninguno, escaso, moderado o abundante.
2. Pigmentación: Microorganismos cromogénicos son aquellos que pueden producir pigmentos intracelulares que son los responsables del color de las colonias. Otros organismos producen pigmentos solubles extracelulares, que son excretados dentro del medio y esto también produce color.
3. Forma: La apariencia de la estría de crecimiento en la superficie del agar se designa como:
  - a. Filiforme: Continua y en forma de hebra con bordes suaves.
  - b. Equinulada: Continua, en forma de hebra con bordes irregulares.
  - c. Perlada: Colonias que no concluyen o semifluyen.
  - d. Difusa: Delgada y crecimiento extenso.
  - e. Arborescente: Crecimiento en forma de árbol.
  - f. Rizoide: Crecimiento en forma de raíz.

Los parámetros que se observan para tipificar la morfología colonial en cajas Petri con agar nutritivo son las siguientes:

Se observan las colonias aisladas:

1. Tamaño: Punta de alfiler, pequeño, medio o grande.
2. Pigmentación: Color de la colonia.
3. Forma: La figura de la colonia es descrita como sigue:
  - a. Circular: Sin rupturas en su perímetro.
  - b. Irregular: Perímetro dentado.
  - c. Rizoide: Crecimiento en forma de raíz.
4. Borde: La apariencia del borde de la colonia se puede describir como sigue:
  - a. Entero.
  - b. Ondulado.
  - c. Crenado.
  - d. Filamentoso.

- e. Enrollado.
- 5. Elevación: Se refiere al grado al cual el crecimiento colonial esta sobre la superficie del agar:
  - a. Plana: No hay elevación.
  - b. Elevada.
  - c. Convexa: Elevación en forma de domo.
  - d. Umbonada: Elevada con una región central convexa.
  - e. Pulvinada: Elevación semicircular.

**Crecimiento en caldo nutritivo.**

Se evalúa la distribución y apariencia del crecimiento en la siguiente forma:

- 1. Anillada: Turbidez uniforme finamente dispersada.
- 2. Floculenta: Agregados escamosos dispersos.
- 3. Peliculada: Espesa y con una nata.
- 4. Sedimentada: El crecimiento se da en el fondo del caldo y puede clasificarse como cualquiera de las dos primeras.

**Crecimiento en Gelatina Nutritiva.**

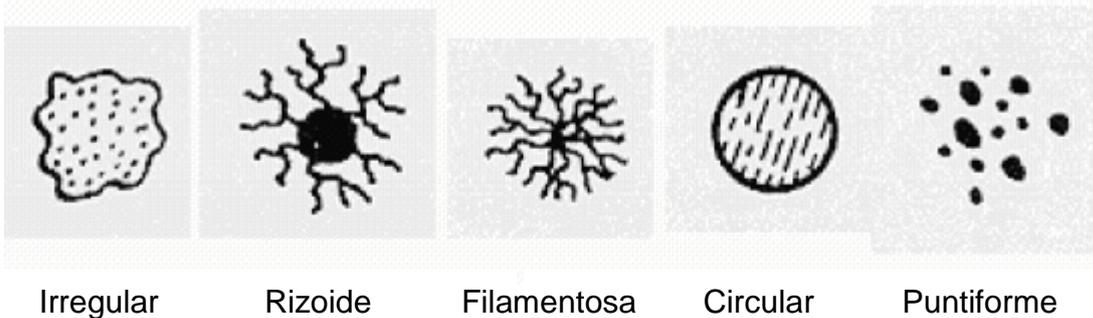
Este medio sólido pasa al estado semisólido o líquido (licuefacción) por la acción de la enzima proteolítica gelatinasa. La licuefacción puede ocurrir en cualquiera de las siguientes formas:

- 1. Cratiforme. La superficie es licuada en forma de un platillo.
- 2. Forma de rábano. La superficie es licuada en forma de un bulbo.
- 3. Infundibuliforme. Forma de embudo.
- 4. Saculada: Alargada, tubular.
- 5. Estratiforme. Completamente licuada hasta la mitad del medio.

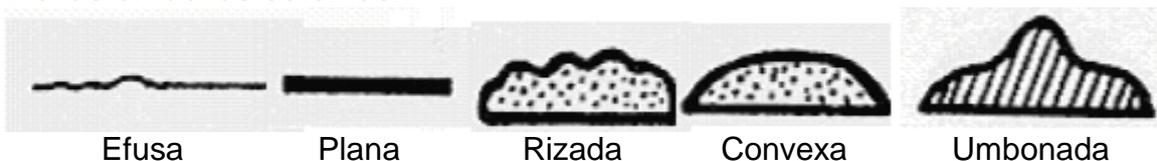
En las siguientes figuras se muestran las principales características coloniales.

**Características morfológicas de las colonias.**

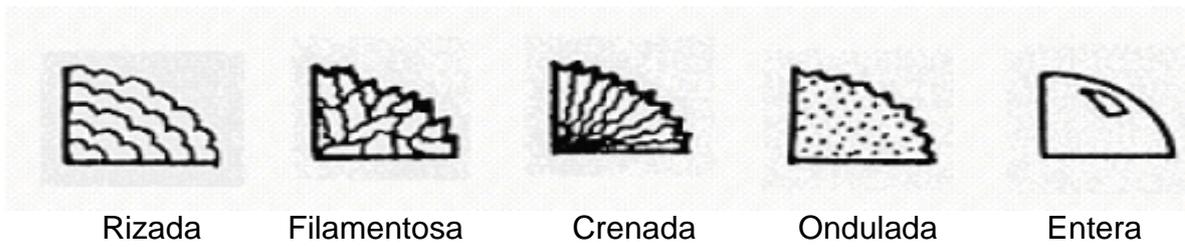
**Forma de las colonias.**



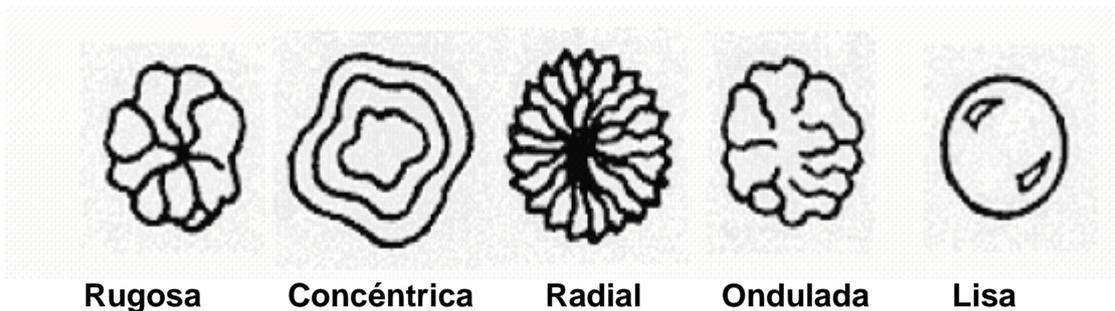
**Elevación de las colonias.**



**Bordes de las colonias.**



**Superficie de las colonias**



Material	Sustancias
Cultivos bacterianos de las prácticas anteriores. Mechero.	Disolución comercial de hipoclorito de sodio.

**Metodología:**

1. Desinfectar la zona de trabajo con disolución comercial de hipoclorito de sodio.
2. Encender el mechero.
3. Sin abrir la caja y el tubo, observar las características de las colonias bacterianas en caja petri y agar inclinado.
4. De ser necesario para una mejor observación, abrir en la zona del mechero la caja petri y observar las características de las colonias.
5. Observar el crecimiento en el tubo de gelatina nutritiva.
6. Observar el crecimiento en el tubo de caldo nutritivo.
7. Construir una tabla para registrar las observaciones.

**Tratamiento de residuos:** Los cultivos deben esterilizarse usando el autoclave, los medios sólidos pueden ser desechados con los residuos orgánicos y los líquidos a la tarja.

**Bibliografía:**

1. Bi Baker, F.J.; Breach, M.R (1990). **Manual de Técnicas de Microbiología Médica**. ACRIBIA. Zaragoza. España.
2. Seeley, Harry. W. **Microbes in action** (1991). W.H. Freeman and Company. New York.

## Introducción al Análisis Bacteriológico

3. Cappuccino, J.G.; Sherman, N. (1992). **Microbiology. A Laboratory Manual.** The Benjamin Cummings Publishing Company. Inc. New York.
4. Burrows, W. **Textbook of Microbiology** (1994). WB Saunders Company. Philadelphia and London.

### Evaluación

**Instrucciones.** Para verificar que la observación de las características colonias se lleven a cabo de acuerdo a la guía de la observación, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

Actividad	Evaluación
1. ¿Desinfecta la zona de trabajo adecuadamente?	
2. ¿Coloca el material de forma ordenada y cerca de la zona aséptica?	
3. ¿Observa detenidamente las características de las colonias?	
4. ¿En condiciones asépticas, abre la caja petri para mejorar la observación?	
5. ¿Elabora tablas de recolección de observaciones completas?	
6. ¿Esteriliza los cultivos antes de desecharlos?	
7. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros de equipo?	
8. ¿Su lugar de trabajo está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Propósitos.**

Que el alumno:

- Conozca el fundamento de la tinción de Gram.
- Realice la tinción de Gram en condiciones de seguridad e higiene.
- Identifique el Gram de las bacterias presentes en una muestra problema.

**Fundamento:**

Debido al tamaño de las bacterias estas solo se pueden observar al microscopio, la observación es parte importante en el diagnóstico clínico, la identificación de nuevas especies, el desarrollo de productos alimenticios y la biotecnología. Una forma de clasificar a las bacterias es de acuerdo a su morfología microscópica, pueden ser: cocos (forma esférica), bacilos (forma de cilíndrica) y espirilos (forma de espiral).

Para observar a las bacterias se colocan en soportes a esto se le llama preparación, y puede ser en “fresco”, si se encuentran vivas o “tinciones”, cuando se fijan y tiñen.

En las preparaciones en fresco se observan los movimientos de las bacterias pero por su falta de contraste se hace difícil conocer otras de sus características, por lo que es necesario utilizar otras técnicas de preparación, como es el caso de las tinciones donde podemos observar la morfología, estructuras celulares y clasificarlas de acuerdo a su reacción a los colorantes.

Una tinción consiste en preparar un “frotis” bacteriano en el cual se fija una capa delgada del cultivo de bacterias por medios físicos o químicos, es decir, estas se adhieren al soporte que es un portaobjetos, posteriormente se aplica uno o mas colorantes que se unen a las bacterias esto permite que al observarlas al microscopio estas tengan contraste con el medio que les rodea, cuando los colorantes reaccionan con las estructuras bacterianas las tinciones son conocidas como positivas.

Los colorantes generalmente son sales que tienen un ion positivo y otro negativo, y solo uno es el que imparte el color, uniéndose a las estructuras bacterianas por afinidad de cargas. Por ejemplo, si la carga es positiva se une a los centros negativos de las bacterias como pueden ser los grupos fosfato de sus ácidos nucleicos.

Las tinciones positivas pueden ser simples si se utiliza un solo colorante, por ejemplo azul de metileno; y diferenciales si se aplican 2 o más colorantes. Las tinciones diferenciales llevan una secuencia de aplicación, el primer colorante que se aplica se conoce como primario y el segundo como de contraste. También se pueden utilizar mordentes que refuerzan la unión del colorante con las estructuras bacterianas, o decolorantes que eliminan el colorante cuando la unión de este con la estructura bacteriana no es lo suficientemente fuerte. Ejemplos de estas tinciones son la de Ziehl-Nielsen y la de Gram.

La tinción de Gram creada por el Dr. Christian Gram permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: las Gram positivas (Gram+) y las Gram negativas

## Introducción al Análisis Bacteriológico

(Gram -). Esta tinción se basa en la composición y estructura de la pared celular bacteriana y su reacción con los colorantes y reactivos utilizados, proporcionando información acerca de los requerimientos nutricionales y de su sensibilidad a diversos agentes químicos o antibióticos.

En el siguiente cuadro se muestra los colorantes y reactivos utilizados en la tinción de Gram y su acción sobre la célula bacteriana.

Reactivo	Acción	Coloración en Gram positivas	Coloración en Gram negativas
<b>Cristal violeta</b>	Forma un complejo con el ribonucleato de magnesio de la bacteria	Morado	Morado
<b>Lugol</b>	Se enlaza al cristal violeta formando un complejo más fuerte y de gran tamaño	Morado	Morado
<b>Alcohol acetona</b>	Funciones: disolver lípidos, agente deshidratante y decolorante.	Morado Debido a que el decolorante disuelve la poca cantidad de lípidos presentes en la pared celular, la deshidratación cierra los poros impidiendo que el complejo salga.	Incolora La gran cantidad de lípidos contenidos en la pared celular se disuelven, dejando espacios muy grandes que permiten la salida del complejo colorido
<b>Safranina</b>	Tiñe las bacterias que fueron decoloradas	Morado	Rojo

Las bacterias Gram (+) tienen una pared celular gruesa (25-30 nm) y las bacterias Gram (-) tienen una pared celular delgada (5-10%) y una capa externa de lipopolisacáridos característica que permiten que se lleve a cabo esta tinción.

En esta tinción se debe considerar que si la decoloración es muy fuerte las Gram (+) se observarían de color rojo Gram (-), si la decoloración es suave las Gram (-) se observarían como Gram (+), lo que lleva a interpretaciones falsas. Esto se evita una vez que se domina la técnica y se respetan los tiempos de aplicación de cada reactivo. Los cultivos siempre deben ser de 18 a 24 horas, pues al aumentar el tiempo las bacterias Gram (+) pueden aparecer como Gram (-) debido a que liberan enzimas que lisan su propia pared celular modificando su composición.

Las tinciones se consideran selectivas cuando tiñen estructuras específicas de las bacterias como los flagelos, núcleo, endosporas o cápsula, esta última por su composición es difícil de teñir por lo que se utiliza una técnica especial llamada

## Introducción al Análisis Bacteriológico

tinción negativa, en ella se tiñe el contorno de la bacteria con colorantes como la nigrosina o la tinta china.

<b>Material:</b>	<b>Sustancias:</b>
Soporte para portaobjetos (recipiente con dos varillas en la parte superior unidas por una manguera de latex) Portaobjetos Frascos goteros Pañuelos desechables Pizeta Cultivos de 18-24 horas de bacterias. Asa bacteriológica.	Agua destilada Aceite de inmersión Reactivos de Gram (ver preparación al final) Cristal violeta, Lugol, Safranina, Alcohol acetona, Alcohol.

### **Metodología:**

#### **Preparación del “frotis”.**

1. Lavar con agua y jabón el portaobjetos.
2. Desengrasar el portaobjetos con un algodón impregnado de alcohol.
3. Preparar la zona aséptica.
4. Esterilizar el asa bacteriana en la flama del mechero.
5. Tomar una muestra del cultivo líquido y extenderla sobre la parte central del portaobjetos formando una película fina. En el caso de cultivos sólidos colocar previamente una gota de agua sobre el portaobjetos y homogeneizar con la muestra del cultivo.
6. Dejar secar al aire hasta que se observe una película sobre el portaobjetos.
7. Fijar el “frotis” pasando el portaobjetos con la película en la parte superior sobre la flama del mechero 2 o 3 veces. **PRECAUCIÓN:** No acercar la mano demasiado a la flama. No exponer el portaobjetos por tiempos prolongados a la flama del mechero para evitar que se rompa la preparación.

#### **Tinción.**

NOTA: Es muy importante respetar el tiempo indicado en cada reactivo para evitar interpretaciones falsas.

1. Usando el gotero adicionar la solución de cristal violeta de forma tal que el reactivo cubra todo el “frotis” y dejar por un minuto.
2. Colocar el portaobjetos de canto y lavar con agua ayudándose con una piseta o gotero.
3. Usando el gotero adicionar la solución de lugol de forma tal que el reactivo cubra todo el “frotis” y dejar por un minuto.
4. Lavar de nuevo de la misma forma que se indicó en el paso dos.
5. Utilizando el gotero adicionar la solución de alcohol-acetona sobre el portaobjetos inclinado para decolorar, suspender la adición cuando deje de salir color.
6. Lavar con agua como se indicó anteriormente.
7. Utilizando el gotero adicionar la solución de safranina de forma tal que el reactivo cubra todo el “frotis” y dejar por un minuto.
8. Lavar con agua como se indicó anteriormente.
9. Dejar secar al aire hasta que se observe una película colorida sobre el portaobjetos.

**Observación al microscopio.**

1. Colocar el portaobjetos en la platina del microscopio.
2. Enfocar con el objetivo de 10 x.
3. Buscar un campo donde el "frotis" sea delgado y homogéneo.
4. Enfocar el campo con el objetivo de 40 x.
5. Colocar una pequeña gota de aceite de inmersión y observar con el objetivo de 100 x.
6. Realizar un esquema de lo observado con los siguientes datos: cultivo o muestra, morfología, tipo de Gram, fecha.
7. Limpiar y colocar adecuadamente los objetivos del microscopio al terminar de utilizarlo.

**Muestra problema.**

Repetir la actividad con una muestra problema proporcionada por el profesor, entregar un reporte con los datos arriba señalados.

**Tratamiento de residuos:** Los cultivos deben esterilizarse usando el autoclave, los medios sólidos pueden ser desechados con los residuos orgánicos y los líquidos a la tarja.

**Cuestionario:**

1. ¿Qué pasaría si no se esteriliza el asa antes de tomar la muestra?
2. Un técnico realizó una tinción de Gram a un cultivo de 48 horas, el resultado al observarlo fue: cocos Gram negativos. Explicar si este resultado es confiable o no.
3. A un cultivo bacteriano de 20 horas se le realizó una tinción con fucsina, el reporte de esta tinción fue: bacilos Gram negativos. Explicar porque no es adecuado el reporte.

**Preparación de los reactivos utilizados.**

**Cristal violeta.** Disolver 2g de cristal violeta en 20 mL de alcohol al 95%, mezclar esta solución con una solución que contiene 0.8g de oxalato de amonio y 80 mL de agua.

**Lugol.** Disolver 2g de yoduro de potasio en 10 mL de agua, agregar 1g de yodo metálico y disolver lo más posible, agregar 20 mL de agua y se agitar hasta completa disolución.

**Safranina.** Disolver 2.5g de safranina en 100 mL de alcohol al 95 %.

**Decolorante.** Mezclar partes iguales de acetona y alcohol al 95 %.

**Bibliografía:**

- 7) Capuchino, J. G. y Sherman, N. (1990). **Microbiology. A laboratory Manual.** Benjamín/Cumming Publishing, Co. Inc. USA,.
- 8) Alvarez-Manrique. C. I. y Mendoza-Elvira, S. E. (2005) **Manual básico de bacteriología.** FESC, UNAM. México..
- 9) Baker, F. J. (1990) **Manual de técnicas de microbiología médica.** Acribia, Zaragoza España.
- 10) Ramírez-Gama, R. M. (2003) **Manual de prácticas de Microbiología General.** Fac. Química. UNAM. México.

**Evaluación**

**Instrucciones.** Para verificar que la tinción de Gram se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones, llenar la siguiente lista de cotejo.

El alumno:

Actividad	Evaluación
1. ¿Prepara el área aséptica de forma adecuada?	
2. ¿Esteriliza el asa bacteriológica de forma adecuada?	
3. ¿En condiciones asépticas, toma una muestra con el asa bacteriológica?	
4. ¿Extiende la muestra bacteriológica en el centro del portaobjetos?	
5. ¿Deja secar la asada hasta observarse una fina película sobre el portaobjetos?	
6. ¿Fija el frotis al calor?	
7. Adicionó sobre el frotis el colorante violeta de cristal por un minuto y lo lavó.	
8. ¿Adiciona sobre el frotis el Lugol por un minuto y lava el exceso?	
9. ¿Decolora el frotis con alcohol-acetona?	
10. ¿Adiciona sobre el frotis el colorante de contraste safranina y lava el exceso?	
11. ¿Seca al aire la preparación?	
12. ¿Coloca aceite de inmersión antes de usar la lente de 100X?	
13. ¿Enfoca correctamente el microscopio?	
14. ¿Limpia la lente?	
15. ¿Desconecta y guarda el microscopio?	
16. ¿Esteriliza los cultivos antes de desecharlos?	
17. ¿Trabaja colaborativamente con sus compañeros?	
18. ¿Su lugar está limpio y ordenado?	

**Recomendaciones:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Práctica No. 7**

---

---

**Aislamiento de bacterias a partir de una muestra problema**

***Propósitos.***

Que el alumno:

- Proponga una metodología para aislar un grupo bacteriano a partir de una muestra problema.
- Aplique las técnicas microbiológicas aprendidas en el módulo de Introducción al análisis bacteriológico en el un grupo bacteriano a partir de una muestra problema.

La metodología propuesta por el alumno debe contener los siguientes puntos.

- Objetivos.
- Tipo de muestra problema (agua, alimento, suelo, etc.).
- Medios de cultivo necesarios para el tipo bacteriano que se desea aislar.
- Metodología experimental.
- Tablas para la recolección de datos.
- Conclusiones.