

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

**MANUAL DE PRÁCTICAS
PROCESOS BIOLÓGICOS**

Código: 2411

**FACULTAD DE MEDIO AMBIENTE Y RECURSOS
NATURALES
ADMINISTRACIÓN AMBIENTAL**

AGOSTO DE 2019

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA

1. Entre al laboratorio con la bata puesta y permanezca con ella abotonada.
2. Debido a que los microorganismos con los cuales trabajará son potencialmente patógenos, es necesario que su manipulación se haga dentro de la mayor asepsia posible, esté atento a las recomendaciones.
3. Limpie la superficie de la mesa de trabajo con una solución germicida antes y después de la práctica.
4. Mantenga la mesa libre de todo aquello que no sea esencial. Sus objetos personales y libros guárdelos en los gabinetes destinados para tal fin.
5. Lave sus manos y desinféctelas antes y después de realizar cualquier siembra.
6. No fume ni coma dentro del laboratorio
7. Maneje correctamente el microscopio y tome las precauciones necesarias de limpieza y mantenimiento.
8. Durante el semestre le serán asignadas a cada curso de laboratorio un sitio específico para incubación y mantenimiento de materiales, que debe ser conservado durante todo el semestre. Así mismo los materiales asignados deben ser cuidados para el adecuado desarrollo de las prácticas.
9. Debe traer un equipo de trabajo compuesto por una asa de bacteriología de punta recta, una de punta redonda y una de micología. Cinta para enmascarar, lápiz de cera y algunos elementos como tijeras o cortador, jabón, un limpión y fósforos.

PRÁCTICA/ACTIVIDAD	FECHA
INTRODUCCION- NORMATIVIDAD/ BIOSEGURIDAD	Agosto
MICROSCOPIA PRIMERA PARTE. MORFOLOGIA Y TINCIONES MICROBIANAS	Agosto
MICROSCOPIA SEGUNDA PARTE. MORFOLOGIA Y TINCIONES MICROBIANAS	Agosto
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO METODOS DE SIEMBRA	Septiembre
Lectura Métodos de Siembra METODOS DE RECUESTO I	Septiembre
METODOS SIMPLIFICADOS DE ESTUDIO DE LAS BACTERIAS	Septiembre
CONTROL MICROBIANO	Septiembre
CONTROL MICROBIANO POR AGENTES FISICOS Y QUIMICOS	Septiembre
METODOS PARA EL RECUESTO DE MICROORAGNISMOS INDICADORES EN AGUA POTABLES Y NATURALES	Octubre
PRUEBA/ TEST ECOMETRICA	Octubre
PREPARACION DE YOGURT	Octubre
INTERACCIONES MICROBIANAS I: VERIFICACIÓN DEL EFECTO SIMBIOSIS DEL RHIZOBIUM Y LEGUMINOSA	Octubre
IDENTIFICACION DE HONGOS	Octubre
IDENTIFICACIÓN DE PROTOZOARIOS	Noviembre

PRACTICA No. 1

MORFOLOGIA BACTERIANA Y TÉCNICAS DE TINCION

INTRODUCCIÓN

Morfología bacteriana:

A pesar de la gran cantidad de bacterias que se desarrollan en una gran diversidad de hábitats, su forma se reduce a 3 tipos básicos: Los cocos (redondos), los bacilos (alargados) y los espirilos (en forma de sacacorchos). Además en el caso de las bacterias esféricas se pueden distinguir agrupaciones como diplococos, sarcinas, tetradas, estafilococos y estreptococos.

Preparaciones para observar morfología:

La morfología microbiana se puede examinar de dos maneras. Primero observando las preparaciones sin colorear (preparaciones en fresco, por ejemplo para observar protozoos y microalgas) y preparando extensiones delgadas llamadas frotis que se fijan y colorean. El objeto de la fijación es coagular el protoplasma preservando la morfología, adicionalmente se permite la adhesión de la muestra en el portaobjetos. El de la coloración es hacer los microorganismos y sus estructuras visibles. Como agentes de fijación se pueden utilizar el calor, el alcohol y varios compuestos químicos. El más empleado para las tinciones bacterianas es el calor.

Tipos de tinciones:

Tinción simple: Se lleva a cabo con colorantes básicos como el azul de metileno y el cristal violeta; y colorantes ácidos como la nigrosina.

Tinción diferencial: Como la coloración de Gram y la coloración de ácido alcohol resistencia.

Tinción de estructuras: Como la tinción de Feulgen para colorear material genético, la tinción de Schaeffer Fulton para endosporas, la tinción de la pared celular, la tinción de flagelos y la tinción de cápsulas.

Tinción de material de reserva: Ejemplos son la tinción de Albert o de glucógeno y la tinción de los lípidos.

PROCEDIMIENTO

A. Preparaciones en fresco

Son muy utilizadas para observar muestras directas de protozoos, tienen poco uso en bacteriología a menos que se use un microscopio de contraste de fase.

1. En una lámina portaobjetos limpia y marcada colocar una gota de un caldo de cultivo, suavemente coloque una laminilla cubreobjetos y déjela caer en ángulo de 45°.
2. Colocar la preparación en la platina del microscopio, observar con los objetivos de 10X, 40X y 100X. Utilizar la misma muestra y prepara frotis fijos, colorear con azul de metileno en la primera práctica y con la coloración de Gram en la siguiente, comparar los resultados en cada caso.

B. Frotis fijos

1. En una lámina portaobjetos limpia y marcada, colocar una gota de agua destilada, Las extensiones a partir de medios líquidos se hacen de la misma manera, excepto que no se requiere adición de agua.
2. Suspender en la gota el inoculo bacteriano, utilizar el asa bacteriológica estéril.
3. Extender la gota de suspensión en un área no superior a dos centímetros cuadrados. Seguir instrucciones del profesor.
4. Dejar que la preparación se seque al aire. Fijar con calor, pasando tres veces seguidas a través de la llama del mechero. Colorear.

C. Tinciones

• TINCIÓN SIMPLE:

1. Colocar la preparación sobre una rejilla encima del vertedero.
2. Cubrir la preparación con cualquiera de las soluciones colorantes que se indican a continuación.
 - a. Cristal violeta (solución al 5% en agua): 1 minuto.
 - b. Azul de metileno de Loeffler : 5 minutos
 - c. Fucsina fenicada diluida: 30 segundos
3. Después del tiempo indicado, eliminar el colorante y lavar suavemente con el chorro del agua.
4. Dejar secar.

5. Colocar la preparación en la platina y observar con el objetivo de menor aumento. Una vez logre el enfoque en 10X y 40X, desplace la lámina a uno de los extremos y coloque una gota de aceite de inmersión sobre la preparación. Girar el revólver para que el objetivo de inmersión quede en posición de observación, enfocar. Si la distancia focal es correcta el lente de 100X entrará en contacto con el aceite. Mientras está observando el objeto a través del microscopio levante o acerque muy lentamente el objetivo con el tornillo micrométrico hasta lograr nitidez.
6. Registrar lo observado. Elaborar el informe.
7. Después de utilizar el microscopio, limpiar el aceite de inmersión de los lentes utilizando papel de arroz u otro papel fino.

- **COLORACIONES COMPUESTAS**

- **COLORACION DE GRAM**

1. Preparar un frotis según se indicó en la sección anterior. (A partir de las cepas que le entreguen en el laboratorio y de un frotis faríngeo según indicaciones del profesor).
2. Cubra el frotis con unas pocas gotas del colorante cristal violeta de Gram dejar 2 minutos. Derramar en el vertedero el exceso de colorante. Enjuagar con agua destilada o de la llave.
3. Agregar algunas gotas del reactivo lugol de Gram para cubrir la preparación, dejar por 2 minutos. Lavar la preparación con un chorro suave de agua.
4. Realizar la decoloración con la mezcla alcohol-acetona, por 30 segundos. Lavar inmediatamente en una corriente suave de agua de la llave.
5. Agregar el colorante de contraste (fucsina de Gram o safranina) dejar 15 segundos. Lavar con agua como se ha indicado. Escurrir el exceso de agua.
6. Observar con objetivo 10X, 40X y 100X. Registrar lo observado y elaborar informe.

ACTIVIDAD

Describa las diferencias de tamaño entre las células eucarióticas (epitelio faríngeo) y las células procarióticas (microbiota faríngea)

- **TINCIÓN PARA ÁCIDO ALCOHOL RESISTENCIA. COLORACIÓN DE ZIEHL - NEELSEN:**

La resistencia de las micobacterias a la decoloración por ácidos se basa en el hecho de que poseen una capa serosa que previene o impide a los colorantes absorbidos por las células ser extraídos por un tratamiento de lavado con alcohol-ácido.

1. Elaborar un frotis a partir de tierra, fijar con calor
2. Colocar las láminas fijadas en la rejilla de coloración y cubrir con fucsina fenicada. Calentar suavemente sobre un mechero de alcohol hasta emisión de vapores, evitar que el colorante se seque o hierva. Dejar enfriar luego de cada calentamiento. Realizar este procedimiento durante cinco minutos. Retirar el colorante y lavar con agua de chorro.
3. Decolorar con alcohol - ácido durante 20 segundos. Lavar con agua.
4. Contra colorear con azul de metileno por un minuto. Lavar con agua y secar al aire.

Las micobacterias se ven como bacilos rojos sobre un fondo azul pálido.

- TINCIÓN DE ESTRUCTURAS.

- MÉTODO DE SCHAEFFER - FULTON PARA ENDOSPORAS:

En este procedimiento, un tinte acuoso primario es aplicado al espécimen y evaporado para aumentar la penetración de las cubiertas de las esporas, relativamente impermeables. El procedimiento a seguir es el siguiente:

1. Preparar un frotis a partir de *Bacillus subtilis*, fijar con calor.
2. Cubrir el frotis con verde de malaquita por 5 minutos calentar con un mechero de alcohol. Enfriar la placa y lavar con agua destilada.
3. Contra colorear con safranina al 0.5% por un minuto. Lavar nuevamente y deje secar al aire.

SEGUIMIENTO

- ❖ Presentar un informe escrito después de haber realizado el procedimiento y analizado los resultados con las indicaciones hechas por el docente.
- ❖ Por grupo de trabajo entregar al profesor las preparaciones realizadas durante la práctica

- ❖ CUESTIONARIO

1. Describa y explique el fundamento de 3 tinciones utilizadas en microbiología, diferentes a las realizadas en la práctica de laboratorio.
2. Explique el fundamento y los usos potenciales de la microscopía de:
Contraste de fase
Campo claro
Campo oscuro

Microscopía electrónica de barrido
Microscopía electrónica de transferencia

3. Por qué la mayoría de los colorantes en biología son básicos?
4. Cuál es el fundamento teórico de la coloración de Gram?

ANEXO

Materiales y Reactivos:

Láminas portaobjetos
Asas bacteriológicas
Algodón
Tubos de ensayo
Cinta para enmascarar
Aceite de inmersión
Colorantes de Gram
Tierra
Cepas de bacterias
Mecheros de alcohol

Baja lenguas
Pinzas de madera
Gradillas
Mechero de alcohol
Colorantes de endosporas
Solución desinfectante (Tego)
Colorantes de Ziehl Neelsen
Azul de metileno
Rejillas para colorear

Equipos:

Microscopios de campo brillante
Microscopio de contraste de fase

PRACTICA No. 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

INTRODUCCIÓN

Una manera sencilla para estudiar los microorganismos es hacerlos crecer en un medio de cultivo contenido en un tubo de ensayo, en una caja de Petri o en un Erlenmeyer.

Medios de cultivo: Al igual que otros seres vivos, los microorganismos necesitan nutrientes apropiados junto con condiciones ambientales favorables para un buen desarrollo. El medio de cultivo es el vehículo que debe contener los nutrientes esenciales para su crecimiento *in vitro*. En general los medios de cultivo se encuentran en las siguientes formas:

Medio de cultivo sólido: Con un porcentaje de agar entre el 1 – 1.6 %.

Medio de cultivo semisólido: Porcentaje de agar alrededor de 0.5%.

Medio de cultivo líquido: También conocido como caldo, no contiene agar.

El tipo y modo de preparación de los medios de cultivo son decisivos para obtener una solución óptima y de alto rendimiento. Para la preparación de cualquier medio es recomendable tener en cuenta:

- Emplear agua destilada o desmineralizada fresca, de reacción neutra y dentro de lo posible pobre en gérmenes.
- Utilizar recipientes poco alcalinos como el vidrio u ollas esmaltadas.
- A una cantidad de agua aproximadamente igual a la mitad de la necesaria a la que se vaya a preparar, adicionar la cantidad prescrita en la etiqueta del frasco del medio de cultivo deshidratado. Hacer una suspensión homogénea y luego agregar el agua restante.
- Los medios que contienen agar se dejan en reposo durante 10 minutos para que pueda embeberse el agar por el agua, y se colocan en una estufa o en el mechero hasta que hierva y el líquido esté brillante. Para caldo o medios que no contienen agar no es necesario hervir. **DEBE EVITARSE TODO CALENTAMIENTO INNECESARIAMENTE PROLONGADO.**
- Los medios preparados se dispensan en tubos y se taponan con algodón para ser esterilizados en el autoclave. Si el medio a preparar es para servir en cajas, se coloca en el autoclave en un erlenmeyer que sea del doble del

volumen deseado. Ejemplo: si desea preparar 100 ml de agar nutritivo, se trabaja en un erlenmeyer de 200 ml o más.

- Si se siguen las normas de preparación de cada medio, no será necesario ni filtrar, ni corregir el pH después de la esterilización. Pero es recomendable efectuar a cada lote del medio preparado una prueba de esterilidad y una prueba de efectividad.

El crecimiento puede manifestarse de diferentes formas como son el enturbiamiento y opacidad del medio, la formación de un velo originado por una masa de organismos que flotan en la parte superior del cultivo o como un sedimento en la parte inferior del tubo, pero que se pone en suspensión cuando se agita. En el medio sólido el crecimiento de los microorganismos se manifiesta por formación de colonias. La manera típica en la cual crece cada microorganismo en un medio de cultivo ya sea líquido o sólido, en condiciones ambientales constantes es muy útil para su identificación. Para cada uno de los medios de cultivo existen diferentes métodos de siembra:

Medios de cultivo líquidos: Se siembra generalmente con asa de bacteriología de punta redonda y se hace una suspensión del inóculo en el medio de cultivo.

Medios de cultivo semisólidos. Se hace por picadura o punción, con el asa de punta recta. Se siguen todas las precauciones asépticas, por el mismo sitio que se introduce el asa, se saca sin formar espiral.

Medios de cultivos sólidos. Se pueden realizar siembras en la superficie o en profundidad (en superficie se adiciona el medio de cultivo a la caja de Petri o al tubo, se deja solidificar y luego se inócula la bacteria. En el método de siembra en profundidad primero se adiciona el inóculo y posteriormente el medio de cultivo).

Medios de cultivo sólidos en tubo. Si el medio tiene superficie plana se siembra por punción. Si se observa el medio con una superficie inclinada se siembra por punción realizando una espiral a la salida del asa. En ambos casos se usa el asa de bacteriología de punta recta.

Medios de cultivo sólidos en cajas de Petri. Cuando se quieran aislar uno o varios microorganismos se usan varios métodos como el de espiral, en estrías (rejilla) y combinado (Figura 2.1).

PROCEDIMIENTO

Preparación de medio de cultivo líquido (caldo BHI, caldo nutritivo).

Cálculo para 10 grupos de todo el laboratorio: 10 tubos de 5 mL cada uno=50 mL
Volumen total a preparar: 80 mL considerando unos tubos sobrantes

1. Tomar el envase de medio de cultivo deshidratado asignado y leer cuidadosamente las instrucciones de preparación del medio de cultivo.
2. Realizar los cálculos correspondientes de acuerdo al volumen de medio de cultivo a prepara. Muestre a su profesor.
3. Pesar la cantidad exacta del medio deshidratado. Cerrar inmediatamente el frasco.
4. Disolver la porción pesada de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Si es necesario calentar, tener cuidado de revolver frecuentemente y no sobrecalentar
5. Si es necesario ajustar el pH final. Si el medio se preparó correctamente, este paso no siempre es necesario.
6. Si la presentación del medio de cultivo es en tubos de ensayo, servir el volumen indicado cuidadosamente con una pipeta graduada en los tubos sin esterilizar. Estos se llevan a autoclave directamente servidos en los tubos, con la tapa ligeramente ajustada o con el tapón de algodón. Marque adecuadamente con el tipo de medio de cultivo, fecha de preparación y demás datos que considere adecuados.
7. Si la presentación del medio de cultivo es en cajas de petri, se lleva a autoclave en erlenmeyers del doble del volumen a preparar. Las cajas de petri se esterilizan por calor seco y después se sirven en cabina de flujo laminar para asegurar la asepsia del proceso. Marque adecuadamente con el tipo de medio de cultivo, fecha de preparación y demás datos que considere adecuados.
8. Tenga en cuenta la siguiente tabla para preparar las cantidades de medio de cultivo:

NUMERO DE GRUPO	MEDIO DE CULTIVO A PREPARAR	CANTIDAD A PREPARAR	VOLUMEN TOTAL A PREPARAR
1	SPC	17 cajas con 20 mL c/u	340 mL
2	Agar Nutritivo superficie plana	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
3	BHI	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
4	Caldo Nutritivo	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
5	TSI Agar Hierro Triple Azúcar	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
6	Agar Nutritivo superficie Inclinado	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL

NUMERO DE GRUPO	MEDIO DE CULTIVO A PREPARAR	CANTIDAD PREPARAR	VOLUMEN TOTAL PREPARAR
7	Agar SIM-Sulfuro Indol Movilidad	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
8	Agar YGC ó Agar PDA (Control ambiental).	17 cajas con 20 mL c/u	340 mL
9	Agar Nutritivo(Control ambiental)	17 cajas con 20 mL c/u	340 mL
10	Caldo Rojo de metilo Vogues -Proskaver	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
11	Citrato de Simmons	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
12	Oxidación-Fermentación	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
13	Caldo UREA	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
14	Agar LIA	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
15	Agar APP	17 tubos con 5 mL c/u	85 mL
16	Agar nutritivo (Siembra por masividad).	17 cajas con 20 mL c/u	340 mL
17	Agar nutritivo (Siembra por agotamiento).	17 cajas con 20 mL c/u	340 mL

SEGUIMIENTO

- ❖ Elaborar un informe escrito de las observaciones y resultados obtenidos durante la práctica describiendo el estado físico, apariencia, tipo de medio de cultivo entre otros.
- ❖ Medio de cultivo: _____
- ❖ Cantidad preparada: _____
- ❖ pH inicial _____ pH final: _____
- ❖ Cantidad pesada: _____
- ❖ Cálculos: _____

❖ CUESTIONARIO.

1. ¿Qué es un medio de cultivo complejo?
2. ¿Qué precauciones debe tener en cuenta con el almacenamiento de los medios de cultivo deshidratado y por qué?
3. ¿Cómo se esteriliza un medio de cultivo cuyos componentes son sensibles al calor?

ANEXO

Materiales y Reactivos:

Cajas de Petri estériles
Estufa
Algodón
Tubos de ensayo 16x160 mm
Balanza

Tubos de ensayo 18x180 mm
Pipetas de 10 ml
Gradilla
pHmetro
Agua destilada

Equipos:

Microscopio
Nevera

Incubadora
Autoclave para esterilizar

PRACTICA No. 3

METODOS DE SIEMBRA

INTRODUCCIÓN

Una manera sencilla para estudiar los microorganismos es hacerlos crecer en un medio de cultivo contenido en un tubo de ensayo, en una caja de Petri o en un erlenmeyer.

Medios de cultivo: Al igual que otros seres vivos, los microorganismos necesitan nutrientes apropiados junto con condiciones ambientales favorables para un buen desarrollo. El medio de cultivo es el vehículo que debe contener los nutrientes esenciales para su crecimiento *in vitro*. En general los medios de cultivo se encuentran en las siguientes formas:

Medio de cultivo sólido: Con un porcentaje de agar entre el 1 – 1.6 %.

Medio de cultivo semisólido: Porcentaje de agar alrededor de 0.5%.

Medio de cultivo líquido: También conocido como caldo, no contiene agar.

El tipo y modo de preparación de los medios de cultivo son decisivos para obtener una solución óptima y de alto rendimiento. Para la preparación de cualquier medio es recomendable tener en cuenta:

- Emplear agua destilada o desmineralizada fresca, de reacción neutra y dentro de lo posible pobre en gérmenes.
- Utilizar recipientes poco alcalinos como el vidrio u ollas esmaltadas.
- A una cantidad de agua aproximadamente igual a la mitad de la necesaria a la que se vaya a preparar, adicionar la cantidad prescrita en la etiqueta del frasco del medio de cultivo deshidratado. Hacer una suspensión homogénea y luego agregar el agua restante.
- Los medios que contienen agar se dejan en reposo durante 10 minutos para que pueda embeberse el agar por el agua, y se colocan en una estufa o en el mechero hasta que hierva y el líquido esté brillante. Para caldo o medios que no contienen agar no es necesario hervir. **DEBE EVITARSE TODO CALENTAMIENTO INNECESARIAMENTE PROLONGADO.**
- Los medios preparados se dispensan en tubos y se taponan con algodón para ser esterilizados en el autoclave. Si el medio a preparar es para servir en cajas, se coloca en el autoclave en un erlenmeyer que sea del doble del volumen deseado. Ejemplo: si desea preparar 100 ml de agar nutritivo, se trabaja en un erlenmeyer de 200 ml o más.

- Si se siguen las normas de preparación de cada medio, no será necesario ni filtrar, ni corregir el pH después de la esterilización. Pero es recomendable efectuar a cada lote del medio preparado una prueba de esterilidad y una prueba de efectividad.

El crecimiento puede manifestarse de diferentes formas como son el enturbiamiento y opacidad del medio, la formación de un velo originado por una masa de organismos que flotan en la parte superior del cultivo o como un sedimento en la parte inferior del tubo, pero que se pone en suspensión cuando se agita. En el medio sólido el crecimiento de los microorganismos se manifiesta por formación de colonias. La manera típica en la cual crece cada microorganismo en un medio de cultivo ya sea líquido o sólido, en condiciones ambientales constantes es muy útil para su identificación. Para cada uno de los medios de cultivo existen diferentes métodos de siembra:

Medios de cultivo líquidos: Se siembra generalmente con asa de bacteriología de punta redonda y se hace una suspensión del inóculo en el medio de cultivo.

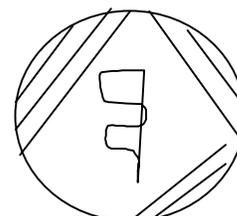
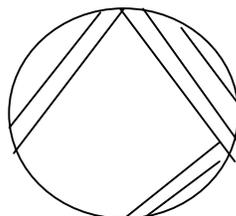
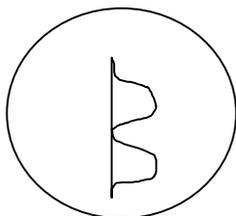
Medios de cultivo semisólidos. Se hace por picadura o punción, con el asa de punta recta. Se siguen todas las precauciones asépticas, por el mismo sitio que se introduce el asa, se saca sin formar espiral.

Medios de cultivos sólidos. Se pueden realizar siembras en la superficie o en profundidad (en superficie se adiciona el medio de cultivo a la caja de Petri o al tubo, se deja solidificar y luego se inócula la bacteria. En el método de siembra en profundidad primero se adiciona el inóculo y posteriormente el medio de cultivo).

Medios de cultivo sólidos en tubo. Si el medio tiene superficie plana se siembra por punción. Si se observa el medio con una superficie inclinada se siembra por punción realizando una espiral a la salida del asa. En ambos casos se usa el asa de bacteriología de punta recta.

Medios de cultivo sólidos en cajas de Petri. Cuando se quieran aislar uno o varios microorganismos se usan varios métodos como el de espiral, en estrías (rejilla) y combinado (Figura 2.1).

Siembra por agotamiento: Con este método se busca lograr colonias aisladas en la superficie del medio de cultivo, para así obtener cultivos puros. Las colonias aisladas son morfológica y fisiológicamente iguales y son las que deben utilizarse para realizar pruebas bioquímicas.



Espiral

Rejilla

Combinado

Figura 2.1. Métodos de siembra en medios de cultivo sólido servido en cajas de Petri.

Siembra profunda en placas: se usa cuando se desea hacer recuento de colonias (aguas, leches, etc.). Inicialmente se adiciona a una caja de Petri, un volumen conocido de la muestra, luego el medio con agar es vertido líquido a una temperatura de 45°C. Al solidificar el agar, las bacterias quedan inmovilizadas y se desarrollan como colonias visibles que se cuentan o pueden ser transferidas a un medio cualquiera.

Ambientales.

Es un procedimiento útil para saber la carga de microorganismos del aire de una área determinada. Para ello se expone la superficie de un medio de cultivo al aire del sitio seleccionado, se expone durante cierto tiempo (generalmente 15 minutos) y luego se lleva a incubar. En un laboratorio de microbiología el número de colonias hallado por esta técnica no debe exceder a 15 colonias/65 cm²/15 minutos.

PROCEDIMIENTO

Sistema de siembra en medio líquido:

El monitor entregara a cada grupo los medios de cultivo y las cepas bacterianas. Seguir las siguientes instrucciones:

1. Calentar el asa al rojo, dejarla enfriar.
2. Tomar el tubo con el medio a inocular y el tubo de la muestra con la mano izquierda, remover con la mano derecha el algodón de ambos, flamear suavemente la boca de ambos tubos e introducir el asa redonda; sacar una gota de la muestra y depositarla en el medio de cultivo estéril, flamear ambos tubos y algodones antes de taponar. El asa debe calentarse al rojo antes de volverla a colocar en la mesa.

Sistema de siembra en medio sólido:

En cajas Petri:

1. Tener en cuenta técnicas asépticas. Sembrar por agotamiento (observar demostración del instructor) un agar nutritivo.

En tubos de ensayo:

1. Seguir las mismas recomendaciones pero usar asa de bacteriología de punta recta. Sembrar un agar motilidad.

2. En tubos con medios de cultivo con superficie plana realizar una picadura o punción. Sí el medio tiene superficie inclinada al sacar el asa del medio hacer una espiral en la superficie, utilizar el medio suministrado por el docente.

Ambientales:

1. Elegir un sitio para conocer la densidad bacteriana del aire. Tomar una caja del agar nutritivo, destaparla y exponerla al aire durante 15 minutos.
2. Incubar con todo el material sembrado en la práctica.
3. Contar las colonias desarrolladas en el medio.
4. Reportar y elaborar informe.
5. Estudiar morfología de colonias con ayuda de la figura 3.1.

Incubación:

Todos los materiales inoculados en la práctica se colocan en canastilla marcada con el número de grupo y fecha. Todo el material en su interior debe estar marcado de manera similar. Incubar a $35\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ durante 24-48 horas. Cada grupo debe verificar la temperatura.

Lectura de resultados:

Revisar, anotar y describir los resultados obtenidos en cada caso: el crecimiento de colonias, la obtención de colonias aisladas, morfología de colonias (tabla 2-1) presencia y tipo de contaminación etc.

SEGUIMIENTO

❖ Elaborar un informe escrito de las observaciones y resultados obtenidos durante la práctica. Presentar siembras y los resultados adecuadamente interpretados.

❖ CUESTIONARIO.

4. ¿Qué es un pigmento bacteriano? ¿Qué clases de pigmentos de bacterias se conocen? ¿Cómo se pueden identificar?
5. Cree que existe relación con la identificación de los pigmentos bacterianos con el tema visto en la práctica de hoy. ¿Por qué?
6. Por qué muchos de los microorganismos del aire poseen pigmentos?Cuál será la función de dichos pigmentos?

ANEXO

Materiales y Reactivos:

Portaobjetos

Tubos de ensayo 18x180 mm

Asas bacteriológicas
Algodón
Tubos de ensayo 16x160 mm
Parafina
Cepas de enterobacterias:

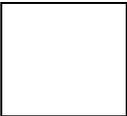
Pipetas de 1 ml
Gradilla
Canastilla
Reactivo de Kovacs

Equipos:

Microscopio
Incubadora
Nevera
Olla autoclave para esterilizar

FIGURA 2.1: CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS BACTERIANAS UTILES PARA SU IDENTIFICACION*

TAMAÑO: En mm

FORMA:	Puntiforme	
	Circular	
	Filamentosa	
	Ameboide	
	Rizoide	
	Fusiforme	

COLOR: **Pigmento extracelular: El medio de cultivo cambia de color**
Pigmento intracelular: La colonia es coloreada

CONSISTENCIA O TEXTURA: **Viscosa**
Seca
Desmenuzable
Grasosa

ELEVACION:	Plana		Elevada	
	Cóncava		Pulvinada	
	Umbonada			
BORDE:	Entera (circular)		Ondulada	
	Lobulada		Crenada	
	Filamentosa		Enrollada	

*Características uniformes para un medio de cultivo y un tiempo de incubación dado

b. CONTROLES AMBIENTALES

Estudiante	Fecha	Tiempo de exposición	Número de colonias-UFC	
			AGAR NUTRITIVO	AGAR YGC
1				
2				
3				

Nota: Estar atentos a los resultados de los otros grupos y tenerlos en cuenta en la discusión

PRÁCTICA No. 4

METODOS SIMPLIFICADOS PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS

INTRODUCCIÓN

Aun cuando los métodos tradicionales para estudiar las bacterias siguen siendo herramientas bastante utilizadas, muchos de ellos son engorrosos, consumen mucho tiempo, requieren muchos operarios, algunas veces muy entrenados, para su realización, así como laboratorios con áreas bien diferenciadas y bastante equipo. Debido a lo anterior se han diseñado sistemas más simplificados que generalmente son simples, rápidos y no requieren mucho tiempo para su realización.

Identificación bioquímica con sistemas rápidos:

En la actualidad por razones de comodidad se han diseñado baterías (o kits) de reacciones bioquímicas que vienen integradas en unidades que reciben diferentes nombres según su utilización o la casa comercial que la produzca. Por ejemplo: API 20E y el MICROID: este último es un sistema cómodo y sobre todo rápido, a las cuatro horas ya se obtienen resultados pero es más usado para el diagnóstico clínico. El sistema API 20E es útil para la identificación de muchos bacilos Gram negativos, fermentadores, oxidasa positivos y negativos.

Método del Sustrato Definido o Cromogénico para coliformes:

Este método se aplica actualmente para la detección de coliformes totales y *Escherichia coli* en aguas. Utiliza sustratos hidrolizables por enzimas específicas de esas bacterias. Cuando se usa la técnica cromogénica los coliformes totales se definen como todas aquellas bacterias que poseen la enzima β -D-galactosidasa la cual al romper el sustrato libera un compuesto coloreado. *Escherichia coli* se define como una bacteria perteneciente a los coliformes por lo tanto es β -D-galactosidasa positiva, que además posee la β -glucuronidasa la cual actúa sobre un sustrato fluorogénico liberando un compuesto fluorescente. Varias casas comerciales han propuesto diseños que permiten el recuento o la detección (Presencia/Ausencia) de estos indicadores en muestras de agua potables, residuales y naturales.

PROCESO

1. Preparación

- Cada grupo debe programar con el monitor la hora de asistencia al laboratorio para lectura de pruebas a las 24 y 48 horas.

2. Ejecución

Identificación bioquímica con API 20E

Cada grupo utilizará una bacteria coliforme incluida *Escherichia coli*.

1. Seguir las instrucciones del profesor.
2. Incubar en cámara húmeda y leer a las 24 y a las 48 horas.

Método del sustrato Cromogénico:

En la práctica va a identificar presencia de coliformes y *Escherichia coli* en muestras de agua potable, usará un sistema para monitoreo (cuando desea tener respuestas cualitativas, positivo/negativo) de calidad. Es muy importante que un grupo prepare un control negativo (agua destilada estéril) y otro un control positivo (agua destilada inoculada con *Escherichia coli*).

1. Agregar el reactivo (viene en dosis) a 100 ml de la muestra de agua
2. Incubar a $35 \pm 0.5^\circ \text{C}$ por 24 horas
3. Leer los resultados: Incoloro: negativo para coliformes totales y *E. coli*. Amarillo: positivo para coliformes. Fluorescente (cuando utiliza una lámpara ultravioleta con longitud de onda de 365 nm): positivo para *E. coli*.

SEGUIMIENTO

- ❖ Presentar un informe escrito por grupo después de haber realizado las observaciones con las indicaciones hechas por el docente.
- ❖ Asistir al laboratorio cada 24 y/o 48 horas después de cada prueba para hacer las respectivas lecturas. Coordinar con el monitor la hora de trabajo. No interrumpir la realización de prácticas de grupos diferentes.
- ❖ CUESTIONARIO:
 1. Por qué *Escherichia coli* se utiliza como indicador de contaminación fecal?
 - 2.Cuál es la diferencia entre bacterias alóctonas y autóctonas? De ejemplos. En qué grupo se encuentran los coliformes?

3. Por qué es importante contar con métodos simplificados y rápidos para la identificación de bacterias?
- 4.Cuál es el principio general del método del sustrato definido? Qué ventajas tiene sobre los métodos tradicionales para la detección de producción de enzimas?

Materiales y Reactivos:

API 20E	Cajas de Petri
Tubos Durham	Erlenmeyer 500 ml
Pipetas de 10 ml.	Filtro Millipore 8 mm
Pipeta 0.1 ml	Erlenmeyer 250 ml.
Gradilla	Frascos estériles
Colilert u otro método de sustrato definido	

Equipos:

Nevera	Horno
Autoclave	Cámara cuenta colonias

PRACTICA No. 5

CONTROL MICROBIANO POR AGENTES FISICOS Y QUIMICOS

INTRODUCCIÓN

Los factores físicos y químicos tienen un efecto notable sobre la vida de los microorganismos en su medio ambiente natural. Algunos estimulan su desarrollo en tanto que otros lo retardan o lo impiden. El conocimiento del efecto de esos parámetros medio ambientales no solo permitió estudiar los microorganismos bajo condiciones controladas de laboratorio para favorecer su crecimiento sino que permitió aprender la forma de controlarlos. Este último campo, el del control microbiano, constituye una de las áreas más importantes de la Microbiología Aplicada principalmente en los relacionados con sanidad y producción industrial. Se reconoce que un agente microbiostático impide el desarrollo de uno o varios microorganismos y uno microbicida causa su muerte. Además el uso de filtros tanto en el laboratorio como en ambientes naturales, como por ejemplo su paso por arena o por capas de la tierra, favorece su eliminación mecánica.

En este laboratorio podrá apreciar el efecto de la temperatura, agentes antimicrobianos y pH sobre el desarrollo de algunos microorganismos.

PROCESO

1. Preparación

- Traer correctamente leída y preparada la práctica a realizar. El éxito del trabajo en el laboratorio depende de una buena organización y preparación.
- Durante esta sesión realizará actividades que serán interpretadas en la primera parte de la práctica de la semana entrante.

2. Ejecución

NOTA: Es muy importante sembrar de último el *Bacillus subtilis* en un sitio apartado del laboratorio.

a. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento bacteriano

- Cultivo de *Escherichia coli*
 - Cultivo de *Bacillus subtilis*
 - Caldo rojo de fenol (RF) glucosa
-
- Inocular cada cepa en 4 de los caldos suministrados. Marcar muy bien
 - Someter parejas (una formada por un caldo RF glucosa inoculado con *E. coli* y otro con *B. subtilis*) a uno de los siguientes tratamientos:

- Calor húmedo (121°C durante 15 minutos, en autoclave)
 - Pasteurización (72°C durante 15 minutos, en el baño maría)
 - Calor seco (140°C durante dos horas, en el horno)
 - Sin tratamiento térmico (Controles)
- Después de cada tratamiento, incubar los tubos a 35 °C / 24 horas.
 - Observar y anotar los resultados, tabla 5.1.

NOTA: Es muy importante sembrar de último el *Bacillus subtilis* en un sitio apartado del laboratorio.

b. Efecto del pH sobre el crecimiento microbiano*

- Cultivo de *Bacillus subtilis*.
 - Cultivo de *Escherichia coli*
 - Cultivo de *Serratia marcescens*
 - Cultivo de *Sacharomyces cerevisiae*
- Inocular cada cepa en caldo RF glucosa pH 9, 7, 5 y 3.
 - Incubar durante 24 horas a 35 +/- 0.5 °C
 - Observar el crecimiento así como los posibles cambios de coloración del indicador.
 - Divida una caja con agar Nutritivo o agar PDA, divídala en cuatro partes iguales y en cada cuarto siembre con un espiral a partir de cada uno de los tubos.
 - Incube a 35 +/- 0.5 °C durante 24 horas.
 - Observe y anote los resultados, use la tabla 5.1.

* El profesor o el monitor repartirán a cada grupo una de las cepas seleccionadas.

c. Efecto de agentes antimicrobianos sobre el crecimiento microbiano*

- Cultivo de *Bacillus subtilis*.
 - Cultivo de *Escherichia coli*
 - Cultivo de *Serratia marcescens*
 - Cultivo de *Sacharomyces cerevisiae*
- En una caja de petri de Agar nutritivo, inocular cada una de las cepas.

- Impregnar con sensidiscos estériles alcohol, yodo, hipoclorito y tego 51. Luego colocarlos sobre cada caja con petri con cada microorganismo, dejando espacio entre ellos. Incubar durante 24 horas a 35 +/- 0.5 °C
 - Observar el desarrollo de halos de inhibición en cada caso.
 - Observe y anote los resultados.
- * El profesor o el monitor repartirán a cada grupo una de las cepas seleccionadas.

SEGUIMIENTO

- ❖ Elaborar un informe escrito de las observaciones y los resultados obtenidos durante la práctica.
 - ❖ CUESTIONARIO
1. Explique a que se refiere el tiempo de reducción decimal en la temperatura. Cómo aplicaría este concepto en la estandarización de un proceso de esterilización por calor?
 2. Cómo podría demostrar si un microorganismo es termófilo o termotolerante?
 3. Para cada uno de los agentes antimicrobianos investigue sobre el efecto a nivel celular en la célula. Cómo explica estos resultados?
 4. Explique por qué el pH puede controlar el crecimiento bacteriano

Materiales y Reactivos:

Láminas Portaobjetos	Tubos de ensayo 18x180 mm
Asas bacteriológicas	Pipetas de 1 ml y 10 ml
Algodón	Gradilla
Tubos de ensayo 16x160 mm	Canastilla
Parafina	Reactivo de Kovacs
Cepas de las bacterias seleccionadas	agar PCA
Tubos de ensayo	erlenmeyer de 250 ml
Caldo RF glucosa (pH 9, 7, 5 y 3)	

Equipos:

Autoclave	Horno de esterilización	Incubadora
-----------	-------------------------	------------

PRACTICA No. 6

METODOS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS INDICADORES EN AGUAS POTABLES Y NATURALES

INTRODUCCIÓN

Hay varios métodos para determinar el número de gérmenes presentes en una muestra de agua. En esta práctica se entrenará en los principios básicos para realizar los tres más utilizados, el método de la placa vertida o recuento standard en placa, el número más probable (NMP) y el de filtración por membrana. Adicionalmente, conocerá el método del sustrato definido, el cual se usa actualmente y es un método sugerido en la evaluación microbiológica del agua potable.

Muchas de las bacterias propias del agua son Gram negativas. Sin embargo, los miembros de la familia Enterobacteriaceae (alóctonos del ecosistema acuático) son particularmente importantes puesto que indican procesos de contaminación por ejemplo con aguas residuales. Un grupo de ellos, las bacterias coliformes son enterobacterias que fermentan la lactosa a 37°C con formación de gas. Son los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella*. *Escherichia coli* se reproduce principalmente en el intestino de los animales de sangre caliente. Su presencia en el agua, por lo tanto indica contaminación fecal, lo que significa que en el agua pueden además estar presentes patógenos de transmisión fecal-oral. Los demás coliformes se reproducen y son habituales de aguas residuales y superficiales.

Respecto a las normas microbiológicas, en el Decreto 475 de 1998 que reglamenta sobre las Normas Técnicas de Calidad del Agua Potable (Ministerio de Salud de Colombia), se recomienda usar para el análisis microbiológico del agua la técnica de filtración por membrana y la del sustrato definido, para el conteo de las bacterias indicadoras de la calidad sanitaria (coliformes totales y *Escherichia coli*) del agua potable (tabla 6.1).

Recuento standard en placa:

Permite el recuento del número de bacterias vivas o de los grupos de bacterias (unidades formadoras de colonias o ufc), que se encuentran presentes en una muestra, utilizando un medio de cultivo y unas condiciones de incubación adecuadas. El método comprende:

- a. Un mezclado de la muestra
- b. La preparación de las diluciones
- c. La preparación de las placas
- d. La incubación a la temperatura y el tiempo adecuado.
- e. El recuento de las colonias que crecen en las placas de Petri.

f. El conteo en cajas que contengan entre 30-300 colonias.

Se pesan asépticamente 25 gr o ml de la muestra según el caso y se diluyen en 225 ml de agua peptonada al 0.1% estéril. Si son materiales sólidos se maceran antes de hacer la dilución, con ayuda de una licuadora. La suspensión así obtenida debe homogenizarse perfectamente por lo menos 25 a 30 veces antes de proseguir. Las muestras líquidas se suspenden directamente en el diluyente. La suspensión obtenida se denomina dilución 10^{-1} para todos los casos. Posteriormente se realizan diluciones decimales seriadas de la muestra para ello se utilizan pipetas estériles.

Para la preparación de las cajas, se coloca la dilución correspondiente en cada una, se agrega el agar cuya temperatura no debe exceder los 45°C. Debe hacerse una homogeneización para que los microorganismos se distribuyan de manera uniforme en la caja. Siempre se anota la fecha, el tipo de muestra analizada, las diluciones sembradas por duplicado así como el tiempo y la temperatura de incubación.

Las células bacterianas se multiplican hasta formar masas visibles denominadas colonias. Cada microorganismo origina colonias características que difieren en tamaño, forma, consistencia y color.

Número Más Probable:

En este procedimiento, a partir de una muestra, se colocan paralelamente varias series decimales de dilución, como mínimo tres, en un medio de cultivo líquido. Luego del período de incubación, se observa y anota el número de tubos, en cada serie, en los que hubo crecimiento (turbidez), y con ayuda de tablas (tabla 5.1) se encuentra el número de gérmenes de máxima probabilidad en 100 ml de la muestra. En muchos casos, por ejemplo para el conteo de los coliformes se utilizan pruebas presuntivas y confirmativas.

Técnica de Filtración por Membrana:

Este método tiene varias ventajas como son su alta reproducibilidad, su utilidad para evaluar grandes volúmenes de la muestra y además se obtienen resultados numéricos más rápidamente que con el número más probable. Es usado para el monitoreo de la calidad del agua potable y de una gran variedad de aguas naturales. Las desventajas se presentan cuando se usa para evaluar aguas con gran turbidez o altos niveles de bacterias no coliformes.

Toma de muestras y manipulación

(Tomado de: Análisis Microbiológico de Aguas. Medios de cultivo. MERCK)

Recipientes: Se utilizan frascos de vidrio de 250-500 ml limpios y estériles.

Descloración: Para fijar el cloro que pueda estar presente en el agua, se añade a los frascos tiosulfato sódico (concentración final de 100 mg/L) antes de la esterilización.

Eliminación de venenos metálicos: Si en el agua hay presentes concentraciones de cobre, cinc o metales pesados, que pueden causar inhibición de los microorganismos,

añadir un formador de quelatos como etilendiamintetracetato en una concentración de 372 mg/L solo o conjuntamente con tiosulfato sódico antes de la esterilización de los frascos. *Toma de muestras:* La muestra debe ser representativa del agua a investigar y debe evitarse estrictamente su contaminación. Los frascos de las muestras no se llenan completamente, para poder agitar el contenido antes de la preparación de los cultivos. Para tomar muestras de una llave o válvula, se abre y cierra varias veces para arrastrar por lavado las partículas de suciedad, se flamea y se deja correr el agua durante 5 a 10 minutos. Si es de un lago o río, sumergir el frasco a unos 0.5 m de profundidad y dirigirlo en contra de la corriente, destapar cuidadosamente y llenar. *Transporte y conservación de las muestras:* La investigación microbiológica debería tener lugar lo más pronto posible después de la toma de la muestra. Si no es posible realizarla en el intervalo de una hora, hay que procurar que se mantenga refrigerada, especialmente en caso de un transporte prolongado de la muestra (transporte refrigerada). Incluso en el caso de refrigeración cuidadosa no deberían pasar más de 24 horas entre la toma de las muestras y el análisis.

PROCESO

Preparación

- Llevar al laboratorio una muestra de agua indicando su procedencia.

3. Ejecución

Recuento standard en placa:

1. Tomar asépticamente 25 ml de la muestra. mezclar con 225 ml de agua peptonada estéril al 0.1% (10^{-1}), agitar vigorosamente 25 veces.
2. Realizar diluciones decimales seriadas (10^{-2} y 10^{-3}). Utilizar tubos con 9 ml de agua peptonada.
3. Marcar tres cajas como mesófilos aerobios y las otras tres como mesófilos anaerobios (recuerde que todo el material cajas, pipetas, etc., deben ser estériles y siempre trabajar con técnicas asépticas). Inocular en cada caja de Petri, 1 ml de cada dilución, partiendo de la más concentrada a la más diluida (esta operación se hace por duplicado, escuche instrucciones del profesor).
4. Adicionar a cada caja inoculada aproximadamente 15 ml del agar licuado a una temperatura de 45°C. A las cajas de aerobios agregue agar para recuento (plate count agar) a las de anaerobios agar para anaerobiosis.
5. Homogeneizar mezclando cuidadosamente en forma de S o de 8. Dejar solidificar.
6. Incubar a 35°C durante 48 horas. Las cajas de anaerobios en la jarra especial, siga instrucciones.

7. Contar las colonias. **Reportar los resultados. Instrucciones en la tabla 6.2**
Elaborar el informe, presentar las cajas con las diluciones correspondientes.

Número Más Probable (NMP) para coliformes totales:

1. Marcar tres series cada una de tres tubos que contienen un caldo de cultivo con la tecnología sustrato definido, ONPG y MUG)
 2. Tomar 10 ml de agua y transferirlos a cada uno de los tubos especiales que comprenden la primera serie. Transferir 1 ml de la muestra a la segunda serie de tubos y por último 0.1 ml a la tercera serie de tubos.
 3. Incubar a 30°C por 24 y 48 horas. Los tubos en los que el medio de cultivo haya cambiado de color se consideran positivos para coliformes. Con ayuda de luz ultravioleta identifique los tubos con fluorescencia que son los positivos para *Escherichia coli*.
 4. Anotar el número de tubos positivos en cada serie, la combinación obtenida se busca en la tabla 6.3.
1. Reportar resultados. Elaborar informe

Método de recuento por Filtración por Membrana:

Con este método se hará el conteo de coliformes totales o fecales en muestras de agua potable.

1. Agitar la muestra, adicionar 100 ml en el embudo de la parte superior del equipo, verificar que el filtro de membrana (0.45 µm) de acetato de celulosa, esté correctamente colocado. Aplicar vacío para que la muestra pase a través de la membrana. Enjuagar con agua peptonada, usar al menos un volumen igual al de la muestra filtrada.
2. Retirar la parte superior del embudo. Con ayuda de unas pinzas estériles tomar la membrana y colocarla en la superficie del agar ENDO (caja de petri pequeña).
3. Incubar a 35± 0.5° C por 24 – 48 horas. Si va a contar coliformes fecales hacerlos a 44,5° C. Contar solo las colonias rojas oscuras desarrolladas en la superficie del filtro.
4. Elegir para el recuento cajas con un rango de colonias entre 20 y 200. Reportar el resultado. Para obtener la densidad final aplicar:

$$\frac{\text{Número de colonias} \times 100}{\text{Volumen total filtrado}} = \text{ufc}/100 \text{ ml}$$

Materiales y Reactivos:

Erlenmeyers 500 ml	
Pipetas de 10 ml.	
Filtro Millipore 8 mm	Recortes de papel kraft
Pipeta 0.1 ml	
Erlenmeyers 250 ml.	Gradilla
Frascos estériles	
Agar para anaerobiosis	Peptona universal
Caldo lactosado bilis verde brillante	Caldo lauril sulfato de sodio
Agar Bilis Rojo de Violeta (VRBA)	Sobre generador anaerobiosis
Agar nutritivo	Agar EMB
Sobre indicador de anaerobiosis	Agar Endo para filtración

Equipos:

Nevera	Horno
Autoclave	Jarra para anaerobiosis
Cámara cuenta colonias	Aparato para filtración por membrana

SEGUIMIENTO

- ❖ Informe escrito.
- ❖ Asistir al laboratorio a las 48 horas para hacer las respectivas lecturas. Coordinar con el monitor la hora de trabajo. No interrumpir la realización de prácticas de grupos diferentes.
- ❖ Cuestionario:
 1. ¿Qué ventajas o desventajas trae el hecho de tomar 1, 10 o 25 ml de la muestra para preparar diluciones? ¿Cuál ser la opción más indicada y por qué?
 2. Siempre que se trabaja con diluciones decimales seriadas se deben realizar las diluciones 10^1 , 10^2 , 10^3 , si o no? ¿Por qué?
 3. De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del NMP y las normas establecidas para la regulación de la calidad microbiológica del agua en Colombia, cuáles son los posibles usos del agua que usted analizó?

TABLA 5.1. MICROORGANISMOS A INVESTIGAR EN EL AGUA

INDICADORES

Mesófilos Aerobios
Coliformes Totales
Coliformes Fecales
Clostridium Sulfito Reductor

PATOGENOS

Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella
Shigella
Vibrio cholerae y *V. parahaemolyticus*
Virus intestinales, algunas especies
de leptospiras, huevos de parásitos
intestinales, etc.

PARAMETROS RECOMENDADOS

AGUAS: Naturales
Negras
Piscicultura
Agricultura
Pecuaria

**INDICADORES
Y
PATOGENOS**

AGUA POTABLE:

Coliformes totales
Escherichia coli

AGUA PARA RECREACION

Mesófilos aerobios
Hongos y levaduras
Coliformes totales y fecales
Staphylococcus aureus
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella

TABLA 5.2: RECUENTO STANDARD EN PLACA**INTEPRETACION Y CALCULO**

1. Seleccionar las cajas de la dilución que contengan entre 30-300 colonias.
 - Contar las colonias de cada caja, tomar la media aritmética y multiplicar por el inverso del factor de dilución. En el recuento final se informan dos dígitos. Si el tercer dígito de la derecha es 5 o mayor, el valor hay que aproximarlo a la unidad superior siguiente y se aumenta en una unidad el factor de dilución. Por otro lado si el tercer dígito es inferior a 5, se informan los dos primeros dígitos y se aumenta en una unidad el factor de dilución. Ej. 384×10^2 ufc/mL o g reportar: 38×10^3 ufc/mL o g. En tanto que en 387×10^2 ufc/mL o g reportar: 39×10^3 ufc/mL o g.
2. Si no hay cajas entre 30-300 colonias (Estos casos se informan como "Recuento Estimado Standard":
 - El número es mayor que 300:
 - **Por cm cuadrado hay menos de 10 colonias.** Contar 13 cuadrados representativos (siete consecutivos horizontales y seis que forman ángulos rectos). Multiplicar la suma de los 13 por 5.
 - **Por cm cuadrado hay más de 10 colonias.** Contar 4 cuadrados representativos, sacar el promedio y multiplicarlo por 65.
 - **Por cm cuadrado hay más de 100 colonias:** Reportar como mayor que 6.500 veces la dilución correspondiente.
 - Si no hay colonias.
 - En cajas que corresponden a la dilución 10^0 (muestra directa) y no hay crecimiento se informa < 1 ufc/ml
 - En cajas que corresponden a la dilución 10^{-1} (no se tienen la dilución anterior) y no hay crecimiento se informa: < 10 ufc/mL o g. En caso de que la menor dilución no sea 10^{-1} informar como menor que, una vez la menor dilución utilizada.

Además tener en cuenta:

- a. Rango entre 30-300 colonias por placa: Esta norma se aplica cuando el recuento contempla un número de bacterias de diferentes tipos sin tener en cuenta las características macroscópicas o reacciones enzimáticas en el medio de cultivo. Ej. Recuento de aerobios mesófilos.
- b. Rango entre 20-200 colonias por placa: Esta norma se emplea cuando el recuento contempla un número de bacterias que presenta alrededor de su crecimiento alguna reacción enzimática. Ej. Recuento de *Staphylococcus aureus*
- c. Rango entre 10-100 colonias por placa: Esta norma se aplica el recuento contempla el número de microorganismos con características macroscópicas importantes. Ej: Recuento de hongos y levaduras.

TABLA 5.3. NUMERO DE GERMENES DE MAXIMA PROBABILIDAD.
 NMP
 CON 3 TUBOS DE 10, 1 Y 0.1 ml

No. de tubos positivos			Límites de confianza (95%) NMP/100ml		
10	1.0	0.1		Bajo	Alto
0	0	0	<3	-	-
0	1	0	3+	<1	17
1	0	0	4	<1	21
1	0	1	7+	2	27
1	1	0	7	2	28
1	2	0	11+	4	35
2	0	0	9	2	38
2	0	1	14+	5	48
2	1	0	15	5	50
2	1	1	20+	7	60
2	2	0	21	8	62
3	0	0	23	9	130
3	0	1	39	10	180
3	1	0	43	10	210
3	1	1	75	20	280
3	2	0	93	30	380
3	2	1	150	50	500
3	2	2	210+	80	640
3	3	0	240	90	1400
3	3	1	460	100	2400
3	3	2	1100	300	4800
3	3	3	>1100	-	-

^aA los resultados normales obtenidos en el 95% de las pruebas no se les coloca el signo (+). A los resultados que se presentan con menor frecuencia, obtenidos en solo el 4% de las pruebas se les adiciona el signo (+). Las combinaciones de tubos positivos que no se muestran, ocurren en menos del 1% de las pruebas, si ocurren frecuentemente indican fallas en la metodología. El NMP para esas combinaciones se pueden obtener por extrapolación hacia la combinación más alta que si se muestra, por ejemplo, un resultado de 2-0-2 podría tener un resultado aproximado de 20, el cual es el NMP de un resultado de 2-1-1.

Tomado de: FDA. 1992. BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. 7th edition.

PRACTICA No. 7

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVOS: TEST ECOMETRICO

INTRODUCCIÓN

Medios de cultivo y reactivos: la importancia que tiene la calidad en la fabricación de los medios de cultivo deshidratados así como su preparación, conservación y uso, es el punto de partida para lograr que estudios microbiológicos y sus resultados sean confiables. Los laboratorios utilizan diversos medios de cultivo sin efectuar la comprobación de su eficiencia, en la mayoría de los estudios sobre calidad en los laboratorios uno de los puntos críticos son los medios de cultivo reconstituidos. Inicialmente los fabricantes de medios de cultivo ofrecen una buena calidad de los mismos en cuanto a su capacidad de recuperación y/o selectividad, estado físico (granulado, en polvo, deshidratado, etc.), pero su uso inadecuado, así como su almacenamiento, preparación y elementos que intervienen durante esta operación pueden conducir a un deterioro de los mismos, y como consecuencia se evaluarán inadecuadamente la contaminación real de las muestras analizadas o alteración de los datos en una investigación microbiológica. La evaluación con cepas control es un punto importante para determinar la calidad del medio.

Control de calidad de medios de cultivo

En la mayoría de los laboratorios no se presta mucha atención al funcionamiento de los medios de cultivo y por ende se pueden emitir resultados que no sean del todo correctos. Para su control es necesario realizar una prueba de productividad donde se determine el rendimiento, la recuperación, el crecimiento de un microorganismo que habitualmente se desarrolla en un medio de cultivo y la selectividad o supresión del crecimiento del microorganismo, que se espera sea inhibido en el medio. Normalmente se determina en los controles positivos la productividad y no la selectividad. En ocasiones, por costos, se observan laboratorios que trabajan con medios de cultivo con fecha de vencimiento ya expirada y/o alteradas. Para el control de calidad de medios de cultivo se debe usar un agar de referencia que puede ser Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), Agar Tripticasa de Soya (TSA o CASOY) o Agar Estándar para conteo en placa (SPC). El espesor de la capa de agar debe ser de unos 4 mm y deben estar bien secas (preincubados a 35°C por 2 horas o 55°C por 10 minutos máximo).

Todos los medios de cultivo selectivos utilizados durante el trabajo ordinario deben ir acompañados de un control positivo -microorganismo(s) que se desea(n) recuperar o microorganismo(s) deseado(s)- y otro negativo -microorganismo(s) que se desea(n) inhibir total o parcialmente- llamado interferente. Los medios no selectivos deben ir acompañados de un control positivo. Todos los medios de cultivo de cada lote adquirido por el laboratorio deben ser probados para demostrar su capacidad de reproductibilidad, selectividad y estabilidad.

Evaluación de medios de cultivo sólidos empleando el método ecométrico (basado en el método descrito por Mossel y col., 1983; 1995).

Mossel y colaboradores describieron en 1983 un método que permite evaluar la sensibilidad de los medios de cultivo selectivos al desarrollo de un microorganismo deseado y la resistencia a la colonización por microorganismos indeseados y la selectividad de los medios no selectivos, que se denominó método ecométrico.

MÉTODO ECOMÉTRICO.

Este método utiliza un procedimiento normalizado de siembra en estrías para obtener una dilución progresiva de una suspensión de prueba de un microorganismo en una placa del medio que se está colocando a prueba. Usando este procedimiento se obtiene un resultado semi-cuantitativo.

En una placa de petri antes de verter el medio a evaluar, es dividida en cuatro cuadrantes sobre la base de la misma y en cada cuadrante se trazan cinco (5) líneas paralelas y una línea en el centro de la misma tal y como se muestra en la Fig.1. Posteriormente se adiciona el medio a evaluar en una capa cuyo grosor deberá ser de unos 4 mm. Posteriormente se procede a evaluar la recuperabilidad, selectividad y reproducibilidad del medio, sembrando en cada línea de cada cuadrante el microorganismo prueba a partir de un cultivo del mismo mantenido en crecimiento toda la noche; la siembra se hace de forma sucesiva y sin cargar de nuevo el asa en las cinco líneas en la sección 1, a continuación, en la sección 2, y así sucesivamente, terminando con una línea única en el centro.

(Fig. 2). El índice de crecimiento absoluto según Mossel (ICA) viene dada por la última línea en la que se presenta el crecimiento.

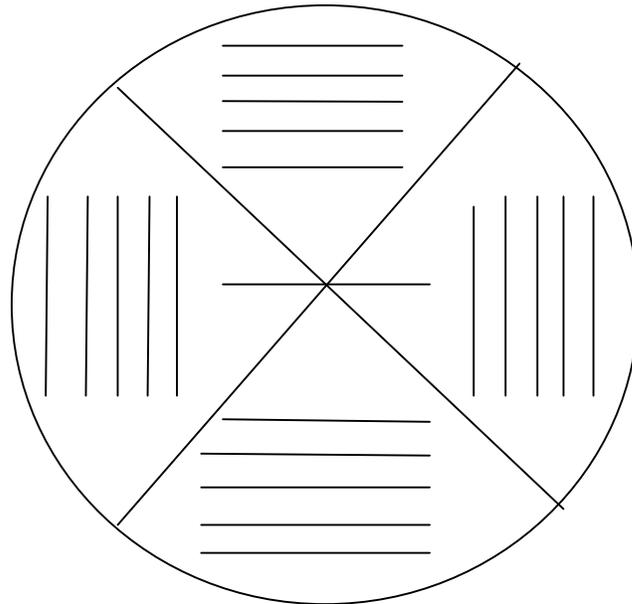
Estos ICAs pueden ser usados para comparar diferentes lotes del mismo medio. También se pueden utilizar para determinar la acción inhibitoria del medio selectivo contra el organismo determinando la proporción del ICA en el medio selectivo y el ICA en un medio no selectiva óptimo de crecimiento (a esto lo denominó Mossel como el índice de crecimiento relativo, o ICR). Es importante en el caso de los medios selectivos demostrar un ICA alto para un organismo deseado frente a un ICA bajo de los organismos no deseados.

PROCEDIMIENTO:

A continuación vamos a explicar la forma como se debe realizar el test Ecométrico:

1. Se dividen las placas en cuatro cuadrantes marcados de forma conveniente sobre la base de la caja de petri, de acuerdo con la siguiente figura (Fig 1.)

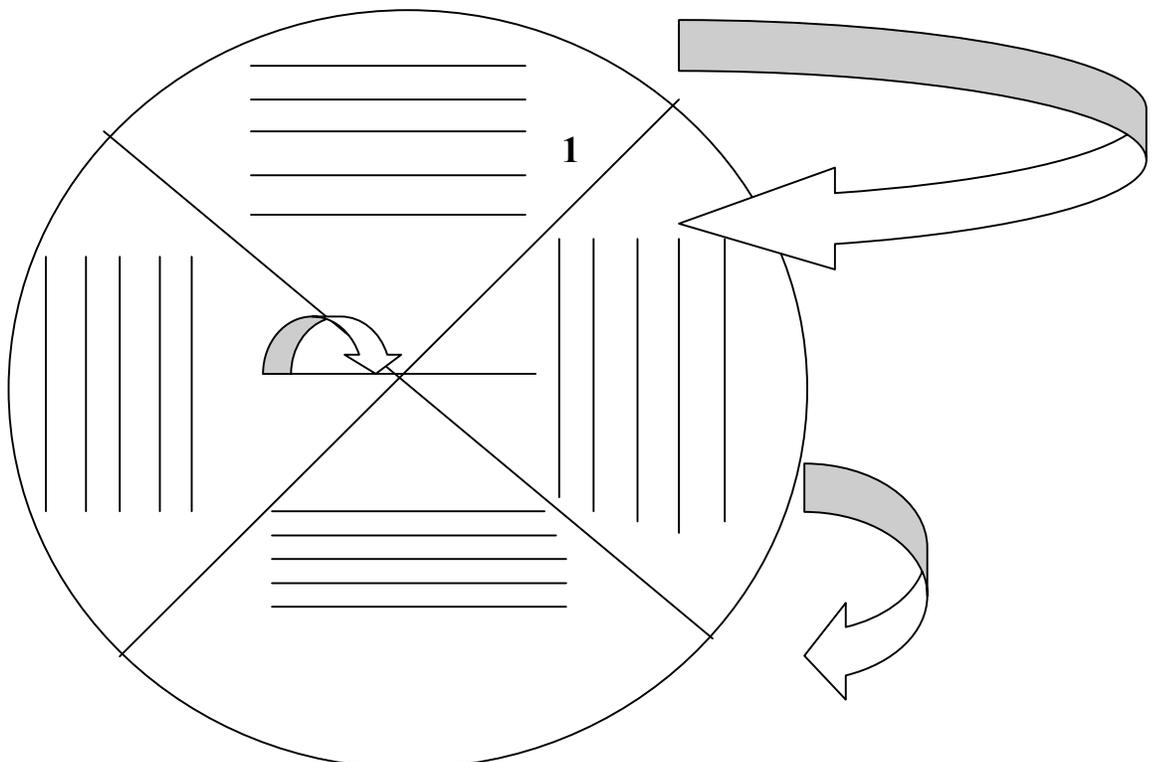
Figura 1. Representación de las divisiones de la placa de petri para la ejecución del test Ecométrico.



2. Depositar el medio de cultivo a evaluar en una capa cuyo grosor deberá ser de unos 4 mm.

3. A partir de cada uno de los cultivos en fase exponencial (mantenidos en crecimiento toda la noche o 18 horas de incubación), tome con una asa calibrada de 1 microlitro y trace sobre la superficie del medio 5 estrías paralelas a las líneas dibujadas en cada cuadrante y una estría central, de forma progresiva y sin recargar, retorcer, repisar o esterilizar el asa

(Fig. 2). Representación de la secuencia de siembra del test Ecométrico.



4. Incubar las placas en posición invertida por el tiempo necesario y a la temperatura apropiada según el método.

5. Transcurrido el tiempo, efectuar la lectura de las cajas, teniendo en cuenta que cada estría tiene un valor de 0.2 y la estría central de 1.0.

6. Multiplicar por el número de estrías en las cuales se observa crecimiento, y determinar el Índice de crecimiento absoluto (**ICA**). Si hay crecimiento en las cinco estrías de los cuatro cuadrantes y la estría central (1), el ICA es igual a 5. El ICA es igual al número del cuadrante cuando todas las estrías de este y de los cuadrantes anteriores muestren un crecimiento completo, mientras no se observe crecimiento en ninguna estría del cuadrante siguiente.

7. Efectuar la misma operación con el medio de referencia. Una vez obtenida las lecturas en cada medio (ICA), sacar el Índice de Crecimiento Relativo (**ICR**), comparando el ICA del medio en evaluación y el medio de referencia.

$$\text{ICR} = \frac{\text{ICA Medio Evaluado}}{\text{ICA Medio Referencia}}$$

OBSERVACIONES:

- El ICR deberá estar cercano a 1.
- Para evaluar la productividad de un medio selectivo, se mide teniendo en cuenta que las cepas esperadas (microorganismos deseados) deben dar un ICA no menor a 2.5 – 3.
- Para evaluar la selectividad de un medio, se mide teniendo en cuenta que el microorganismo interferente (no esperado) debe dar un ICA no mayor de 2.

PREPARACIÓN

- Elaborar un informe de las observaciones realizadas durante la práctica .
- Cada grupo debe programar con el monitor la hora de asistencia al laboratorio para lectura de medios cultivados a las 24 y 48 horas.

CUESTIONARIO:

1. Por qué es importante la prueba ecométrica? Esta se puede utilizar como indicador de control de calidad de los medios?
- 2.Cuál es la diferencia entre productividad y selectividad en medios de cultivos? De ejemplos.

3. Con que frecuencia debemos hacer pruebas ecometricas en el laboratorio?
4. Que son microorganismos interferentes? Qué ventajas tiene hacer pruebas ecometricas?

Material de Vidrio, Equipos y otros:

Asas de platino calibradas.
Cajas de petri.
Incubadora de 35°C
Mechero
Regla
marcador

Material biológico

Cepas bacterianas de 18 horas de incubación y repicadas por tres días consecutivos:

- *Staphylococcus aureus*.
- *Escherichia coli*.
- *Bacillus cereus*
- *Salmonella*
- *Pseudomona aeroginosa*.

Medios de Cultivo

EMB, Cetrimide, XLD, SS, Bacillus cereus, Baird Parker.

BIBLIOGRAFIA

Mossel, D.A.A., Bonants-Van Laarhoven, T., Ligtemberg-Markus, A.M.Th., *et al.* (1983). Quality assurance of selective culture media for bacteria, moulds and yeasts: an attempt at standardization at the international level. *Journal of Applied Bacteriology*, **54**, 313-327.

Mossel, D.A.A., Correy, J.E.L., Struijk, C.B., *et al.* (1995). *Essentials of the Microbiology of Foods*. Chichester, UK: John Wiley.

Harrigan, W.F. (1998). *Laboratory Methods in Foo Microbiology*, 3rd Ed. San Diego, California, USA: Academic Press.

ANEXOS A continuación encontrarán 1 modelo de formato para la evaluación de medios sólidos selectivos y no selectivos.

FORMATO 1

VALORES DE REPRODUCTIVIDAD Y SELECTIVIDAD - MÉTODO ECOMÉTRICO

FECHA: _____

Cepa Interferente: _____

Cepa deseada: _____

Instrucciones:

Frente a la línea de cada cuadrante coloque un (+) si se presenta crecimiento y (-) si no hay crecimiento. Sume el número de positivos para cada cuadrante y multiplique por 0.2. En la fila correspondiente a suma coloque el resultado para cada cuadrante, y en la línea 5 si hay crecimiento coloque un valor de 1.

Finalmente sume los resultados y obtendrá el ICA para cada medio.

Medio de referencia:

Agar _____.

	1	2	3	4	5	SUMA
Cuadrante 1	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 2	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 3	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 4	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Línea 5	_____					

ICA: _____

Medio a valorar productividad:

Agar _____.

	1	2	3	4	5	SUMA
Cuadrante 1	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 2	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 3	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 4	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Línea 5	_____					

ICA: _____

Medio a valorar selectividad:

Agar _____.

	1	2	3	4	5	SUMA
Cuadrante 1	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 2	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 3	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Cuadrante 4	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Línea 5	_____					

ICA: _____

Valor de Índice de Crecimiento Relativo (ICR): _____

PRÁCTICA No. 8

ELABORACIÓN DE YOGURT

INTRODUCCIÓN

El yogurt se puede obtener a partir de la leche de todas las especies de animales y aunque la más común es la vaca, la cabra y la oveja, también se han utilizado leches de camella y búfala. Existen distintos tipos de yogurt, pero los más importantes son los yogures firmes o consistentes y los yogures batidos. Para la fabricación de este se utiliza leche entera o desnatada la cual debe almacenarse a temperatura adecuada y realizarle un tratamiento térmico equivalente a la pasteurización, debe ser libre de antibióticos e inhibidores y su acidez no debe ser superior a 0.16% de ácido láctico, así mismo debe tener un 15% de sólidos para mejorar la consistencia del yogurt evitando la sinéresis.

El yogurt es un producto lácteo que se obtiene de la fermentación de la lactosa de la leche por la adición de un cultivo mixto de bacterias ácido-lácticas (LAB) (*S.salivarius* var. *thermophyllus* y *Lb. bulgaricus*), en estos cultivos iniciadores la lactosa entra a la célula por medio de un sistema permeasa y a continuación es hidrolizada a glucosa y galactosa por una β - galactosidasa, posteriormente la glucosa es metabolizada vía glicolítica.

Mediante esta práctica se pretende que el estudiante asimile los conceptos sobre fermentación, metabolismo y desarrollo, al elaborar un yogurt y entender el fenómeno ocurrido.

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos (por grupo de trabajo)

- NaOH 0.1 N (10 mL)
- Fenoftaleína 1% (9 gotas)
- Colorantes de Gram
- Aceite de inmersión

Materiales (por grupo de trabajo)

- Malla de asbesto (1)
- Trípode (1)
- Soporte universal (1)
- Nueces (1)
- Cuchillo
- Cuchara
- Olla
- Vaso de precipitado de 50 mL (1)
- Bureta
- Láminas

- Cultivo iniciador (20 ml)
- Azúcar (1 lb)
- Fruta (mora o fresa, limón)
- Bolsa de leche pasteurizada
- Recipiente de vidrio para la conserva
- Recipiente plástico para el yogurt
- Cultivo iniciador
- Pipeta de 10 mL (1)
- Pipeta pasteur (1)

Equipos

- Microscopio
- Incubadora a 45°C
-

PROCEDIMIENTO

Elaboración de la conserva

- Haga una selección de las frutas, retire aquellas que están dañadas y lávelas con abundante agua.
- En el caso de la fresa córtela en rodajas, pésele y anote el peso y colóquelas en la olla, adicione limón (para evitar el pardeamiento enzimático) y adicione azúcar (unos 40 gramos), deje unos 5 minutos, esto permitirá que la fruta libere agua.
- Coloque en la olla y adicione azúcar (en una proporción 3:1) (fruta:azúcar), mezcle las materias primas y lleve al fuego. Mezcle constantemente para evitar que se pegue el producto. Lleve a ebullición y determine el punto final mediante el ensayo de la lámina o la prueba de la cuchara.
- Apague la conserva e inmediatamente vierta en el frasco de conserva, tape y enfríe rápidamente

Elaboración del Yogurt

- Tome la leche y realice la prueba de acidez, verificado el grado de acidez, adicione la leche en una olla e incorpore azúcar en un porcentaje del 3%, mezcle y lleve a calentar a 45°C
- Adicione un inóculo del 2% del cultivo iniciador y mezcle completamente
- Incube a 45°C durante 4 horas.
- Observe la consistencia a la hora 1, 2 y 4, determine la acidez a la hora 4 y haga coloración de Gram

- Aparte realice una determinación del grado de acidez del cultivo iniciador anote los resultados.
- Una vez terminada la fermentación adicione la conserva y mezcle suavemente para evitar la sinéresis.
- Enfríe antes de tomar

RESULTADOS

Producto	% Acidez
Leche inicial	
Inóculo inicial	
Hora 4	

Coloración de Gram del producto terminado:

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

CUESTIONARIO

1. Nombre algunas de las cepas probióticas más utilizadas en la elaboración de yogurt?
2. Diversas investigaciones se han realizado respecto al yogurt con probióticos y la prevención de enfermedades como el cáncer de colon, soportado con artículos recientes cuente que otras enfermedades pueden ser prevenidas consumiendo estos productos regularmente.
3. En que legislación colombiana se basaría para crear un producto nuevo que usted va a sacar al mercado como el yogurt "Doña leche"?
4. Qué significa sinéresis, y porque se debe evitar en la producción de yogurt?

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

PRÁCTICA 9

INTERACCIONES MICROBIANAS I: Verificación del efecto de la simbiosis de *Rhizobium* sp. y una leguminosa.

Desde los orígenes de la microbiología, fue evidente la importancia de las interacciones microbianas con animales y plantas, principalmente en lo relacionado con las relaciones hospedero patógeno, durante los procesos infecciosos. La infinidad de enfermedades infecciosas, causadas por virus, bacterias y protozoos, así como una gran cantidad de relaciones benéficas para los organismos eucariotas, indican que los microorganismos son agentes activos dentro de los ecosistemas y que influyen y son influenciados por otras poblaciones de organismos vivos.

Dentro de las posibilidades de interacción, la simbiosis existente entre algunas plantas y microorganismos fijadores de nitrógeno es ampliamente reconocida y de gran importancia desde el punto de vista agrícola.

Se sabe que la productividad de los ecosistemas, entendida como la cantidad de biomasa que un sistema puede producir por unidad de tiempo y área, está controlada en gran medida por nutrientes limitantes. El nitrógeno asimilable escaso en el suelo y en el agua, se encuentra almacenado en forma molecular y gaseosa en la atmósfera, por lo que suele ser un elemento limitante de la productividad. Algunos microorganismos, poseen la capacidad de convertir el nitrógeno atmosférico en nitrógeno asimilable a través de un proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno; muchos son de vida libre, no obstante, algunos han establecido relaciones muy estrechas con plantas como en el caso de la bacteria *Rhizobium* y algunos hongos que forman micorrizas.

El género *Rhizobium*, es uno de los más importantes simbiosis fijadores de nitrógeno en los miembros de la familia Leguminosae. Estas bacterias, establecen una relación con las células de los pelos radiculares dando origen a la formación de nódulos, consecuencia del desarrollo del microorganismo al interior de una pared sintetizada por la planta. La simbiosis entre estos organismos, asegura la disponibilidad de sustratos orgánicos, necesarios para el desarrollo de la bacteria, y provee a la planta de nitrógeno asimilable necesario para su crecimiento.

En esta práctica se pretende aislar bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* a partir de nódulos radiculares de trébol y comprobar el efecto de su inoculación sobre el crecimiento de plántulas.

PROCEDIMIENTO

Aislamiento de *Rhizobium*

- Lleve al Laboratorio una buena cantidad de tréboles silvestres que presenten desarrollo claro de nodulación radicular. En general, los nódulos radiculares activos tienden a presentar una coloración rojiza, por lo que es deseable encontrar estas características en los nódulos utilizados para este propósito.
- Lave muy bien las plantas recogidas, procurando eliminar el exceso de tierra. Retire la mayor parte de tallos y hojas que serán innecesarios. A partir de este punto utilice pinzas para evitar la contaminación de los nódulos.
- Enjuague los fragmentos de raíz que contengan los nódulos con agua desionizada estéril. Sumerja los nódulos en alcohol al 80 % durante 4 minutos. Filtre a través de una gasa los nódulos para recuperarlos. Enjuague con agua destilada estéril durante 5 minutos. Sumerja los fragmentos en solución de hipoclorito durante 5 minutos. Para retirar el exceso de desinfectante, enjuague dos veces durante 5 minutos con agua destilada estéril.
- Con 5 ml de agua estéril, macere exhaustivamente los nódulos radicales con el fin de extraer las bacterias que se encuentran en el interior. Recuerde que las bacterias se encuentran en el interior del nódulo y una buena maceración asegura su aislamiento. Prepare diluciones seriadas a partir del macerado (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7}) en tubos con solución salina estéril. Realice una siembra en superficie, utilizando 0,1 ml de cada dilución en agar YMA con rojo congo. Asegúrese que las cajas de agar no contengan agua de condensación.
- Tome adicionalmente tres nódulos previamente desinfectados y pártalos por la mitad utilizando pinzas y bisturí estériles. Con un asa recta previamente incinerada, tome del interior del nódulo y haga una siembra por agotamiento en una caja de agar YMA.
- Incube a 26 °C durante 5 a 10 días. Las colonias que crecen en menos de cinco días deben marcarse y no tenerse en cuenta ya que probablemente no corresponden a rizobios, que generalmente tienen crecimiento lento.

Reaislamiento

- Seleccione las colonias blancas o translúcidas con un diámetro entre 1 y 1,5 mm (crecimiento lento) o de 2 y 7 mm (crecimiento rápido), que posean exopolisacárido (en forma de una sustancia pegajosa y elástica). Verifique que se trata de bacilos cortos Gram negativos. Generalmente, los rizobios no toman el rojo congo, por lo que debe buscar colonias no coloreadas o con una baja coloración. No obstante, algunos rizobios de crecimiento rápido pueden tomar el colorante; además es usual que la cantidad de exopolisacárido sea mayor en los de crecimiento rápido mientras que puede ser escasa en los de crecimiento lento.

- Siembre por agotamiento en cajas con agar YMA y rojo congo 4 colonias que se aproximen a la descripción morfológica planteada arriba.
- Incube a 26 °C durante 1 semana.

Inoculación en plantas de trébol

El objetivo de este ensayo es comprobar el efecto de la inoculación de las bacterias elegidas como supuestos miembros del género *Rhizobium*, sobre el desarrollo de plántulas de trébol. Para esta parte del trabajo debe decidir que test estadístico va a utilizar. Considere cada una de las plántulas dentro de un mismo frasco como pseudoréplicas; puede utilizar el promedio de las variables medidas para introducirlo dentro del modelo estadístico aleatorio.

- Llene 18 frascos plásticos pequeños con 60-70 g de tierra negra previamente tamizada y esterilizada. Abra pequeños huecos en la base de los frascos con un alfiler.
- Tratamiento de las semillas. En tubos de centrifuga plásticos, sumerja 50 semillas de trébol en 12 ml de una solución de sacarosa al 25 % a la cual se han agregado 10 g de CaCO₃. Repita este proceso 4 veces para obtener un total de 200 semillas. Centrifugue a 1000 rpm durante 5 minutos o hasta que se forme un pellet. Elimine cuidadosamente el sobrenadante y recupere las semillas sobre papel secante, sea cuidadoso en mantener grupitos de 50 semillas. Déjelas secar al aire.
- Combinación con los simbioses: A partir de cada uno de los aislados (4 en total), prepare una suspensión de bacterias; tome dos a tres colonias y resuspéndalas en 10 ml de solución salina estéril, utilice 4 cajas de Petri pequeñas. Sumerja 50 semillas de trébol en cada uno de las suspensiones bacterianas preparadas, durante 5 minutos.
- Siembra: Distribuya los 10 ml de cada suspensión en tres frascos plásticos con tierra estéril (aproximadamente 3 ml de suspensión por frasco); cada uno de estos frascos corresponde a una réplica. Se debe agregar a cada uno de los tres frascos 15 semillas procurando que queden separadas. Agregue un poco de tierra sobre las semillas para cubrirlas.
- Prepare los siguientes controles:
 - Control negativo: siembre en cada uno de tres frascos con tierra estéril 15 semillas sin tratamiento.
 - Control de limitación por nitrógeno: agregue en cada uno de tres frascos con tierra 25 ml de una solución de NH₄NO₃ 0,1 M estéril, luego siembre cada uno con 15 semillas sin tratamiento.
- Espere 6 a 7 semanas para que las semillas germinen y obtenga plántulas desarrolladas. **Es responsabilidad de cada grupo de estudiantes mantener los experimentos en buenas condiciones.** Para lo anterior, se deben regar las

plántulas al menos cada dos días, con agua destilada, procurando agregar la misma cantidad de agua a todos los montajes.

- A partir del crecimiento en cada uno de los tratamientos obtenga los siguientes datos.
 - Peso fresco de cada plántula: Seque muy bien las plántulas sobre papel absorbente y pese.
 - Longitud: mida la longitud de cada plántula
 - Nódulos: Cuente el número de nódulos radiculares formados por plántulas.

SEGUIMIENTO

- Cada grupo de trabajo debe acordar con el monitor las horas en las que trabajará en el laboratorio.
- Entregar el informe con las observaciones realizadas en la práctica de laboratorio.

CUESTIONARIO

- Cómo es el proceso de formación de los nódulos radiculares de *Rhizobium*?
- Qué factores afectan el proceso de nodulación?
- Qué importancia tiene la fijación de nitrógeno que hace *Rhizobium* para la agricultura?
- Explique por qué es importante el uso de los controles realizados. Qué información le dan?

Materiales y Reactivos

Agua desionizada estéril	1 Litro
Alcohol 80-96%	100 ml
Solución de hipoclorito 1%	100 ml
Solución de NH_4NO_3 0,1 N (0,08 g NH_4NO_3 /100 ml)	100 ml
Solución Sacarosa 25% (1,25 g sacarosa /50 ml + 0,5 g CaCO_3)	50 ml
Solución salina estéril X 10 ml	12 tubos
Agar YMA	15 cajas
Macerador estéril	1
Pinzas estériles	1
Bisturí estéril	1
Tubos de centrifuga plásticos	10
Vasos plásticos	18
Cajas de Petri estériles (pequeñas)	10
Tierra negra estéril	Aprox 200 g

Semillas de trébol	Aprox 300
Pipetas de 1 o 2 ml	10
Pipetas de 5 ml	5
Reactivos para coloración Gram	

Equipos

Balanza
Microscopio
Incubadora

BIBLIOGRAFÍA

- **Weaver, R.; Frederick, L.** 1982. *Rhizobium*. En: Methods of soil análisis, Part 2. Chemical and microbiological properties – Agronomy Monograph no. 9. 2nd edition. Madison. USA.
- **Vincent, J.** 1992. The Genus Rhizobium. En: The Prokaryotes “2nd Edition. Springer-Verlag. New York.
- **Kaiser, D.** "Cell-Cell Interaction," The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edition, release 3.3, November 8, 2000, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- **Sadowsky, M.; Graham, P.** "Roots and steam nodule bacteria of legumes," The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edition, release 3.3, November 8, 2000, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.

PRACTICA No.10

IDENTIFICACION DE HONGOS (Medio Ambiente, Sistemas de aires acondicionado y frutas en descomposición)

Introducción

El crecimiento de hongos en sistemas de aire acondicionado y edificios puede producir en sus habitantes determinadas patologías entre las que cabe destacar asma y alveolitis alérgicas. La contaminación ambiental por hongos en el interior de edificios, es debida básicamente a hongos filamentosos y levaduras.

De igual forma es cierto que los alimentos pueden ser vehículo de transmisión de diversos microorganismos y metabólicos microbianos, algunos de los cuales son patógenos para el hombre, según su procedencia se agrupan en:

Origen endógeno: presentes en el alimento antes de su elaboración; alimentos de origen animal productores de zoonosis, transmitida por vía digestiva al hombre por medio de alimentos.

Origen exógeno: llegan a los alimentos durante su obtención, transporte, industrialización, conservación, etc. Los que son patógenos para el hombre producen intoxicación alimentaria (consumir alimentos contaminados con periodo de incubación de 2-10 horas y que presenten un síndrome gastroenterico).

La **flora exógeno** de los alimentos esta constituida principalmente por microorganismos saprofitos, que son la causa principal de alteración de los diversos alimentos.

De todos los más conocidos son los mohos que crecen en la superficie de los alimentos con su típico aspecto aterciopelado o algodonoso, a veces pigmentado, y que generalmente todo alimento enmohecido o florecido se considera no apto para el consumo. Si bien es cierto que los mohos intervienen en la alteración de muchos tipos de alimentos, determinadas especies de los mismos son útiles en la elaboración de muchos tipos de alimentos. Así, algunos tipos de quesos son madurados por mohos, como por ejemplo el queso azul, el de Roquefort, el de camembert, el de Brie, el de Gammelost, etc., utilizándose también en la elaboración de alimentos orientales, como son la salsa de soja, etc.

El término moho se suele aplicar para designar a ciertos hongos filamentosos multicelulares cuyo crecimiento en la superficie de los alimentos se suele reconocer fácilmente por su aspecto aterciopelado o algodonoso. La parte principal de su crecimiento suele tener aspecto blanco, aunque puede tener colores distintos, color oscuro o color de humo. Son típicas de los hongos adultos de algunas especies las

esporas de colores variados, las cuales pueden comunicar su color a parte o a todo el crecimiento, carece de raíces verdaderas, de tallos y de hojas.

Muchos hongos son beneficiosos, algunos son comestibles, como es el caso de las setas y de la proteína unicelular de las levaduras.. De las plantas se pueden aislar muchos hongos, entre los cuales se encuentran especies de los géneros *Alternaria*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* y *Chaetomium*. Los dos géneros de hongos que predominan en los alimentos almacenados probablemente sean *Penicillium* y *Aspergillus*, dentro de los cuales se producen especies que producen micotoxinas.

El síndrome resultante de la ingestión de toxinas contenidas en un alimento contaminado con mohos se denomina micotoxicosis. El primer caso documentado de micotoxicosis atribuido a un alimento que contenía hongos fue el del cornezuelo del centeno. La especie fúngica *Claviceps purpurea* parasita el centeno y otros granos de cereales y elabora varios derivados del ácido lisérgico que son los causantes del síndrome.

Muchas especies de hongos se pueden diferenciar, identificar y clasificar según su morfología, estructura, mecanismo de formación y elementos formadores de las esporas. El conocimiento de estas características puede ser suficiente para identificar especies que pertenecen al grupo de los hongos filamentosos; sin embargo, cuando se trata de identificar especies pertenecientes al grupo de las levaduras es imprescindible la aplicación de pruebas bioquímicas.

Conceptos generales

Los hongos pueden ser unicelulares o pluricelulares. Las levaduras son hongos unicelulares con forma oval (5-30 μ m), inmóviles y que se dividen por mecanismos diversos, especialmente por gemación. Deben considerarse como hongos que han perdido su forma filamentosa y se han convertido en organismos unicelulares. Se caracterizan por estar constituidos por filamentos ramificados o hifas que se desarrollan y entrelazan formando el micelio. Existe un micelio vegetativo adosado a la superficie del sustrato (suelo, plantas, alimentos) y un micelio aéreo o reproductor, donde se forman las esporas (asexuales y sexuales).

Los hongos filamentosos y levaduras son en su mayoría saprófitos, hallándose libres en la naturaleza, especialmente en la materia orgánica en descomposición. Algunas especies son parásitas, formando parte de la flora normal del hombre, como por ejemplo *Candida albicans*, que es una levadura y puede comportarse como oportunista y resultar patógena cuando se produce una disminución en los mecanismos de resistencia del individuo. Otras especies de hongos pueden producir durante su desarrollo sustancias tóxicas o micotoxinas como, por ejemplo, las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*, que es un hongo filamentoso. Por otra parte, algunos hongos son difásicos, es decir, unas veces se comportan como hongos filamentosos y otras pueden comportarse como levaduras.

Las condiciones necesarias para que un hongo crezca en una superficie son: existencia de esporas, base nutriente, humedad y temperatura entre 4 y 38 °C.

En la práctica, los hongos filamentosos y las levaduras también se diferencian en el laboratorio en dos grupos según el aspecto macroscópico de sus colonias: las levaduras forman colonias húmedas, cremosas, opacas o pastosas, y los hongos filamentosos producen colonias algodonosas, lanosas o pulverulentas.

Especies más comunes en aire interior

Las especies más comunes que se encuentran en aire interior son las reflejadas en la tabla 1, a partir de los resultados obtenidos en dos estudios diferentes (Health y Welfare, 1987 y Flanigan et al. 1993) publicados en Biocontaminants in Indoor Environment. Los hongos más comunes existentes en el polvo de origen doméstico pueden fácilmente pasar al aire; y si se dan las condiciones adecuadas para su desarrollo en cuanto a temperatura y humedad relativa, también pueden acantonarse en cualquier tipo de material (como alfombras, moquetas, empapelado de una pared, etc.) y crecer desmesuradamente, proyectando al ambiente un número elevado de esporas con el consiguiente riesgo para la salud.

Tabla 1. Hongos comunes en polvo doméstico

Cladosporium sp. (C. cladosporoides, C. herbarum, y/o C. sphaerospermum)
Penicillium sp.
Sistotema brinkmannii
Levaduras rosas y blancas
Botrytis cinérea
Aspergillus sp. (A. fumigatus, A. niger, A. ochroaceus, A. oryzae, A. versicolor, y/o A. glaucus)
Paecilomyces variotii
Stachybotrys atra
Phoma sp
Aureobasidium pullulans
Alternaria alternata
Epicoccum purpurascens
Geotrichum candidum
Ulocladium sp. (U. chartarum y/o U. consortiale)
Trichoderma viride
Trichoderma harzianum
Mucor sp

Efectos sobre la salud

Los hongos a través de sus esporas, micotoxinas y por la emisión de VOC (compuestos volátiles orgánicos), pueden causar diferentes tipos de enfermedades o alteraciones de la salud: Enfermedad infecciosa o patogénica: aspergilosis (por exposición a *Aspergillus fumigatus*), histoplasmosis (por *Histoplasma*), criptococosis (por *Cryptococcus*) y coccidiomicosis (por *Coccidioides*)

- Reacciones alérgicas, como rinitis y asma
- Neumonitis por hipersensibilidad
- Cáncer debido a micotoxinas carcinogénicas
- Desórdenes inmunológicos por micotoxinas inmunosupresivas
- Reacciones tóxicas por micotoxinas
- Reacciones de inflamación debidas al β -1,3-glucano, compuesto de la pared celular de los hongos
- Síndrome Edificio Enfermo

Principales métodos de identificación de hongos filamentosos

La identificación de los hongos filamentosos se basa en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas. Semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la superficie, la textura y la producción de pigmentos son muy útiles para la identificación. En general, la morfología microscópica de los hongos es estable y presenta pocas variaciones. La identificación definitiva se basa en la forma característica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas.

PROCEDIMIENTO:

A continuación vamos a explicar la forma como se debe realizar la identificación de Hongos:

La preparación del material para la observación microscópica puede realizarse en fresco, con cinta de celofán adhesiva o mediante cultivo sobre portaobjetos.

Preparación en fresco

1. Se realiza empleando el procedimiento descrito a continuación:
2. Seleccionar una colonia aislada.
3. Calentar a la llama el alambre de un asa de siembra, y doblar de forma que se convierta en un objeto cortante.
4. Con la ayuda del asa, extraer un fragmento triangular de la colonia que contenga además un poco de agar en la parte inferior.

5. Depositar el fragmento extraído sobre un portaobjetos en el cual, previamente, se ha depositado una gota de azul de lactofenol.
6. Cubrir con un portaobjetos y presionar suavemente para dispersar la colonia y el agar; de esta forma, la muestra está disponible para su observación al microscopio.

Este procedimiento es el que utilizan la mayoría de los laboratorios, ya que las muestras se preparan con facilidad y rapidez y además permite identificar muchas de las especies de hongos más habituales. El mayor inconveniente de la observación en fresco es que se puede alterar el ordenamiento característico de las esporas al presionar con el cubreobjetos, por lo que este procedimiento no es válido en los casos en que es necesario conocer la disposición de las esporas.

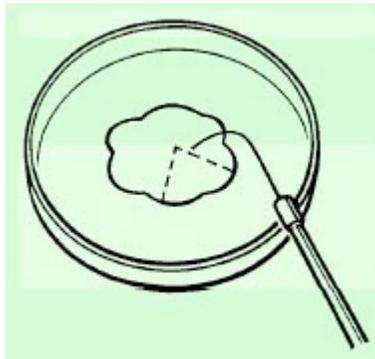


Fig. 1: Preparación en fresco

Preparación con cinta de celofán adhesiva

El procedimiento se lleva a cabo como sigue :

1. Apoyar el lado engomado de un trozo de cinta adhesiva transparente sobre la superficie de una colonia.
2. Colocar la cinta bien extendida sobre una gota de azul de lactofenol o azul de anilina colocada, a su vez, sobre un portaobjetos.
3. Observar al microscopio para conocer la forma y ordenamiento característico de las esporas.

Este método puede considerarse como el más simple, económico y adecuado para la identificación de hongos, recomendable para los laboratorios microbiológicos de cualquier nivel.

La preparación de la cinta transparente permite observar al microscopio como se desarrolla el microorganismo en el cultivo. Generalmente las esporas se mantienen intactas y la identificación se realiza con facilidad.

Una de las desventajas de este método es que si la cinta transparente no se presiona con suficiente firmeza sobre la superficie de la colonia, la muestra no es adecuada, ya que al no quedar bien adherida la cinta, las esporas o las hifas no se pueden identificar.

En los casos en que mediante este método no se observen esporas deberá realizarse la preparación en fresco.

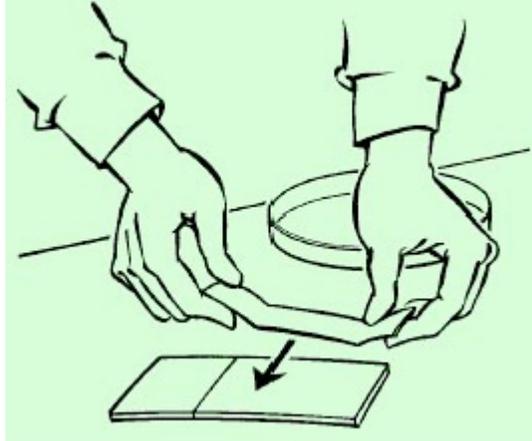


Fig. 2: Preparación con cinta de celofán adhesiva

CUESTIONARIO:

1. Cuales son las propiedades nutritivas de los hongos comestibles?
2. Es el cultivo de las setas un buen negocio?
3. Porque creen ustedes que los hongos son importantes industrialmente. De ejemplos.
4. De los hongos que identificaste en el laboratorio hable de cada uno de ellos y la importancia que tienen estos.

MATERIAL DE VIDRIO, EQUIPOS Y OTROS:

Asas rectas de micología.
Laminas portaobjetos
Laminillas cubreobjetos
Cajas con agar YGC con crecimiento de hongos
Mechero
Marcador
Tapabocas
Cinta pegante transparente.
Fruta en descomposición.
Guantes.

BIBLIOGRAFIA

Microbiología de los alimentos Autores: W.C. Fracier/ D.C. Westhoff, editorial Acribia S.A (Zaragoza España), 1993 Cuarta Edición.

Microbiología de los alimentos (Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inmunidad y calidad de los alimentos). Autores: D.A.A. Mossel/ B. Moreno Garcia, Editorial Acribia, S.A (Zaragoza España), 1985.