



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE CITOLOGÍA Y
FISIOLOGÍA BACTERIANA
III SEMESTRE

Lucy Villafañe Ferrer Q.F MSc
Diógenes Reyes Ramos Q.F MSc

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector
Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General
Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica
Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero
Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad
Rosario López Guerrero

Directora de Investigación
Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología
Rosana de la Torre Barboza

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena
Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar
Elayne Flórez Julio
Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo
Zarina Durango Herazo
Raúl Padrón Villafañe

Autor
Lucy Villafañe Ferrer
Diógenes Reyes Ramos



TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN.....	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	8
PRÁCTICA Nº 1 PARTES Y USOS DEL MICROSCOPIO	9
PRÁCTICA Nº 2 TÉCNICAS DE TINCION SIMPLE Y DIRECTA CON COLORANTES BÁSICOS	133
PRÁCTICA Nº 3 TÉCNICAS DE TINCIÓN DIFERENCIAL (TINCIÓN DE GRAM)	16
PRÁCTICA Nº 4 TINCIÓN DE ACIDO ALCOHOL RESISTENTE (ZIEHL-NEELSEN).....	20
PRÁCTICA Nº 5 MÉTODOS DE SIEMBRAS	23
PRÁCTICA Nº 6 MORFOLOGÍA BACTERIANA	30
PRÁCTICA Nº 7 MORFOLOGÍA DE COLONIAS	33
PRÁCTICA Nº 8 UBICUIDAD DE LOS MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE	37
PRÁCTICA Nº 9 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	41
PRÁCTICA Nº 10 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS (MEDIO OF)	44
PRÁCTICA Nº 11 DEGRADACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO DE KLIGLER Y TSI.....	48
PRÁCTICA Nº 12 DESAMINACIÓN Y DESCARBOXILACIÓN DE CARBOHIDRATOS (MEDIO LIA).....	51
PRÁCTICA Nº 13 PRUEBA DEL CITRATO DE SIMMONS.....	54
PRÁCTICA Nº 14 PRUEBA DE LA UREA	58
PRÁCTICA Nº 15 PRUEBA SIM (SULFURO-INDOL-MOTILIDAD)	61
PRÁCTICA Nº 16 PRUEBA DE LA CATALASA Y OXIDASA	64
PRÁCTICA Nº 17 ROJO DE METILO Y VOGES PROSKAUER.....	68
PRÁCTICA Nº 18 ANTIBIOGRAMA.	71
PRÁCTICA Nº 19 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MATERIAL.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	79



PRESENTACIÓN

Un saludo de bienvenida para los estudiantes de la asignatura Citología y Fisiología Bacteriana.

La presente guía tiene por objetivo mostrar los recursos y técnicas para el aprendizaje de los procedimientos para observación morfológica microscópica, cultivo e identificación bioquímica de las bacterias. Se hace énfasis en los procedimientos relacionados con identificación microscópica de morfología bacteriana, cultivo e identificación bioquímica.

La metodología utilizada para cada una de las prácticas es clara y sencilla lo que facilita la comprensión del estudiante.

Es el deseo del autor que los estudiantes consideren a esta guía como un aporte a su formación como bacteriólogos y que encuentren en ésta respuestas a sus inquietudes iniciales en el estudio de la Citología y Fisiología Bacteriana.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
- Siempre respetar las señalizaciones de bioseguridad.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos cortopunzantes, como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis, debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso.
- Conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
- Nunca debe utilizar reactivos y/o sustancias químicas vencidas.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente. Si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego



limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga, apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio, o después de salpicaduras con sangre u otros líquidos corporales, las superficies de los mesones deberán ser descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.
- Toda muestra biológica diferente a orina deberá ser descontaminada con peróxido de hidrógeno al 30% para luego ser eliminada en bolsas rojas.
- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.
- Si derrama material contaminado en la mesa o el piso, cubra con hipoclorito de sodio al 2% el área contaminada y coloque papel absorbente por un tiempo mínimo de 15 minutos.
- Trabaje lo más cerca posible del mechero, flamee la boca de los frascos y tubos antes y después de tomar o sembrar las muestras.
- No caliente las pipetas en el mechero.
- Esterilice, antes y después de su uso, el asa y enfrie al aire por 10-15 segundos para no crear aerosoles microbianos al introducirlas calientes en los cultivos.
- No deje destapados los recipientes que contengan material microbiológico. El viento puede diseminarlos en el ambiente.
- Nunca deje un mechero encendido.



PLAN DE TRABAJO

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se van a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, junto con los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de esta.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también por sus propias observaciones, investigaciones y deducciones.
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas, tubos, cajas y/o cultivos.
6. Tome todas las precauciones necesarias (evite contacto con ojos, boca y el resto del cuerpo) al momento de trabajar con microorganismos. Recuerde que los microorganismos con los que va a trabajar son patógenos.
7. Practique varias veces el procedimiento y, en caso de dudas, pregunte a su docente.
8. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
9. Al terminar, limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los medios usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
10. Limpie el microscopio antes y al final de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. **¡Cuídelo!**
11. **Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.**

Nota: Recuerde que en la guía aparecen los talleres correspondiente a cada práctica realizada, el cual desarrollarán y tendrán ocho (8) días para su entrega.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Láminas (portaobjetos).
2. Laminillas (cubreobjetos).
3. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
4. Cinta de enmascarar.
5. Colores.
6. Palillos.
7. Elementos de protección personal (EPP)
 - a. Bata.
 - b. Guantes desechables.
 - c. Gorros.
 - d. Mascarilla o tapabocas.
 - e. Gafas de protección.
8. Toalla pequeña.
9. Papel de arroz.
10. Asas bacteriológicas (punta recta y punta redonda).
11. Muestra solicitada.
12. Guías de laboratorio previamente estudiadas.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



PRÁCTICA Nº 1 PARTES Y USOS DEL MICROSCOPIO

I. INTRODUCCIÓN.

Microscopio es una palabra derivada del griego cuyo significado literal es “visión de lo pequeño”; como bien lo indica su nombre, nos permite visualizar elementos que a simple vista no son visibles, o difícil de ver en detalle. El microscopio permite observar objetos no visibles a nuestro poder de visión y es el instrumento de mayor uso en los laboratorios para el estudio de los microorganismos. Mediante un sistema de lentes e iluminación se puede aumentar la imagen entre 40 y 1000 veces. Los precursores de la microscopia son:

- ✓ Van Leeuwenhoek, quien observo microorganismos en agua estancada y les llamo animálculos.
- ✓ Robert Hooke, quien en 1665 observo células de corcho.
- ✓ Hans Zacarías Hansen, quien contribuyó en la elaboración del microscopio compuesto.
- ✓ Jhon Marshal, quien perfecciono la parte mecánica del microscopio.
- ✓ E. Bruche-H, Johansen, quienes construyeron el microscopio electrónico.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Conocer los fundamentos y composición del microscopio y los elementos de trabajo utilizados en el laboratorio de Citología y Fisiología Bacteriana.

ESPECÍFICOS

Familiarizar al estudiante con el equipo y con los procedimientos empleados en microscopia.



Formar al estudiante con los conceptos básicos de la microscopía óptica o convencional.

- Adquirir destrezas para el correcto manejo del microscopio y los elementos de trabajo utilizados en el laboratorio de Citología y Fisiología Bacteriana.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

PARTES DE UN MICROSCOPIO ÓPTICO

Los microscopios tienen tres sistemas que facilitan su funcionamiento, que son:

1. SISTEMA MECÁNICO:

- **SOPORTE:** mantiene la parte óptica. Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.
- **PLATINA:** lugar donde se deposita la preparación.
- **CABEZAL:** contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular.
- **REVÓLVER:** contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite al girar, cambiar los objetivos.
- **PINZAS DE SUJECIÓN:** es una de las Partes del Microscopio mecánico que sirve para sujetar la preparación. En su mayoría, los microscopios modernos poseen las pinzas anexas a un carro con dos tornillos que permiten un avance longitudinal y transversal de la preparación.
- **TORNILLOS DE ENFOQUE:** **macrométrico** que aproxima el enfoque. **Micrométrico** que enfoca detalladamente y con precisión cada una de sus partes.

2. SISTEMA DE ILUMINACIÓN: este sistema tiene como finalidad dirigir la luz natural o artificial de tal manera que ilumine la preparación u objeto que se va a observar en el microscopio de la manera adecuada. Comprende los siguientes elementos:

- **FUENTE DE ILUMINACIÓN:** se trata generalmente de una lámpara incandescente de tungsteno sobrevoltada.



- **CONDENSADOR:** está formado por un sistema de lentes, cuya finalidad es concentrar los rayos luminosos sobre el plano de la preparación, formando un cono de luz con el mismo ángulo que el del campo del objetivo. El condensador se sitúa debajo de la platina y su lente superior es generalmente plano convexa, quedando la cara superior plana en contacto con la preparación cuando se usan objetivos de gran abertura (los de mayor ampliación). El condensador puede deslizarse verticalmente sobre un sistema de cremallera mediante un tornillo, bajándose para su uso con objetivos de poca potencia.
- **DIAFRAGMA:** el condensador está provisto de un diafragma-iris, que regula su abertura para ajustarla ala del objetivo. Puede emplearse, de manera irregular, para aumentar el contraste, lo que se hace cerrándolo más de lo que conviene si se quiere aprovechar la resolución del sistema óptico.
- 3. **SISTEMA ÓPTICO:** el sistema óptico es el encargado de reproducir y aumentar las imágenes mediante el conjunto de lentes que lo componen. Está formado por el ocular y los objetivos. El objetivo proyecta una imagen de la muestra que el ocular luego amplía.
- **OCULAR:** lente situada cerca del ojo del observador. Amplía la imagen del objetivo.
- **OBJETIVO:** lente situada cerca de la preparación. Amplía la imagen de ésta.
- **FOCO:** dirige los rayos luminosos hacia el condensador.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Microscopio óptico
- Frotis coloreados
- Aceite de inmersión
- Papel de arroz

V. MUESTRA

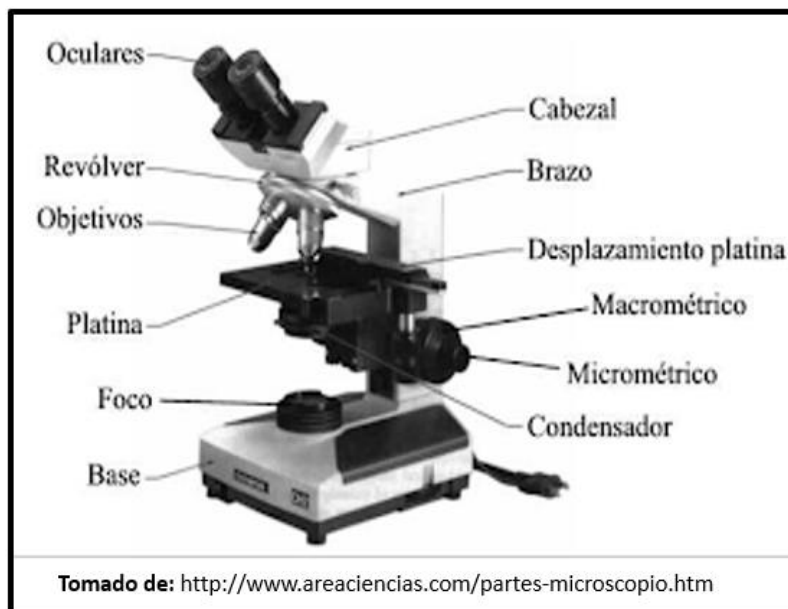
Frotis coloreados de prácticas anteriores.

VI. PROCEDIMIENTO

Para observar con objetivo de alto poder se deben seguir los siguientes pasos:

1. El condensador del microscopio debe estar alto.
2. El diafragma, abierto.
3. Usar toda la potencia de luz.
4. Tomar los frotis coloreados, colocarles encima una gota de inmersión y colocarlo en el microscopio.
5. El objetivo de inmersión debe tocar la gota de aceite y, con el micrométrico o tornillo fino de ajuste, se afina la imagen.
6. Observar la placa y describir lo que observa. Dibújelo.

Figura1. Partes del Microscopio óptico



Nota. Al terminar se retira la placa del microscopio y se limpia el aceite del objetivo, usando un pedazo de papel de arroz, colocar el objetivo de baja potencia y el condensador se debe bajar. Tapar el microscopio y guárdelo.



VII. TALLER

1. ¿Cuál son los tipos de microscopios más utilizados para observación de microorganismos?
2. Esquematice un microscopio óptico y mencione la función de cada una de sus partes.
3. ¿Qué importancia tiene para usted como futuro bacteriólogo conocer y manejar adecuadamente el microscopio?

PRÁCTICA Nº 2 TÉCNICAS DE TINCIÓN SIMPLE Y DIRECTA CON COLORANTES BÁSICOS

I. INTRODUCCIÓN

La tinción es un proceso por el cual las moléculas de un colorante se absorben a una superficie. El uso de colorantes permite cambiar el color de las células de los microorganismos y poder realizar la observación en microscopio óptico. Dado que las bacterias son casi incoloras, no presentan contraste con el medio en el cual se encuentran suspendidas y no pueden observarse claramente sin algún tratamiento previo. De acuerdo con la reacción que ocurre, existen diferentes tipos de tinción:

- **Simple:** el colorante utilizado sirve solo para denotar la morfología celular.
- **Diferencial:** el colorante utilizado pone de manifiesto diferencias entre células bacterianas o entre partes de una misma célula, estas técnicas utilizan más de un colorante o bien ciertos reactivos complementarios para la tinción.

Los colorantes más usados son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, estos son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos.



II. OBJETIVOS

GENERAL

Aprender la preparación y fijación de las bacterias para la tinción además de emplear colorantes básicos para realizar una tinción directa.

ESPECÍFICOS

Conocer el mecanismo básico y ventajas de una tinción.

Identificar características en las bacterias en estudio en base a las diferentes tinciones.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El tamaño de la mayoría de las células bacterianas es tal que resultan difíciles de ver con el microscopio óptico. La principal dificultad es la falta de contraste entre la célula y el medio que la rodea, y el medio más simple de aumentar el contraste es la utilización de **colorantes**. Estos pueden emplearse para distinguir entre tipos diferentes de células o para revelar la presencia de determinados constituyentes celulares, tales como flagelos, esporas, cápsulas, paredes celulares, etc.

Los colorantes son, generalmente, sales en las que uno de sus iones tiene color. Ellos se pueden dividir en dos grupos: básicos y ácidos. Si el color reside en el ion positivo del colorante, se dice que es un **colorante básico**. Ejemplo: el Azul de Metileno; y si el color reside en el ion cargado negativamente, se dice que es un **colorante ácido**. Ejemplo: Fucsina

En el caso del colorante simple Azul de Metileno es una sal cloruro de azul de metileno, que se disocia de la siguiente manera:

Cloruro de azul de metileno → Cloruro - + Azul de metileno.

El color del colorante reside en el ion azul de metileno, cargado positivamente.



IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Asa bacteriológica.
- Láminas portaobjetos.
- Mecheros.
- Azul de metileno.
- Microscopio.

V. MUESTRAS

- Caldo de cultivo sembrado con bacterias.
- Caja de Petri sembrada con bacterias.

VI. PROCEDIMIENTO

Con un asa de siembra coloque una gota pequeña del caldo de cultivo sembrado. Cuando se toma a partir de un cultivo sólido, se coloca una pequeña gota de agua en el portaobjetos y se mezcla bien con un poco del crecimiento del cultivo.

1. Extender la gota sobre el portaobjeto, formando una capa fina.
2. Secar los portaobjetos al aire o manteniéndolos altos encima de la llama de un mechero.
3. Colocar los portaobjetos, fijados en el soporte de alambre para tinciones.
4. Cubrir cada uno de los frotis con cinco gotas, aproximadamente, de azul de metileno y déjelo actuar por treinta (30) segundos.
5. Lavar con agua la preparación teñida, usando el frasco lavador.
6. Seque los portaobjetos.
7. Examinar las preparaciones teñidas en el microscopio, con objetivo de inmersión (100 X).



VII. TALLER

1. Dibujar las principales diferencias en el tamaño de las células, forma y agrupaciones.
2. Mencionar ejemplos de estructuras celulares bacterianas que se tiñan con colorantes básicos y ácidos.
3. Explicar el fundamento de la tinción simple.

PRÁCTICA N° 3 TÉCNICAS DE TINCIÓN DIFERENCIAL (TINCIÓN DE GRAM)

I. INTRODUCCIÓN

Las tinciones diferenciales se utilizan ampliamente en microbiología; consisten en la aplicación de dos colorantes que contrastan en su intensidad o color y un paso intermedio que provoca una respuesta diferente entre microorganismos distintos o entre determinadas células dentro de una población. La diferenciación puede ser provocada por un agente químico o físico, permitiendo observar dos tipos de respuestas diferentes a la tinción en una misma muestra. Las dos tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología son la tinción de Gram y la tinción de ácido alcohol resistencia.

Los colorantes más usados son: azul de metileno, cristal violeta, safranina, estos son catiónicos y se combinan fuertemente con componentes celulares cargados negativamente, como los ácidos nucleicos y los polisacáridos ácidos.



II. OBJETIVOS

GENERAL

Conocer el mecanismo básico para el desarrollo correcto de la tinción de Gram.

ESPECÍFICOS

Aprender conceptos básicos relacionados con el proceso de preparación de un frotis.

Clasificar algunas especies bacterianas en Gram+ y Gram- de acuerdo con la tinción de Gram.

Comprender la importancia que tienen estas tinciones para la caracterización e identificación de las bacterias.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Los microorganismos difieren química y físicamente entre sí y por eso reaccionan de una manera distinta frente a un determinado procedimiento de tinción. Se puede definir la tinción diferencial como un método para distinguir tipos de bacterias.

La tinción de Gram es un ejemplo de tinción diferencial y es la más empleada en Bacteriología. Por este método se pueden separar las bacterias en dos grupos, Gram positivas y Gram negativas.

Importancia:

- Primer paso en la identificación bacteriana.
- Facilita el reconocimiento de las pruebas bio-químicas a efectuar para la identificación bacteriana.
- Permite establecer la calidad de algunos tipos de muestras directas



Recomendaciones:

- Durante la coloración, evitar que los colorantes se derramen.
- Tener en cuenta que uno de los pasos críticos es la decoloración con el alcohol acetona. Por tal razón, no exceder el tiempo establecido.
- No dejar destapados los colorantes porque se permite la evaporación y contaminación.
- Cuando se terminen los colorantes de trabajo enjuagar el frasco con agua destilada (dejar secar antes de envasar nuevamente colorante).
- Filtrar los colorantes antes de su uso.
- Cumplimiento riguroso de los tiempos estandarizados por cada laboratorio.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Cajas de Petri sembradas.
- Asas bacteriológicas.
- Láminas Portaobjetos.
- Mecheros.
- Cristal Violeta.
- Lugol.
- Alcohol Acetona.
- Safranina.
- Microscopios.

V. MUESTRAS

Cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

VI. PROCEDIMIENTO

- Preparar el frotis a partir de las placas de Petri sembradas. Fíjelos por el

- calor.
- Teñir con cristal violeta durante un minuto.
 - Lavar con agua.
 - Cubrir el frotis con Lugol para el Gram y manténgalo durante un minuto, aproximadamente.
 - Lavar con agua.
 - Decolorar con alcohol acetona. De diez a veinte segundos.
 - Lave con agua.
 - De coloración de contraste, con safranina, durante un minuto, aproximadamente.
 - Lavar con agua. Dejar secar.
 - Examinar con objetivo de inmersión.

Figura 2. Esquema del mecanismo de la Tinción de Gram



VII. TALLER

1. ¿Se pueden cambiar los colorantes inicial y de contraste?
2. ¿Cuál es la influencia del pH en la reacción de Gram?
3. Describa claramente el fundamento teórico de la tinción de Gram.
4. Explique y esquematice cuáles son las diferencias estructurales fundamentales entre bacterias Gram positivas y Gram negativas



PRÁCTICA Nº 4 TINCIÓN DE ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE (ZIEHL-NEELSEN)

I. INTRODUCCIÓN

La tinción de ácido resistencia o tinción de Ziehl-Neelsen separa a las bacterias en dos grupos, las que resisten la decoloración por ácido-alcohol de las que se decoloran. Esta tinción es muy importante porque muchas de las bacterias ácido-alcohol resistentes son patógenas, como *Mycobacterium tuberculosis* o *Mycobacterium leprae*, con lo que permite distinguirlas fácilmente.

II. OBJETIVOS.

GENERAL

Conocer el mecanismo básico y las ventajas de la tinción de ácido alcohol resistentes.

ESPECÍFICOS

Desarrollar correctamente la tinción de bacterias ácido alcohol resistente (Ziehl-Neelsen).

Aprender a diferenciar los microorganismos ácido alcohol resistentes.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

La tinción de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), es una tinción diferencial que demuestra la resistencia de una célula bacteriana a ser decolorada por los ácidos.

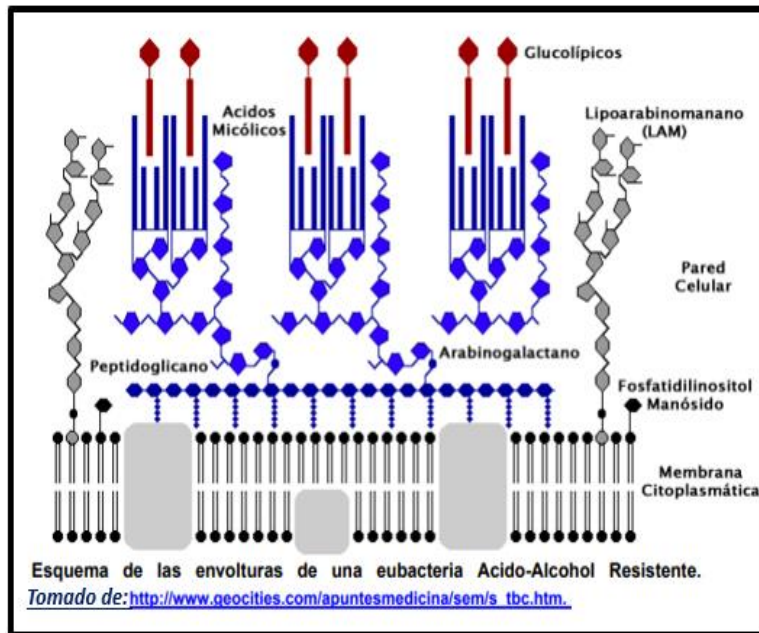
Características de las BAAR:

- Presentan en la pared una gran cantidad de glucolípidos, principalmente ácidos micólicos (60%), responsables en parte de la acido - alcohol

resistencia.

- Un peptidoglicano especial (la diferencia más importante es que en vez de N-acetil murámico existe N-glucosil-murámico).

Figura 3. Esquema de bacterias ácido alcohol resistentes



Utilidad de la tinción:

- Búsqueda microscópica de B.A.A.R. Ejemplos: *Mycobacterias* y *Mycoplasma* en cualquier espécimen clínico.
- Es una coloración diferencial y específica.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal
- Asas bacteriológicas
- Láminas Portaobjetos
- Mecheros
- Fucsina fenicada
- Alcohol ácido
- Azul de Metileno
- Microscopios.



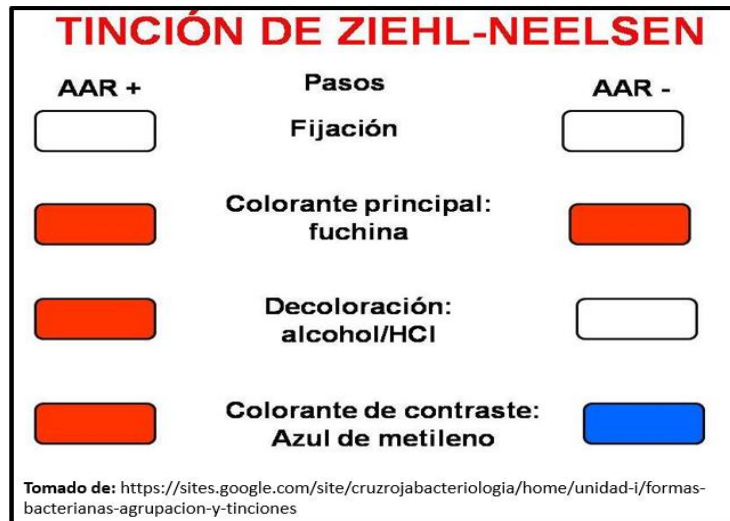
V. MUESTRAS

- Cepas de *Escherichia coli*
- Cepas de *Staphylococcus aureus*
- Esputo

VI. PROCEDIMIENTO

1. Preparar un frotis del esputo y otro frotis a partir de la mezcla de cultivo de *Escherichia coli*.
2. Secar al aire y fije por el calor.
3. Teñir el frotis durante diez (10) minutos con fucsina fenicada. Calentar con mechero. El frotis no debe secarse durante el proceso de tinción. Evite un exceso de colorante.
4. Lavar con agua.
5. Decolorar durante diez a treinta segundos con Alcohol ácido.
6. Lavar con agua.
7. De contraste con azul de metileno, durante treinta segundos (sin calentar).
8. Lavar con agua. Deje secar.
9. Observar con objetivo de inmersión y realice dibujos.

Figura 4. Esquema del mecanismo de la tinción ZIEHL-NEELEN



VII. TALLER

1. Explicar qué ocurre al variar el orden de los colorantes
2. Mencione qué ocurre cuando se suprime el calentamiento
3. ¿Los organismos Gram positivos o Gram negativos, son ácido-resistentes?
4. Indique ejemplos de bacterias ácido alcohol resistente
5. Describa el fundamento teórico de la tinción ZIEHL-NEELEN

PRÁCTICA Nº 5 MÉTODOS DE SIEMBRAS

I. INTRODUCCIÓN

Sembrar o inocular es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento.

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

1. Que se efectúen asépticamente.
2. Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados



3. Que se realicen solo los manipuleos indispensables.
4. Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien flujo laminar.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Conocer los diferentes métodos de siembra microbiológica con el fin de conseguir una buena separación de las colonias y aislarlas fácilmente.

ESPECÍFICOS

Que el alumno adquiera destrezas para la inoculación de bacterias en medios sólidos, semisólido y líquidos, observando las diferentes manifestaciones del crecimiento bacteriano.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

La transferencia de los productos patológicos a un medio de cultivo bacteriológico se denomina “**siembra**”; y la transferencia de los microorganismos de un medio de cultivo a otro medio de cultivo se denomina “**repique**”.

Tipos de siembra:

- *Estriación en Agar:* es usada para aislar colonias de cultivos que contienen flora mixta, para estudiar su morfología y características que son de valor para el diagnóstico e identificación de los microorganismos.
- *Inoculación o picadura en tubo con agar inclinado:* el agar inclinado es un tubo de ensayo común que contiene agar, el cual durante el proceso de enfriamiento se colocó en posición inclinada. Se usa para aislar microorganismos aerobios y anaerobios y para la observación de algunas características de cultivo como la producción de pigmentos.
- *Inoculación en medios líquidos:* los medios líquidos se utilizan para obtener un crecimiento rápido y masivo de la bacteria. Este crecimiento se puede



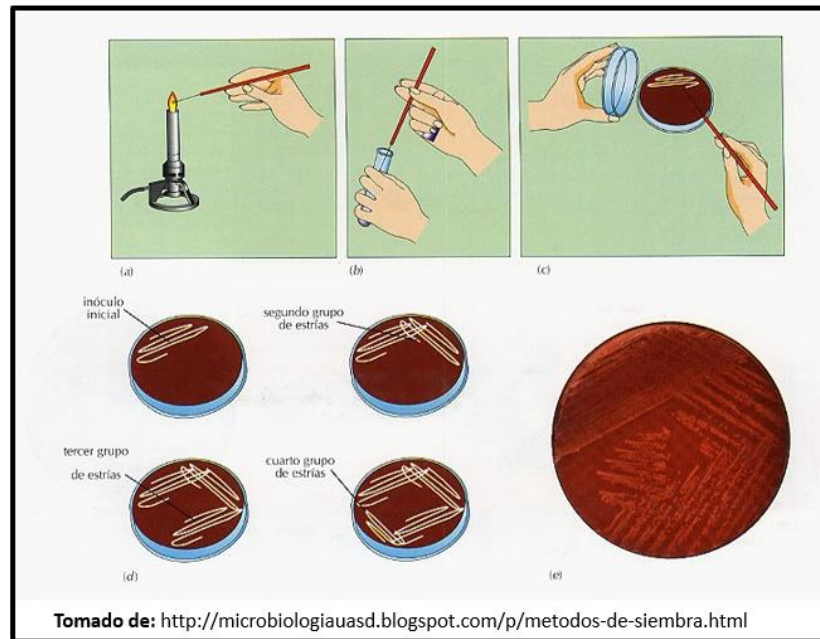
presentar en algunas de las siguientes formas:

- Enturbiamiento (con opacidad más o menos densa).
- Formación de película (velo o nata en la superficie del cultivo).
- Sedimento (depósito de bacterias en el fondo).
- Cambio de color del medio (debido a pigmentos bacterianos solubles en agua).
- Formación de flóculos (dan aspecto de migajas de pan suspendidas en el medio líquido).
- Inoculación en medios semisólidos: este tipo de inoculación se usa fundamentalmente para observar la movilidad de algunas bacterias.
- Inoculación en masa: este tipo de inoculación se utiliza para poder hacer un recuento de las colonias que se desarrollan en el agar. La inoculación se realiza cuando el agar está fundido (más o menos 45 °C) de modo que las bacterias no sólo se desarrollan en la superficie sino en todo el medio.

Diferentes tipos de siembras para aislamiento de colonias

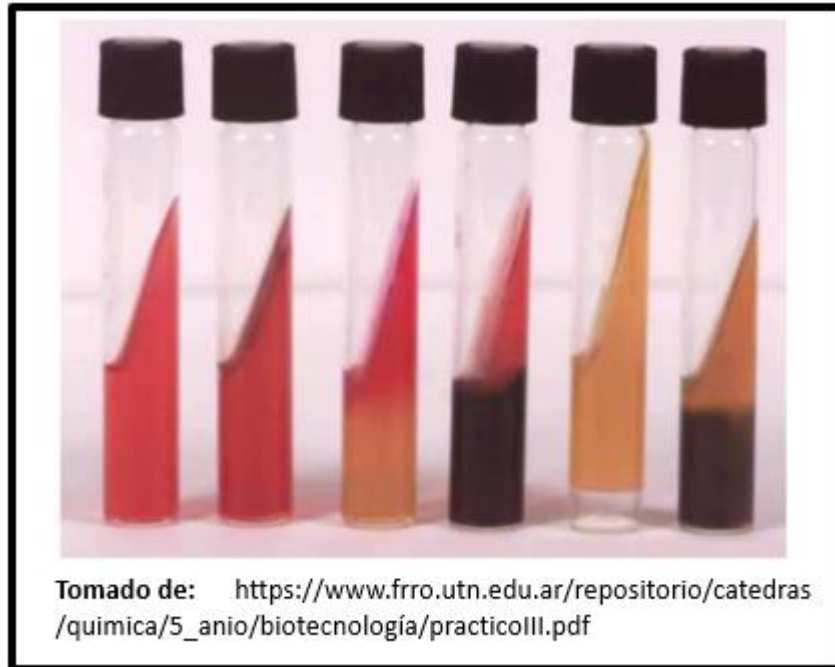
- Agotamiento (método de siembra por estría): este tipo de siembra es el usado en secreciones con flora mixta donde se quieren obtener aisladas las diferentes clases de colonias para su estudio.

Figura 5. Método de siembra por estría



- Trapeado: este tipo de siembra se utiliza para recuento de colonias en orinas y para los antibiogramas.
- Siembra en agar en tubo inclinado o bisel (pico de flauta): en este tipo de siembra requiere la punción del asa en punta para la observación en la utilización de azúcares, nutrientes y carbohidratos.

Figura 6. Siembra en agar en tubo inclinado

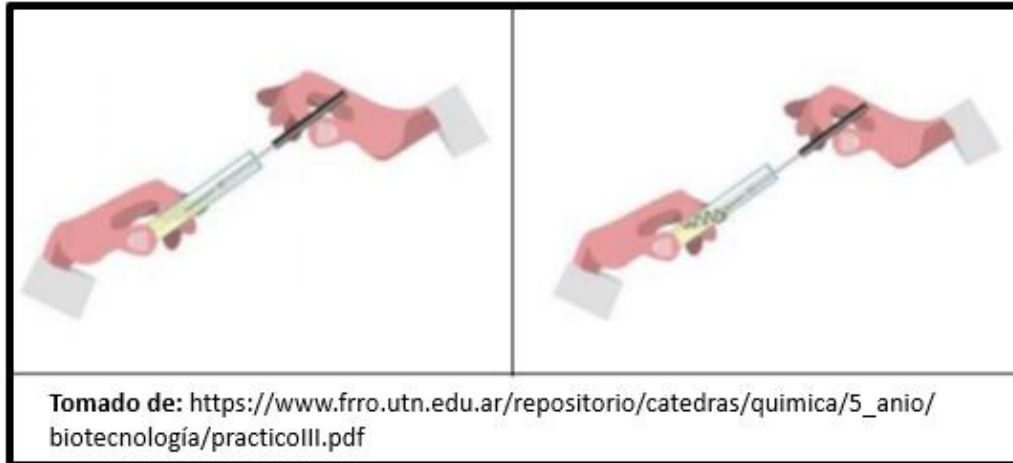


El inóculo se siembra, con ayuda del asa, de la siguiente manera:

En profundidad con asa de punta: se pica con el asa el cultivo a sembrar y se introduce mediante punción en el medio contenido en la parte inferior del tubo

En superficie con asa de aro: se pica con el asa el cultivo a sembrar y se esparce el mismo sobre la superficie en bisel en forma de zigzag.

Figura 7. Método de siembra en agar en tubo inclinado



- Siembra en caldo nutritivo: las muestras además de realizarles siembra en agares a su vez se siembran en caldos nutritivos para la recuperación de los microorganismos, si estos están en escasa cantidad en la muestra y en el cultivo directo no observamos aislamientos; se realiza un repique del caldo para verificar la negatividad de crecimiento bacteriano.

Figura 8. Siembra en caldo nutritivo





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Medios de cultivo preparados (sólidos y líquidos).
- Asa bacteriológica.
- Mechero.
- Lápiz de cera.
- Alcohol.
- Algodón.

V. MUESTRAS

- Cepas de *Escherichia coli*.
- Cepas de *Staphylococcus aureus*.

VI. PROCEDIMIENTO

Siembra por agotamiento: tomar el material a sembrar y siémbrelo en los diferentes medios indicados en la guía, siguiendo los procedimientos haga método de agotamiento por estrías, picadura o punción y método de trapeado e incube por 24 horas a 37 °C.

VII. TALLER

1. Investigue y esquematice otros métodos de siembra de bacterias.
2. Mencione qué utilidad tiene realizar siembras de bacterias en tubos.
3. Condiciones necesarias para una correcta realización en la siembra de un cultivo.
4. Investiga y explica el caso: si observas una colonia fuera del área de siembra ¿qué significancia le darías?



PRÁCTICA Nº 6 MORFOLOGÍA BACTERIANA

I. INTRODUCCIÓN

Las bacterias presentan una amplia variedad de tamaños y formas. La mayoría presentan un tamaño diez veces menor que el de las células eucariotas, es decir, entre 0,5 y 5 μm . Sin embargo, algunas especies como *Thiomargarita namibiensis* y *Epulopiscium_fishelsoni* llegan a alcanzar los 0,5 mm, lo cual las hace visibles al ojo desnudo. En el otro extremo se encuentran bacterias más pequeñas conocidas, entre las que cabe destacar las pertenecientes al género *Mycoplasma*, las cuales llegan a medir solo 0,3 μm , es decir, tan pequeñas como los virus más grandes.

La forma de las bacterias es muy variada y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como pleomorfismo. De todas formas, podemos distinguir tres tipos fundamentales de bacterias:

- Coco (del griego kókkos, grano): de forma esférica.
- Bacilo (del latín baculus, varilla): en forma de bastoncillo
- Formas helicoidales: Vibrio, espirilo y espiroquetas.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Identificar las diferentes formas que presentan las bacterias de interés clínico.

ESPECÍFICOS

Que el estudiante conozca las principales características morfológicas microscópicas de las bacterias de interés clínico.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Clasificación de las bacterias según su forma: esféricos (cocos), cilíndricas (bacilares), helicoides (espirilos).

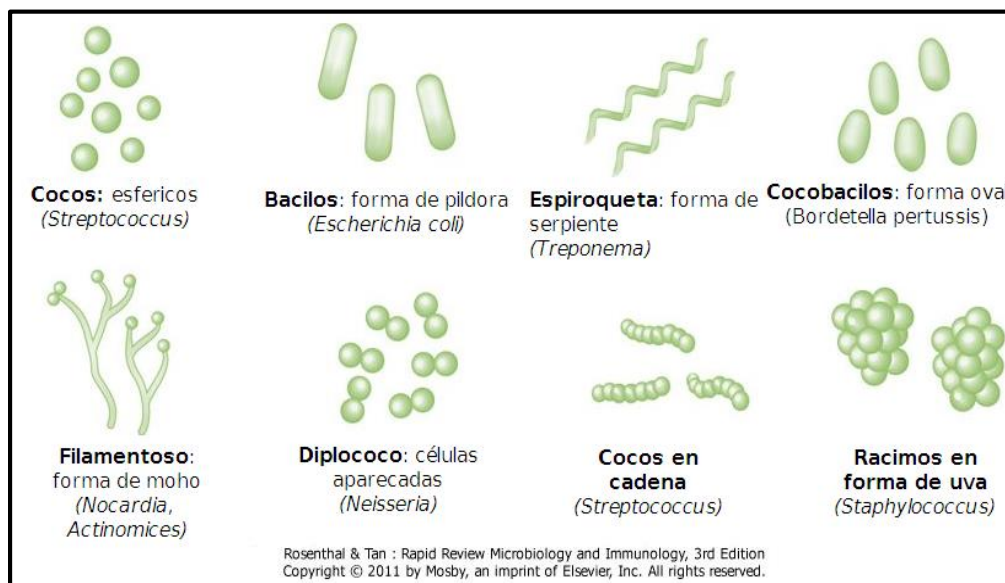
Clasificación de los cocos según su agrupación: diplococos (parejas), estreptococos (cadenas), estafilococos (racimos), tétradas (grupos de cuatro).

Clasificación de los bacilos según su agrupación: diplococos (parejas), estreptobacilos (cadenas). Los extremos de los bacilos pueden ser redondos, cuadrados o afinados.

También varían en cuanto a forma, longitud y grosor: bacilos grandes y gruesos, bacilos fusiformes, bacilos cortos y delgados, bacilos cortos y gruesos (cocobacilos), vibriones (en forma de coma).

Clasificación de las formas helicoides: espiroquetas, borrelias, leptospiras, treponemas.

Figura 9. Clasificación de las bacterias según su forma





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Escobillones estériles.
- Placas portaobjetos.
- Mecheros.
- Asas.
- Colorantes de Gram.
- Microscopios.

V. MUESTRAS

- Cepas de *Escherichia coli*.
- Cepas de *Staphylococcus aureus*.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Realizar diferentes frotis con las cepas, realizar tinción de Gram y observar al microscopio en el objetivo de 100 X.

VII. TALLER

1. Describa las diferentes morfologías bacterianas que se pueden observar. Realice sus correspondientes dibujos.
2. ¿Qué importancia tiene para un bacteriólogo identificar la morfología bacteriana? Justifique su respuesta.



PRÁCTICA Nº 7 MORFOLOGÍA DE COLONIAS

I. INTRODUCCIÓN

Una colonia es una agrupación de bacterias formada a partir de la reproducción de una Unidad Formadora de Colonia (UFC) sobre un medio sólido. Aunque varía de tamaño, generalmente es visible a simple vista. Una UFC puede ser un solo microorganismo o bien un grupo de microorganismos de una misma especie como en el caso de bacterias que tienen tendencia a permanecer unidas como los estafilococos o los estreptococos. Las colonias bacterianas tienen una medida, forma, textura y en algunos casos color característicos, que, aunque puede variar de acuerdo con el medio en que se encuentren, es constante bajo condiciones controladas y depende de la especie bacteriana que la forme. Debido a que las características de las colonias ocurren en varios grados y combinaciones dependiendo de las bacterias y son a menudo muy uniformes, sirven para identificar bacterias en cultivos mezclados.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Aprender las diferentes características de la morfología colonial utilizadas en la identificación de bacterias.

ESPECÍFICOS

Identificar y describir las colonias de diferentes especies de bacterias de interés clínico.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las colonias son agrupaciones de millones de bacterias y son un criterio de identificación bacteriana. Desde el punto de vista taxonómico, se clasifican según su borde, forma y elevación.

La descripción de las características coloniales siempre debe hacerse a partir de las colonias bien aisladas y de un cultivo joven.

Otra característica que analizar es el crecimiento en tubo con agar en pico de flauta, inoculados por estría y en medio líquido, con el fin de demostrar variaciones de las bacterias.

Figura 10. Morfología de colonias

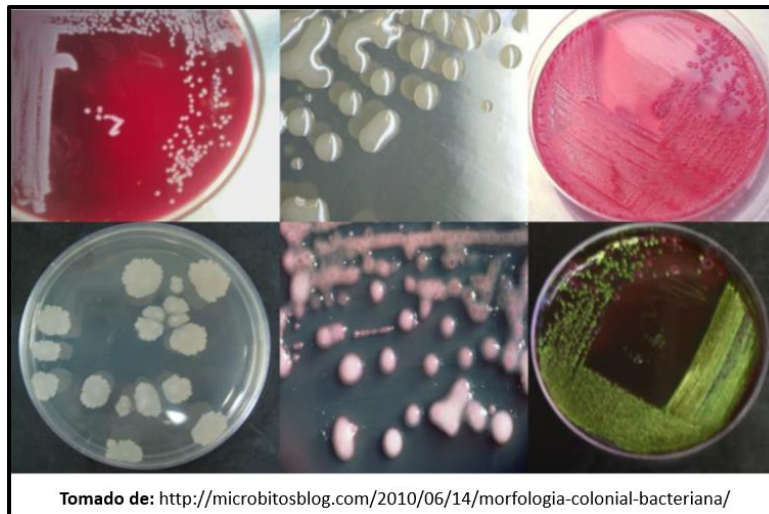
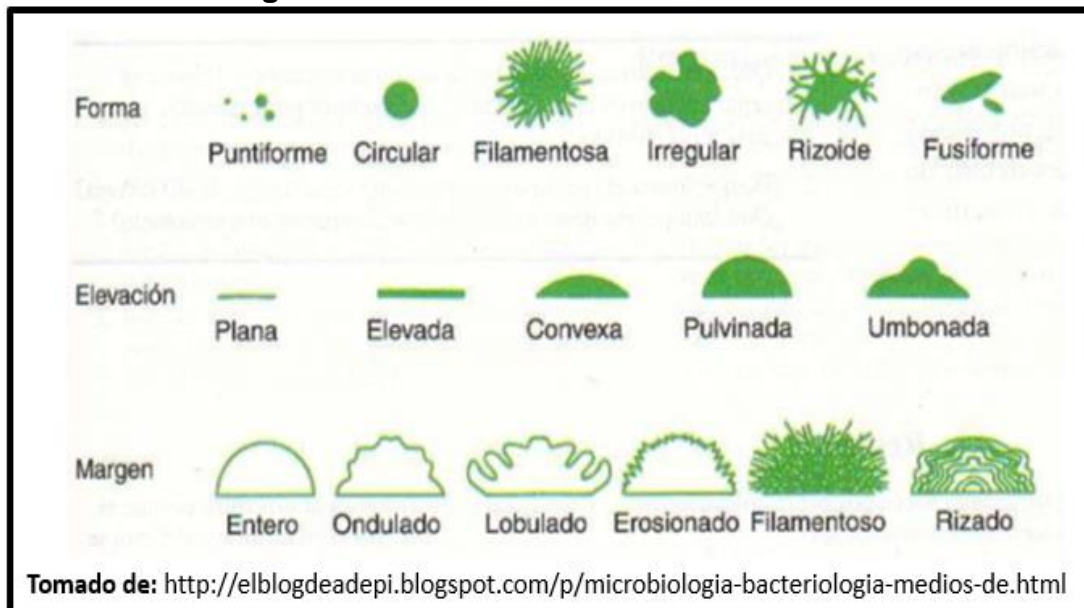


Figura 11. Características de las colonias





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Cajas de Petri con agar.
- Tubos con medio líquido y con agar inclinado.
- Asa metálica.
- Solución salina.
- Estereoscopio.
- Mechero.

V. MUESTRAS

- Bacterias: *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Proteus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*.

VI. PROCEDIMIENTO

Día 1:

1. Entregar a cada estudiante un cultivo joven de una de las bacterias a estudiar.
2. Realizar la siembra de las bacterias en medios en cajas de Petri y en tubos con medio líquido y agar inclinado.
3. Incubar tubos y cajas a 37°C por 24 horas.

Día 2.

1. Con la ayuda de un estereoscopio observar cuidadosamente las características de las colonias de las cajas. Determinar a las colonias:
 - Tamaño: medir el diámetro de las colonias.
 - Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular o rizoide.
 - Elevación: plana, levantada, convexa, pulvinada o umbonada.
 - Margen o borde: entero, ondulado, lobulado, filamentoso o irregular.
 - Color: incolora, blanquecina, amarillenta u otro.
 - Superficie: lisa, áspera, arrugada, seca.
 - Caracteres ópticos: opaca, translúcida.



- Olor: abrir la caja y mover el aire con la mano, acercar para oler el cultivo. No oler directamente la placa. Determinar si presenta un olor característico.
- 2. Para los tubos con medio inclinado, describa el tipo de crecimiento (filiforme, equinulado, efuso, arborescente y rizoide).
- 3. Observar el tubo con medio líquido sin agitarlo y describir el tipo de crecimiento, si se observa en la superficie (anillo, película, si es membranoso o floculado), en todo el tubo o se concentra en el tubo y forma un sedimento.
- 4. Realizar a las colonias estudiadas tinción de Gram.

VII. TALLER

1. ¿Por qué es importante para un bacteriólogo la identificación y conteo de colonias?
2. Completar el siguiente cuadro:

Cuadro1. Cultivo en cajas con agar:

Especie	Características de las colonias						
	Tamaño	Consistencia	Forma	Elevación	Margen	Superficie	Cticas ópticas
<i>Klebsiella spp.</i>							
<i>Pseudomonas spp.</i>							
<i>Proteus spp.</i>							
<i>E. coli</i>							
<i>E. faecalis</i>							
<i>S. aureus</i>							

Cuadro2. Cultivos en tubos con agar inclinado y medio líquido

Especie	Características en agar pico de flauta		Características en medio líquido
	Crecimiento	Pigmento	
<i>Klebsiella spp.</i>			
<i>Pseudomonas spp.</i>			
<i>Proteus spp.</i>			
<i>E. coli</i>			
<i>E. faecalis</i>			
<i>S. aureus</i>			



PRÁCTICA Nº 8 UBICUIDAD DE LOS MICROORGANISMOS EN EL AMBIENTE

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos se encuentran en los más diversos ambientes y materiales cumpliendo funciones beneficiosas o perjudiciales. Esa ubicuidad de los microorganismos es algo que debemos tener en mente para tomar las precauciones pertinentes e impedir que éstos vayan a interferir en el trabajo que estemos realizando sea en una farmacia, un laboratorio o incluso en la cocina de nuestra casa. Aunque no podemos ver a los microorganismos a simple vista, cuando los cultivamos en un medio adecuado, sí podemos ver manifestaciones de su crecimiento. Por ejemplo, todos nosotros hemos visto el crecimiento algodonoso y coloreado de mohos sobre alimentos, cueros, etc.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Demostrar la presencia de las bacterias en la naturaleza

ESPECÍFICOS

Comprobar la existencia de los microorganismos al observar el crecimiento bacteriano a partir de diferentes muestras de diversos ambientes, superficies corporales, líquidos y objetos inanimados.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

En el ambiente se encuentran una gran cantidad de microorganismos que colonizan el entorno, las superficies corporales e incluso el interior de nuestras cavidades. Los microorganismos se pueden encontrar en el agua, suelo, animales, plantas, superficies inanimadas o suspendidos en el aire en granos



de polvo y gotitas de agua. Los que conviven con nosotros hacen parte de la microbiota, cuya presencia es benéfica. Sin embargo, algunos agentes de esta microbiota son potencialmente patógenos pudiendo llegar al ambiente a través de secreciones, aerosoles, excreciones de animales e individuos enfermos y/o portadores o de cadáveres en descomposición.

La ubicuidad de los microorganismos en el medio ambiente se basa en tres características principales:

- Su tamaño pequeño, que les permite una gran capacidad de dispersión.
- Su variabilidad y flexibilidad metabólica, que les permite tolerar y adaptarse rápidamente a condiciones ambientales desfavorables.
- Su plasticidad genética que les permite persistir durante largo tiempo adaptándose a condiciones ambientales cambiantes.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Pipetas Pasteur.
- Escobillones.
- Caja de Petri con agar nutritivo.
- Algodón.
- Alcohol etílico de 70°.

V. MUESTRAS

- Se tomarán muestras de diferentes ambientes.

VI. PROCEDIMIENTO

Los estudiantes deberán formar grupos de trabajo.

El Grupo 1 debe realizar la siguiente experiencia:



1. Colocar el dedo pulgar sobre el agar y retirarlo rápidamente.
2. Tomar una torunda de algodón, impregnarla en alcohol etílico de 70°, pasarla por el dedo pulgar. Dejar evaporar el alcohol y colocarlo nuevamente sobre el agar.
3. Tomar un hisopo estéril y trazar líneas sobre la superficie de la placa. Pasar un hisopo estéril por la superficie húmeda del fregadero y trazar líneas sobre la superficie de la placa.

Grupo 2:

1. Abrir la placa sobre el mesón y dejar el agar expuesto al aire durante 10 minutos.
2. Toser sobre el agar.
3. Pasar una toalla de papel impregnada con desinfectante sobre una porción del mesón de más o menos 25 cm², dejar secar y luego pasar un hisopo estéril por esa superficie y trazar sobre el agar varias líneas paralelas con el hisopo.

Grupo 3:

1. Tomar un hisopo estéril y pasarlo por el cuello, luego trazar sobre el agar varias líneas paralelas con el hisopo.
2. Tomar un hisopo estéril y pasarlo por el piso, luego trazar sobre el agar varias líneas paralelas con el hisopo.
3. Tomar un hisopo estéril y pasarlo por la pared, luego trazar sobre el agar varias líneas paralelas con el hisopo.

Grupo 4

1. Colocar una gota de agua del chorro sobre el agar y diseminarla mediante un movimiento de vaivén.
2. Colocar una gota de agua destilada sobre el agar y diseminarla mediante un movimiento de vaivén.



3. Colocar una gota de alcohol al 70% sobre el agar y diseminarla mediante un movimiento de vaivén.

Grupo 5

1. Colocar una moneda sobre el agar y retirarla después de unos segundos de contacto.
 2. Colocar un borrador sobre el agar y retirarla después de unos segundos de contacto.
 3. Colocar una llave sobre el agar y retirarla después de unos segundos de contacto.
- Incubar las placas a 37°C por 24 horas.
 - Realizar una descripción microscópica y macroscópica de las colonias.

VII. TALLER

1. ¿De dónde se obtiene el agar? ¿Cuál es su composición química?
2. Mencione ejemplos en la naturaleza donde se encuentren microorganismos
3. ¿Cuál es la utilidad de los microorganismos para el medio ambiente?



PRÁCTICA N° 9 PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos no pueden estudiarse individualmente debido a su tamaño tan pequeño, por lo que sólo pueden ser estudiados en poblaciones. Para ello es necesario cultivarlos en medios artificiales. Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es observar su crecimiento en sustancias alimenticias artificiales preparadas en el laboratorio. El material alimenticio en el que crecen los microorganismos es el **Medio de Cultivo** y el crecimiento de los microorganismos es el **Cultivo**. Se han preparado más de 10.000 medios de cultivo diferentes. Para que las bacterias crezcan adecuadamente en un medio de cultivo artificial debe reunir una serie de condiciones como son: temperatura, grado de humedad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad. Un medio de cultivo debe contener los nutrientes y factores de crecimiento necesarios y debe estar exento de todo microorganismo contaminante. Los virus, por ejemplo, son obligados parásitos intracelulares, por lo que necesitan un medio que contenga células vivas. Un pequeño grupo de bacterias no se han logrado cultivar en ningún medio de cultivo, hasta la fecha, como *Mycobacterium leprae*, *Treponema pallidum* y las *rickettsias*.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Comprender las diferencias químicas de los diferentes medios de cultivo y las técnicas de preparación.

ESPECÍFICOS

Adquirir destrezas en la preparación de los medios de cultivo sólidos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Un **medio de cultivo** es una técnica de laboratorio que consta de un gel o una solución que contiene los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH y temperatura, el crecimiento de virus, microorganismos, células, tejidos vegetales o incluso pequeñas plantas. Según lo que se quiera hacer crecer, el medio requerirá unas u otras condiciones. Generalmente se presentan desecados en forma de polvo fino o granular antes de ser preparados; ya preparados pueden encontrarse en estado sólido, semisólido o líquido. El objetivo último del cultivo es variado: antibiograma, identificación, multiplicación.

Clasificación general de los medios de cultivo.

- **Por su consistencia:** líquidos (caldo púrpura de Bromocresol-ácida sódica), sólidos o semisólidos (medio OF).
- **Por su origen:** sintéticos o naturales.
- **Por su composición:** comunes o enriquecidos.
- **Por su selectividad:** enriquecidos o selectivos.

Figura 12. Medios de cultivos





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Balanza.
- Agua destilada.
- Estufa.
- Cajas de Petri.

V. MUESTRAS

- No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Realizar los cálculos para determinar la cantidad del medio sólido a pesar de acuerdo con el volumen a preparar.
2. Pesar y disolver en agua destilada. Disolver calentando.
3. Esterilizar el medio.
4. Después de que el agar haya sido esterilizado, muévelo suavemente para que el agar se reparta por igual y luego enfríe a unos 45 °C.
5. Cuando el agar se haya enfriado lo suficiente, tienda cuatro cajas de Petri evitando su contaminación, añadiendo 20 ml aproximadamente por caja.
6. Incubar sus placas, después de marcarlas, durante 24-48 horas a 30 °C.
7. En la siguiente sesión de laboratorio, observe si hay alguna contaminación.

VII. TALLER

1. ¿Cuáles son las ventajas de los medios complejos en el cultivo general de microorganismos?
2. ¿Cómo se clasifican los medios de cultivo en Bacteriología?
3. ¿Qué cuidados hay que tener en cuenta a la hora de preparar un medio de cultivo?
4. Investiga y explica cómo se realiza el control de calidad de los diferentes medios de cultivos que se preparan en el área de microbiología.



PRÁCTICA Nº 10 METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS (MEDIO OF)

I. INTRODUCCIÓN

El estudio bioquímico que se lleva a cabo como complemento de otros estudios bacteriológicos es posible gracias a las reacciones fisiológicas y químicas que llevan a cabo los microorganismos. Para esto se emplean medios de cultivo enriquecidos con productos útiles para el metabolismo celular, los cuales además contienen algún indicador que hace cambiar el color del medio al efectuar dichos microorganismos sus funciones. Los organismos varían en su capacidad para utilizar diferentes compuestos (por ejemplo: carbohidratos, urea, citrato, etc.) para algunos microorganismos que se usan en su identificación en el laboratorio. La prueba OF, oxido fermentativa o de Hugh-Leifson, se usa para diferenciar y clasificar microorganismos Gramnegativos capaces de metabolizar o no glucosa, lactosa, sacarosa u otro azúcar, con o sin oxidación. La peptona de caseína y el azúcar añadido constituyen la base nutritiva y energética del medio. El azul de bromotimol permite identificar las variaciones del pH y el cloruro de sodio aporta la salinidad necesaria para el buen crecimiento de los microorganismos. La oxidación o fermentación del carbohidrato se observa por el cambio de color de verde a amarillo.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Observar la vía metabólica utilizada por algunos microorganismos para la degradación de carbohidratos.

ESPECÍFICOS



Que el alumno realice algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Que el estudiante comprenda la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El metabolismo de un glúcido puede seguir la vía oxidativa o fermentativa. En vía oxidativa el aceptor final de electrones debe ser el oxígeno y por consiguiente el proceso es aerobio y produce poca acidez, mientras que en vía fermentativa el aceptor final de electrones es un compuesto orgánico y el proceso es anaerobio, originando mucha acidez en poco tiempo. **La prueba OF, Oxido fermentativa o de Hugh-Leifson**, es una prueba que indica el tipo de metabolismo energético: respiratorio (O) o fermentador (F). Se suele utilizar glucosa como sustrato. Se detecta la acumulación de ácidos con un indicador ácido-base (azul de bromotimol).

La bacteria se inocula con el hilo recto (por picadura) y se incuba en condiciones de **aerobiosis** (sin parafina) y de **anaerobiosis** (con parafina, tubo cerrado), simultáneamente. Las bacterias que **respiran aerobiamente** crecen en la superficie del medio del tubo abierto. Transforman la glucosa en CO₂, la superficie del medio se verá ligeramente amarilla (por la formación de ácido carbónico originado al reaccionar el CO₂ con el agua del medio). En el tubo cerrado, el cultivo se mantiene azul-verdoso. Las **bacterias fermentadoras** producen ácidos a partir de la glucosa. Viran el cultivo del tubo cerrado a amarillo; en el tubo abierto se inicia el viraje en el fondo, pero transcurridas 24 horas los ácidos pueden difundir por todo el medio virándolo a amarillo.

Fermentación: es el proceso metabólico más antiguo desde el punto de vista evolutivo, en el cual la energía procede de compuestos orgánicos que actúan como dadores y aceptores de electrones. La fermentación se hace en ausencia

de oxígeno y este proceso da lugar a muchos compuestos orgánicos, tales como ácidos fuertes que son detectables fácilmente por la adición de un indicador de pH.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Tubos de medios Medio OF (Hugh Leifson).
- Asa en punta.
- Parafina líquida o aceite mineral.
- Mecheros.

V. MUESTRAS

- Cepas de *Escherichia coli*.
- Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Cepas de *Clostridium sp.*

VI. PROCEDIMIENTO

Con el asa en punta, inocule las dos terceras partes del medio de ambos tubos en posición directa. Selle uno de los tubos con parafina y lleve a incubación a 37° C por 24 horas. Informe sus resultados.

Figura 13. Esquema de la Prueba de oxidación-fermentación (OF)

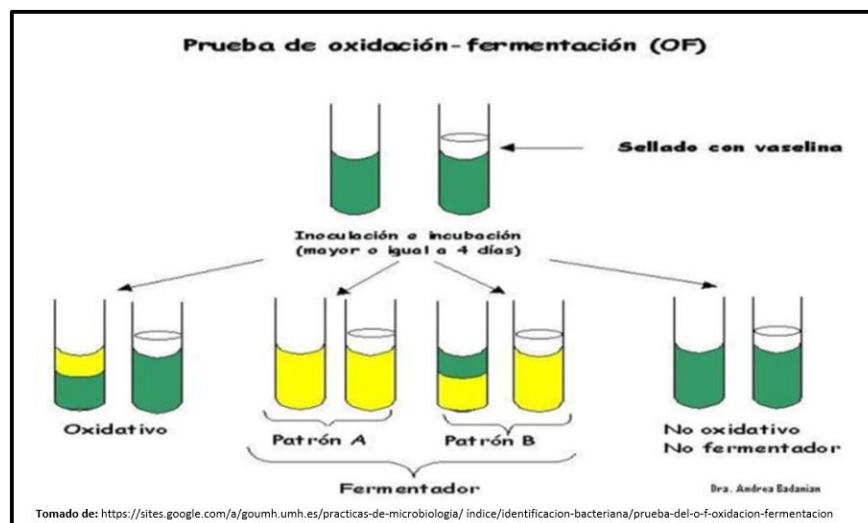
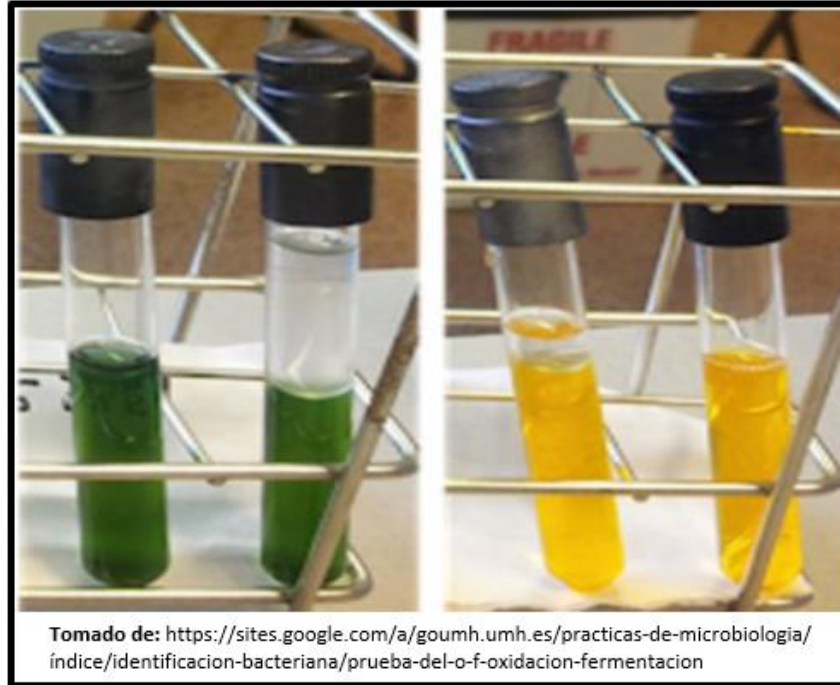


Figura 14. Prueba de oxidación-fermentación (OF)



VII. TALLER

¿Cuáles son las vías metabólicas más utilizadas por las bacterias?

¿Cuál es la vía más eficiente desde el punto de vista metabólico? Justifique.

Cuadro 3. INFORME DE RESULTADOS

Tubo abierto	Tubo cerrado	Tipo de Metabolismo	Tipo de M.O.



PRÁCTICA Nº 11 DEGRADACIÓN DE CARBOHIDRATOS EN EL MEDIO DE KLIGLER Y TSI

I. INTRODUCCIÓN

Las enterobacterias (Familia Enterobacteriaceae), son bacterias Gramnegativas. Contiene más de 30 géneros y 100 especies que pueden tener morfología de cocos o bacilos. Los miembros de este grupo forman parte de la microbiota del intestino (llamados coliformes) del ser humano y de otras especies animales. Algunas especies pueden vivir en tierra, en plantas o en animales acuáticos.

El **Agar-hierro-triple azúcar** es un medio de cultivo empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de los hidratos de carbono glucosa, lactosa y sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Observar las diferentes reacciones en el medio Kligler o TSI.

ESPECÍFICOS

Que el alumno realice algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Que el estudiante comprenda la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El Agar Kligler y el Agar hierro tres azúcares (TSI- Three Sugar Iron) son medios utilizados ampliamente en el tamizaje de identificación de microorganismos



entéricos. El medio de Kligler contiene dos azúcares: glucosa y lactosa, además de tiosulfato de sodio y sulfato ferroso, que sirve para detectar la presencia de gas y H₂S.

Características de los medios:

El medio tiene adicionado un indicador de pH, que es el rojo de fenol, que a pH ácido es amarillo y a pH alcalino es rojo.

Como el sulfuro de hidrógeno (H₂S) es incoloro, se utiliza un indicador para que pueda ser detectado. Esos indicadores pueden ser sulfato ferroso o citrato amónico férrico.

El tiosulfato de sodio es la sustancia que dona los átomos de azufre para la formación del H₂S, los átomos de hidrogeno se obtienen de la degradación de la glucosa.

Para visualizar el H₂S las sales de hierro utilizadas se precipitan formando un compuesto negro insoluble de sulfuro.

Las reacciones que pueden leerse en este medio son:

- Fermentación de la glucosa.
- Degradación de la lactosa.
- Producción de H₂S.
- Producción de gas.

Los posibles resultados obtenidos se interpretarían así:

a. K / K. Pico alcalino / Fondo alcalino.

No hay fermentación de los azúcares. Esta reacción la presentan las bacterias no fermentadoras, de manera que este resultado excluye a los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

b. A / A. Pico ácido / Fondo ácido.

Glucosa, lactosa, sacarosa fermentada.

c. K / A. Pico alcalino / Fondo ácido.

Glucosa fermentada, lactosa y sacarosa no fermentada.

d. Pico alcalino / Fondo ácido negro.

Glucosa fermentada, lactosa no fermentada, producción de H₂S.

Figura 15. Resultados prueba TSI



IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Tubos con los medios de Kligler o TSI.
- Mecheros.
- Incubadora.
- Asas.

V. MUESTRAS

- Cepas de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Clostridium*.

VI. PROCEDIMIENTO

Con un asa en punta tomar la colonia y atravesar con ella hasta un tercio del fondo del medio. No debe llegar al fondo, pues entraría aire en la parte profunda y se alteraría el medio para la fermentación. Pasar el asa por el bisel. Incubar



a 37 °C por 24 horas.

VII. TALLER

1. Informe y sustente los resultados obtenidos.
2. Investigue que otros ejemplos de bacterias se pueden inocular en estos medios para estudiar su metabolismo bacteriano.
3. Describe las reacciones finales en el medio de TSI y Klinger con microorganismos fermentadores y no fermentadores. Ilústralos con dibujos.

PRÁCTICA Nº 12 DESAMINACIÓN Y DESCARBOXILACIÓN DE CARBOHIDRATOS (MEDIO LIA)

I. INTRODUCCIÓN

Algunos microorganismos son capaces de provocar la descarboxilación de los aminoácidos por inducción de enzimas específicas. El resultado de esta descarboxilación es la producción de una amina (o diamina) y dióxido de carbono. Tal es el caso de la producción de la enzima lisina descarboxilasa la cual al actuar sobre la lisina produce una diamina llamada cadaverina. En el medio LIA se puede detectar la producción de la lisina descarboxilasa ya que se produce una reacción coloreada por un cambio en el pH del medio, que contiene como indicador púrpura de bromocresol. Un cambio del color original del medio (morado) hacia amarillo en el fondo indica una reacción ácida por la fermentación de una pequeña cantidad de glucosa en el medio. Si el microorganismo produce lisina descarboxilasa, la acción de esta enzima sobre la lisina dará lugar a la cadaverina, la cual provocará un cambio de pH hacia la alcalinidad dando un color morado que sobrepasa la acidez debida a la glucosa. Así pues, un fondo amarillo indica que no se produce lisina descarboxilasa y un color morado que sí es producida.



II. OBJETIVOS

GENERAL

Observar las diferentes reacciones en el medio de LIA.

ESPECÍFICOS

Realizar algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Comprender la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El Agar de Hierro y Lisina es un medio utilizado para la diferenciación de microorganismo entéricos en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar la lisina y de producir sulfuro de hidrogeno. Este medio también es conocido como **LIA. (Lysine Iron Agar)**

Edwards y Fife desarrollaron este medio para diferenciar a *Salmonella arizonae*. Debido a que *S. arizonae* fermenta la lactosa rápidamente, la producción de H₂S es suprimida en el Agar de Hierro y Triple Azúcar. Eliminando la lactosa e incorporando la lisina, Edwards y Fife encontraron que este medio diferencia a los medios, es especialmente recomendado para la identificación de bacilos que fermentan rápidamente la lactosa.

En este medio, la peptona es la fuente de carbono y nitrógeno. El extracto de levadura provee vitaminas y cofactores para el crecimiento. La dextrosa es la fuente de energía. El hidrocloreuro de L-lisina es el sulfato donde actúan las enzimas descarboxilasa o desaminasa. El citrato férrico de amonio y el tiosulfato de sodio actúan como indicadores de la producción de H₂S. El purpura de bromocresol es un indicador de pH. El agar es adicionado como agente solidificante.

En este medio se leen las siguientes reacciones bioquímicas:

- Fermentación de la glucosa (K/A), la bacteria solo fermenta la glucosa.
- Descarboxilación de la lisina: (K/K).
- Desaminación de la lisina: R/A) rojo/ amarillo.
- Producción de gas: ruptura del medio.
- Producción de H₂S: ennegrecimiento del medio.

Resultados

• **Descarboxilación de la lisina:**

Prueba Positiva: Pico violeta/fondo violeta.

Prueba Negativa: Pico violeta/fondo amarillo.

• **Desaminación de la lisina:**

Pico rojizo/fondo amarillo. Esto sucede con cepas del género *Proteus*, *Providencia* y alguna cepas de *Morganella spp.*

• **Producción de ácido sulfhídrico:**

Prueba positiva: Ennegrecimiento del medio (especialmente en el límite del pico y fondo).

Figura 16. Resultados prueba medio LIA





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Tubos con los medios de LIA.
- Mecheros.
- Incubadora.
- Asas bacteriológicas (punta recta y punta redonda).

V. MUESTRAS

- Cepas de: *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*.

VI. PROCEDIMIENTO

Con un asa en punta, tomar la colonia y realizar doble la siembra con ella hasta un tercio del fondo del medio. Pasar el asa por el bisel. Incubar a 37 °C por 24 horas.

VII. TALLER

1. Informe y sustente los resultados obtenidos en la práctica realizada.
2. Investigue qué otros ejemplos de bacterias se pueden inocular en estos medios para estudiar su metabolismo bacteriano.
3. Describe las reacciones finales de desaminación y descarboxilación en el agar LIA e ilústralos con dibujos.

PRÁCTICA Nº 13 PRUEBA DEL CITRATO DE SIMMONS

I. INTRODUCCIÓN

El Agar Citrato de Simmons es un medio utilizado para la diferenciación de bacilos Gram negativos en base a su capacidad de utilizar el citrato. Este medio



es recomendado para el estudio de enterobacterias a partir de muestras clínicas, de agua y alimentos. Ciertas bacterias tienen la capacidad de utilizar el citrato como única fuente de carbono en una serie de reacciones como sigue:

CITRATO OXALACETATO + ACETATO

OXALACETATO PIRUVATO + CO

2 PIRUVATO ACETATO + LACTATO + CO

Los ácidos orgánicos son posteriormente utilizados dando como producto final carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El pH alcalino así logrado hace que el indicador de pH en el medio, el azul de bromotimol vire de su color verde original a un azul intenso.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Medio utilizado para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la capacidad de utilizar Citrato como única fuente de carbono y energía

ESPECÍFICOS

Que el alumno realice algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Que el estudiante comprenda la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

En el medio de cultivo, el fosfato monoamónico es la única fuente de nitrógeno y el citrato de sodio es la única fuente de carbono. Ambos componentes son necesarios para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfatos forman un sistema buffer, el magnesio es cofactor enzimático.

El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, el azul de bromotimol es el



indicador de pH, que vibra al color azul en medio alcalino. El metabolismo del citrato se realiza, en aquellas bacterias poseedoras de citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato da progresivamente da oxalacetato y piruvato. Este último, en presencia de un medio alcalino da origen a ácidos orgánico que, al ser utilizados como fuente de carbono, producen carbonatos y bicarbonatos alcalinos. El medio vira entonces al azul y esto es indicativo de la producción de citrato permeasa.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Agar Citrato Simmons.
- Mechero.
- Asa en aro / punta.

V. MUESTRAS

- Cepas de *Citrobacter sp.*
- Cepas de *Klebsiella sp.*
- Cepas de *E. coli.*

VI. PROCEDIMIENTO

1. Inocular una pequeña porción de la colonia crecida en los tubos inclinados.
2. Realizar siembra por estría.
3. Incubar a 37° C por 24 horas.
4. Examinar la reacción.

LIMITACIONES

- Si se usa un inóculo denso para sembrar el medio de cultivo, puede variar el color del pico del verde al amarillo-amarronado. Esto no afecta el color verde del resto del medio de cultivo, pero puede afectar la visualización azul de un

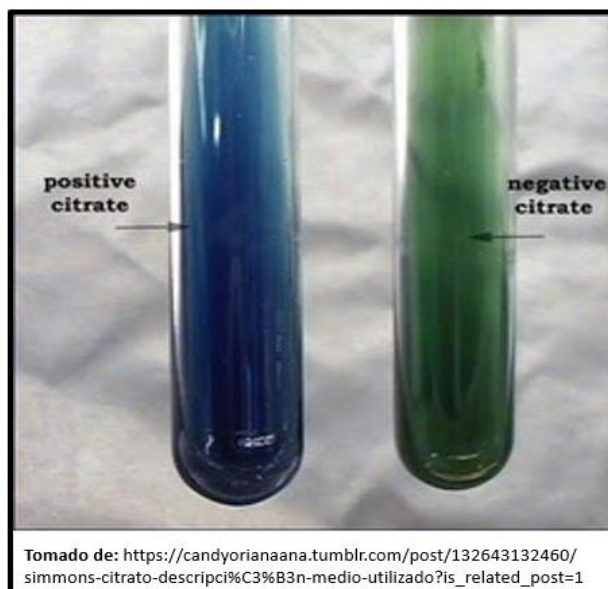
resultado positivo.

- Inóculos muy densos pueden originar resultados falsos positivos.
- Cuando se siembra una serie de pruebas bioquímicas a partir del mismo cultivo, se debe esterilizar la aguja de inoculación antes de inocular la prueba del citrato o sino inocularla primero. Cualquier arrastre de materia orgánica puede originar resultados falsos positivos.

INTERPRETACIÓN

El desarrollo de un color azul intenso en 24 - 48 horas indica una prueba positiva y revela que el microorganismo en estudio ha sido capaz de utilizar el citrato en el medio con la formación de productos alcalinos. La prueba también es positiva en ausencia de color azul si existe crecimiento del microorganismo a lo largo de la estría de inoculación.

Figura 17. Resultados prueba del citrato de SIMMONS



VII. TALLER

1. Enuncie cinco géneros bacterianos que utilicen el citrato y otros cuatro que sean



negativos.

2. Explique los resultados obtenidos en la práctica realizada en el laboratorio.
3. Esquematice con dibujos los resultados obtenidos.

PRÁCTICA N° 14 PRUEBA DE LA UREA

I. INTRODUCCIÓN

Algunas bacterias son capaces de emplear la urea como única fuente de nitrógeno. En tal caso la bacteria ha de poseer un enzima, la ureasa, capaz de atacar la urea. Al descomponerse se libera amoníaco que alcaliniza el medio.

El medio de cultivo posee un indicador de pH que vira a un color rosa intenso cuando dicho pH se hace básico; de esta forma podemos detectar la producción de amoníaco y, en última instancia, la presencia del enzima ureasa. El medio de cultivo a emplear es el agar urea.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Medio utilizado para la diferenciación de Enterobacterias, en base a la actividad ureásica, es muy útil para la diferenciación de *Proteus spp*, de otros miembros de la familia Enterobacterias.

ESPECÍFICOS

Realizar algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Comprender la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO



En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH.

Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea, como especies de *Enterobacter* o *Klebsiella*.

La hidrólisis de la urea es catalizada en algunos microorganismos por una enzima específica, la ureasa, dando lugar a dos moléculas de amonio, agua y dióxido de carbono. Todo esto da lugar a un cambio en el pH, lo que causa que cambie el color original del medio (amarillo) a un color rojo por el indicador rojo de fenol. De acuerdo con la degradación de la urea el color será más o menos intenso. $(\text{NH}_2)_2\text{C}=\text{O} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} (\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Agar Urea base.
- Mechero.
- Asa en aro / punta.

V. MUESTRAS

- Cepas de *Proteus sp.*
- Cepas de *Klebsiella sp.*
- Cepas de *E. coli*.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Inocular una pequeña porción de la colonia crecida en los tubos inclinados.
2. Realizar siembra por estría.
3. Incubar a 37° C por 24 horas.
4. Examinar la reacción.

LIMITACIONES

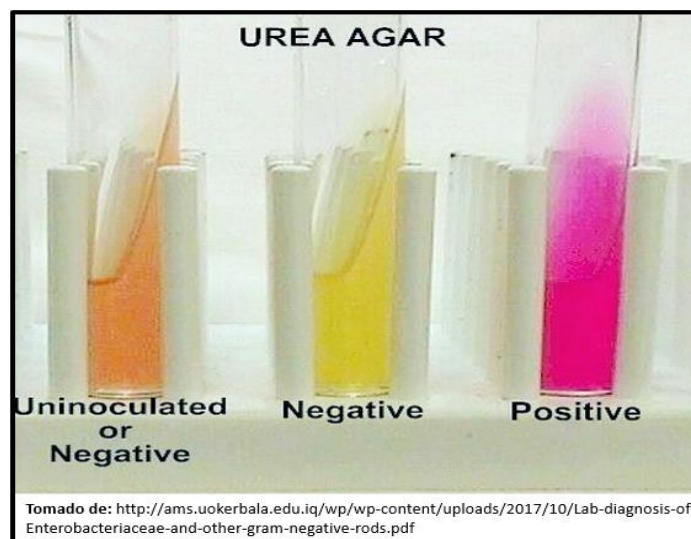
- Bacterias que hidrolizan lentamente la urea, como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, viran al color rojo-rosado de todo el medio de cultivo luego de varios días de incubación.
- No calentar o sobrecalentar el medio de cultivo porque la urea se descompone fácilmente.

INTERPRETACIÓN

La producción de urea indica un color fucsia intenso en todo el agar inclinado. La intensidad de color en el agar nos indica la capacidad de velocidad que tiene el microorganismo para hidrolizar la urea.

Una reacción negativa no produce cambio de color; el medio de agar mantiene un color de amarillo pálido a beige.

Figura 18. Resultados prueba de la UREA





VI. TALLER

1. Haga una lista de bacterias que hidrolicen la urea de una manera rápida y lenta.
2. Diga los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio y esquematice con dibujos.
3. Investigue como se realiza el color de calidad para esta prueba.

PRÁCTICA Nº 15 PRUEBA SIM (SULFURO-INDOL-MOTILIDAD)

I. INTRODUCCIÓN

SIM es un medio semisólido y diferencial utilizado en la confirmación presuntiva de miembros de la familia Enterobacteriaceae, especialmente de *Salmonella* y *Shigella*.

La prueba de indol se emplea para detectar la presencia de la enzima triptofanasa en bacterias, que degrada el aminoácido triptófano a indol. Al añadir al medio SIM el reactivo de Kovac's o de Ehrlich que contiene p-dimetilaminobenzaldehído, reacciona tanto con el indol como con el triptófano produciendo compuestos de color rojizo. Para evitar la interferencia del triptófano, el reactivo está disuelto en alcohol isoamílico inmiscible en agua. A diferencia del triptófano, el indol es soluble en el alcohol y sólo este compuesto reaccionará con el aldehído produciendo el anillo coloreado característico de esta prueba.

La motilidad se puede observar por un crecimiento turbio lejos de la picadura realizada en la inoculación de los medios OF o **en un medio SIM**.

II. OBJETIVOS



GENERAL

Verificar la movilidad de un medio semisólido destinado a la producción de indol y de sulfuro de hidrógeno en un mismo tubo.

ESPECÍFICOS

Realizar algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Comprender la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas, y particularmente de la tripteína, que puede ser oxidado por algunas bacterias para formar indol. En el proceso interviene un conjunto de enzimas llamadas triptofanasa. El indol producido se combina con el aldehído del reactivo de Kovac's o de Ehrlich, para originar un compuesto de color rojo. Las cepas móviles pueden apreciarse en este medio, por la turbidez que producen alrededor de la punción de siembra, mientras que aquellas cepas productoras de sulfhídrico se distinguen por la formación de un precipitado negro de sulfuro de hierro a partir del tiosulfato siempre que el medio se mantenga a un pH mayor a 7.2.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Agar SIM.
- Mechero.
- Asa en aro / punta.

V. MUESTRAS



- Cepas de *Proteus sp.*
- Cepas de *Enterobacter sp.*
- Cepas de *E. coli.*

VI. PROCEDIMIENTO

1. Inocular una pequeña porción de la colonia crecida en los tubos inclinados.
2. Realizar siembra por estría.
3. Incubar a 37° C por 24 horas.
4. Examinar la reacción.
5. Adicionar una gota de reactivo de Kovac's.

• LIMITACIONES

- En las bacterias aerobias estrictas, que sólo crecen en superficie, la movilidad puede ser difícil de observar.
- Algunas bacterias productoras de melanina como *Morganella morganii*, pueden dar un color parduzco, que no debe confundirse con el color negro debido a la producción de ácido sulfhídrico.

• INTERPRETACIÓN

1. Movilidad:

- Resultado positivo: presencia de turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra.
- Resultado negativo: crecimiento solamente en la línea de siembra.

2. Sulfuro:

- Resultado positivo: ennegrecimiento en el medio.
- Resultado negativo: el medio permanece sin cambio de color.

3. Prueba del indol:

La prueba de indol se realiza una vez que se ha determinado la movilidad y la prueba de ornitina.

- Resultado positivo: color rojo al agregar el reactivo revelador.
- Resultado negativo: el color del reactivo revelador permanece incoloro-amarillento.

Figura 19. Resultados prueba del Indol



VII. TALLER

1. Haga una tabla en la cual indique los resultados que arrojan los siguientes microorganismos según la prueba realizada en el laboratorio: *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter koseri* y *Enterobacter cloacae*.
2. Diga los resultados obtenidos en la práctica de laboratorio y esquematice con dibujos
3. Investigue como se realiza el color de calidad para esta prueba.

PRÁCTICA N° 16 PRUEBA DE LA CATALASA Y OXIDASA

I. INTRODUCCIÓN

Prueba de la catalasa. El peróxido de hidrógeno es el producto final del



metabolismo oxidativo de carbohidratos, a esta vía metabólica recibe el nombre de metabolismo aerobio-oxidativo. La acumulación del peróxido es muy tóxica por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus sp.* producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno.

Prueba de la oxidasa. Todas las bacterias aerobias obtienen su energía en forma de ATP a partir del proceso de respiración también llamado cadena respiratoria, este se lleva a cabo en la membrana celular bacteriana, En la respiración hay una secuencia de enzimas y transportadores que pasan los electrones desde sus sustratos hasta llegar al citocromo C, la enzima llamada **citocromo C oxidasa** le quita electrones al citocromo C, estos electrones son transferidos por la enzima al oxígeno siendo este el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, finalmente debido a que el oxígeno tiene un exceso de electrones puede atraer átomos de Hidrógeno formando dos posibles productos: Agua o peróxido de hidrógeno.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Observar las actividades catalasica y oxidasa de ciertas cepas bacterianas.

ESPECÍFICOS

Reconocer la presencia de la enzima catalasa al descomponerse el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua en la muestra analizada.

Detectar la presencia de la enzima oxidasa en la muestra analizada.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

La Catalasa es una enzima que se encuentra en la mayoría de las bacterias y cataliza la rotura del peróxido (agua oxigenada), liberando oxígeno libre. La



estructura de la enzima contiene anillos porfirínicos que es característica de los citocromos. La actividad de la catalasa es inhibida en medios con un pH ácido.

Prueba de oxidasa: Básicamente es la detección de la enzima oxidasa, muy útil en la identificación de bacterias Gram (-). La reacción de la oxidasa se debe a la presencia del sistema de citocromo-oxidasa, la cual activa citocromos reducidos por oxígeno molecular, por la transferencia de un aceptor al estado terminal del sistema de transferencia de electrones. El sistema de citocromos está generalmente presente en organismos aeróbicos. Un resultado positivo a la oxidasa consiste en una serie de reacciones en las cuales un componente auto-oxidable del sistema de citocromo es al final catalizado. Utilizando un tubo capilar con tetrametil-p-phenylendiamina al 1%, se adiciona una pequeña cantidad a un cultivo bacteriano colocado sobre un papel filtro y obtenemos las siguientes reacciones: una reacción positiva (presencia de oxidasa) se indica por la apariencia de un color púrpura oscuro en el papel, en menos de 10 segundos; al contrario, una reacción negativa, que consiste en una ausencia de color púrpura.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Caldo nutritivo.
- Agua oxigenada.
- Tirillas de Oxidasa.

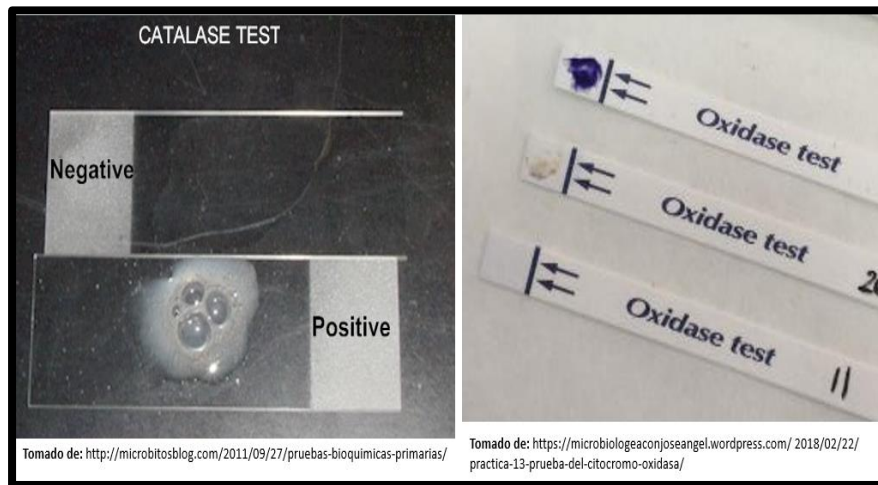
V. MUESTRAS

- Cepas de *Streptococcus sp.*
- Cepas de *Staphylococcus aureus.*
- Cepas de *E. coli.*

VI. PROCEDIMIENTO

1. Poner una pequeña porción de los cultivos crecidos en los tubos inclinados sobre dos portaobjetos.
2. Añadir unas gotas de H₂O₂ al 3%.
3. Con un objetivo de bajo aumento, enfoque la masa celular en los portaobjetos.
4. Examinar la reacción de la catalasa.

Figura 20. Resultados Pruebas de la Catalasa y la oxidasa



VII. TALLER

1. Enuncie 4 géneros bacterianos cuya actividad catalásica sea negativa y cuatro que sea positiva.
2. Mencione 2 ejemplos de microorganismos Oxidasa positiva y Oxidasa Negativa.
3. ¿Existen otros organismos en los reinos vegetal y animal que sean catalasa negativos?



PRÁCTICA N° 17 ROJO DE METILO Y VOGES PROSKAUER

I. INTRODUCCIÓN

Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de un microorganismo de fermentar la glucosa con producción de ácido por la vía ácido-mixta o con producción de un producto final neutro (acetoína) por la vía butanodiólica.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la formación de ácidos que se producen durante la fermentación de un carbohidrato.

ESPECÍFICOS

Realizar algunas pruebas bioquímicas en medios de cultivo con sustratos específicos que permitirán demostrar actividades metabólicas en bacterias de interés clínico.

Comprender la importancia de las pruebas bioquímicas para la caracterización e identificación de estos microorganismos.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Las enterobacterias son anaerobios facultativos que utilizarán la glucosa en dos fases: primero la metabolizarán aerobiamente (respiración oxibiótica) consumiendo rápidamente el oxígeno del medio, para luego, en segundo lugar, continuar metabolizándola por vía anaerobia (fermentación). Esta puede ser de dos tipos:

- **Fermentación ácido-mixta:** La realizan las bacterias del grupo de *E. coli* y los productos finales son ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético, láctico y

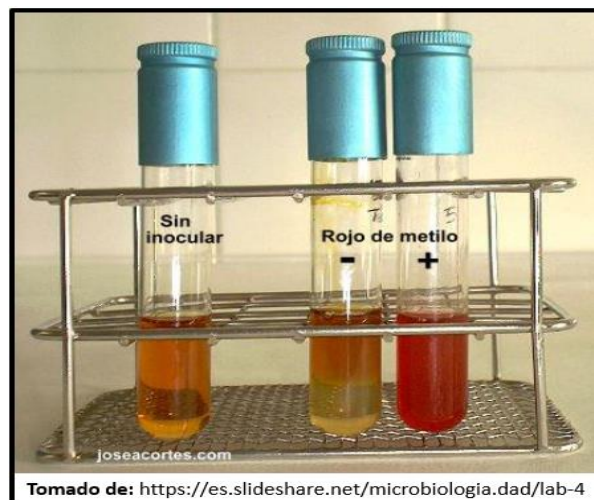
succínico) que provocan un fuerte descenso del pH inicial del medio. Puede detectarse por el viraje del indicador de rojo de metilo que permanece amarillo por encima de pH 5,1 y rojo por debajo de 4,4.

- **Fermentación butilén glicólica:** La realizan las bacterias del grupo Klebsiella-Enterobacter (antiguo aerógenes). Los productos finales son compuestos neutros como el butanodiol y el etanol, produciéndose acetoina como intermediario que podrá ser detectada añadiendo al medio KOH (reactivo A de Voges-Proskauer) y alfa-naftol (reactivo B de Voges-Proskauer) que reaccionarán con este compuesto produciendo un color rojo característico.

Para la realización de estas dos pruebas se cultiva el microorganismo en caldo RMVP (medio de Clark y Lubs) y se incuba a 30°C durante un periodo de 3 días como mínimo y 5 como máximo. Al revelar las pruebas, se separa el cultivo en dos porciones de unos 2,5ml que servirán para cada uno de los ensayos.

- **Rojo de Metilo:** A uno de los tubos se le añade unas gotas (4-5) de solución indicadora de Rojo de Metilo. Se agita para homogeneizar y se observa la coloración. Se considera positiva si vira al rojo y negativa si permanece amarillo.

Figura 21. Prueba del Rojo de Metilo y Voges Proskauer





IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Tubos con los medios de rojo de metilo.
- Mecheros.
- Incubadora.
- Asas.

V. MUESTRAS

- *Cepas de Escherichia coli.*
- *Cepas de Pseudomonas.*
- *Cepas de Salmonella.*
- *Cepas de Proteus.*

VI. PROCEDIMIENTO

Con un asa en punta, tomar la colonia y realizar siembra con ella hasta un tercio del fondo del medio y mezclar. Incubar a 37 °C por 24 horas.

VII. TALLER

1. Informe y sustente los resultados obtenidos en la práctica realizada.
2. Investigue que otros ejemplos de bacterias se pueden inocular en este medio para estudiar su metabolismo bacteriano.



PRÁCTICA Nº 18 ANTIBIOGRAMA.

I. INTRODUCCIÓN

El **antibiograma** es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones.

Se considera como antimicrobiano cualquier sustancia con capacidad de matar o al menos de inhibir el crecimiento de los microorganismos y que sea susceptible de utilización como tratamiento en los pacientes. Pueden ser naturales, sintéticos o semisintéticos (modificación química de un compuesto natural). La historia moderna de los antibióticos comienza con el descubrimiento de sustancias presentes en unos microorganismos capaces de matar a otros microorganismos. La utilización de antibióticos supuso un avance enorme en la esperanza de vida de las personas que padecían procesos infecciosos, aunque también supuso un aumento en los niveles de resistencia antibiótica.

II. OBJETIVOS

GENERAL

Determinar la sensibilidad de un microorganismo a antibióticos mediante un antibiograma.

ESPECÍFICOS

Realizar la lectura e interpretación del antibiograma.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

El antibiograma es un método de estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos (antibióticos y quimioterápicos) frente a los agentes infecciosos. Su finalidad es proporcionar información para la iniciación y marcha de la terapia antiinfecciosa. Con los resultados obtenidos, las bacterias se



pueden clasificar en: sensible, con sensibilidad intermedia y resistente. Los antibiogramas pueden ser de dos tipos: prueba cuantitativa y la prueba cualitativa.

La prueba cuantitativa permite determinar la Concentración Bactericida Mínima (CBM) y la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de un antibiótico frente a una cepa dada.

La prueba cualitativa o prueba de difusión en agar se conoce como la técnica de Kirby Bauer es la más utilizada en el laboratorio clínico por su facilidad y buena correlación con las técnicas cuantitativas.

IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Cajas con agar Mueller Hinton.
- Tubos con solución salina o caldo BHI.
- Sensidiscos.
- Escobillones.
- Asa bacteriológica.
- Pinzas.
- Estándar 0,5 Mc Farland.

V. PROCEDIMIENTO

1. Preparar el inóculo con una densidad de bacterias equivalente al 0,5 de Mac Farland, al suspender una colonia de bacteria en caldo BHI o en solución salina.
2. Una vez preparada la suspensión de bacterias, inocular el medio BHI por siembra masiva, con un escobillón impregnado con la suspensión bacteriana. Antes de realizar la siembra, se debe eliminar el exceso de suspensión en el escobillón, presionándolo suavemente sobre las paredes del tubo (ver figura).

3. Colocar los sensidiscos con ayuda de una pinza. Los discos se colocan separados unos 15 mm del borde de la caja y con una distancia de unos 15-30 mm entre ellos.
4. Se incuba a 35°C 18-24 horas o teniendo en cuenta las especificaciones del CLSI para cada tipo de bacteria.
5. Posterior a la incubación, se procede a medir el diámetro de los halos de inhibición y compararlos con las sensibilidades establecidas en la norma del CLSI.

VI. MUESTRA

- Cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Cepas de *E. coli*.

Figura 22. Siembra masiva para el antibiograma.

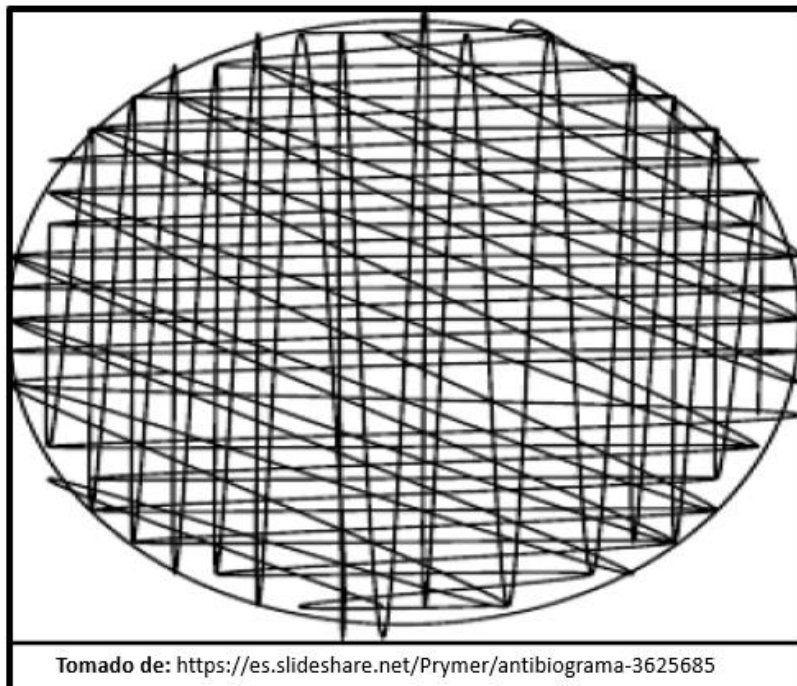


Figura 23. Antibiograma con sensidiscos

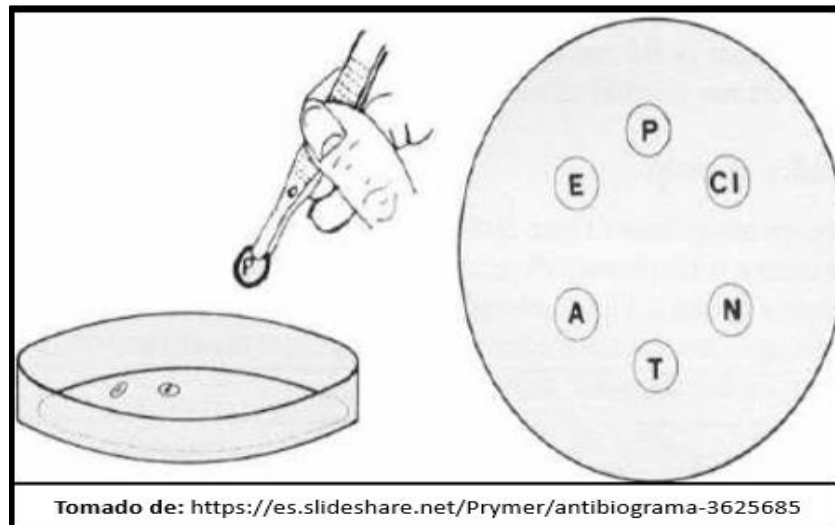
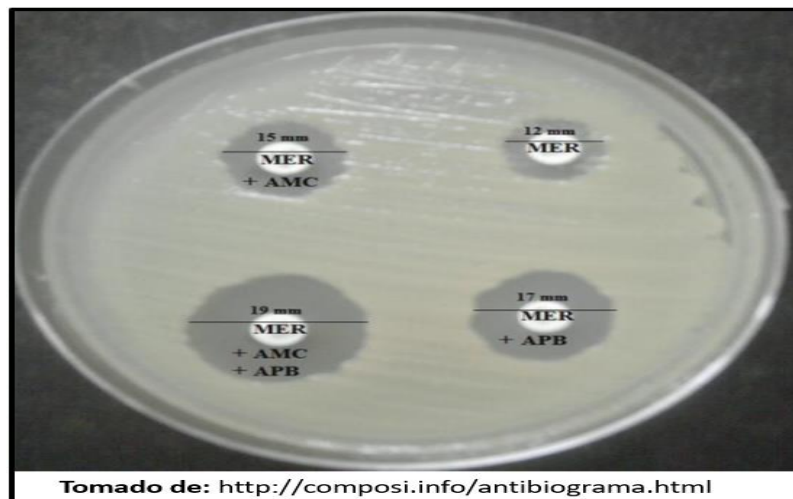


Figura 24. Medición del Halo de inhibición



VII. TALLER

1. Describa cómo se realiza la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).
2. ¿Qué es la escala de Mc Farland? ¿Qué significa suspensión equivalente a 0,5 Mc Farland?



PRÁCTICA Nº 19 MÉTODOS DE ESTERILIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE MATERIAL

I. INTRODUCCIÓN

Se denomina *esterilización* al proceso por el cual se obtiene un producto libre de microorganismos viables. El proceso de esterilización debe ser diseñado, validado y llevado a cabo para asegurar que es capaz de eliminar la carga microbiana del producto o un microorganismo más resistente.

Dado que la esterilidad no se puede demostrar de manera absoluta, sin causar la destrucción completa de todas las unidades del lote de producto terminado; se define la esterilidad en términos probabilísticos, en donde la probabilidad de que una unidad de producto esté contaminada es aceptablemente remota. Se considera que un producto crítico es estéril, cuando la probabilidad de que un microorganismo esté presente en forma activa o latente es igual o menor de 1 en 1.000.000

Comprende todos los procedimientos físicos, mecánicos y preferentemente químicos, que se emplean para destruir gérmenes patógenos.

II. OBJETIVOS

GENERALES

Aplicar los conocimientos en el manejo de los diferentes equipos de esterilización, así como los métodos de comprobación de la esterilización.

ESPECÍFICOS



Conocer las técnicas de esterilización más habitualmente utilizadas en un laboratorio de microbiología general y de metodologías de control de la esterilización.

III. FUNDAMENTO TEÓRICO

Proceso de esterilización. Esterilización es un proceso cuyo objetivo es destruir la contaminación microbiana de patógenos y no patógenos viables incluyendo las esporas.

Variables de esterilización:

- Variables en relación con el producto: biocarga, biorresistencia, bioestado, bioescudo y densidad o factores que afectan la penetración y evacuación de la sustancia.
- Variables en relación con el proceso: temperatura, humedad / hidratación, tiempo, pureza de las sustancias y el aire, saturación / penetración y capacidad del esterilizador.

Métodos de esterilización:

- Térmicos (físicos): vapor bajo presión / calor húmedo; aire caliente / calor seco; microondas / radiación no ionizante.
- Químicos: óxido de etileno gaseoso; formaldehído gaseoso; peróxido de hidrógeno plasmático / vapor; ozono gaseoso; solución activa de glutaraldehído; solución de ácido peracético.
- Radiaciones ionizantes (físico).

Ciclos de esterilización: es el tiempo que se requiere para alcanzar la esterilización y abarca:

- Calentamiento.
- Tiempo de muerte.
- Factor de seguridad para la biocarga.
- Evacuación o disipación de la sustancia.



IV. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

- Elementos de protección personal.
- Autoclave.
- Cajas de Petri.
- Pipetas de vidrio.
- Lápiz de cera.
- Balanza.
- Medios sólidos en polvo.
- Agua destilada.
- Papel de envolver.
- Espátula.
- Cinta control de autoclave.
- Estufa.
- Erlenmeyer.

V. MUESTRA

- No aplica.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Cortar el papel de envolver según indicación del profesor, dependiendo de material que se vaya a envolver.
2. A cada paquete envuelto, poner un pedazo de cinta de control de autoclave. Prender el autoclave y ponerlo a funcionar según sus indicaciones.
3. En la balanza pesar la cantidad de medio estipulado. Diluir con la cantidad de agua indicada. Llevarlo a la estufa para la dilución del medio hasta que hierva, luego retirar de la estufa y sellar muy bien el frasco en la forma en que el profesor lo indique.
4. Cuando el autoclave obtenga todas las condiciones para esterilización,



colocar todo el material que se quiera esterilizar hasta que termine el proceso de esterilización.

5. Retirar el material del autoclave y dejar refrescar.
6. Prender el mechero, desempacar las cajas de Petri y proceder a colocar el medio en las cajas flameando siempre la boca del Erlenmeyer; sin hablar.
7. Dejar enfriar y guardar en la nevera en forma invertida.

Nota: Las cajas de Petri se incuban con la tapa hacia abajo para evitar la contaminación.

VII. TALLER

1. ¿Por qué es necesario esterilizar el material que se va a utilizar en bacteriología?
2. ¿Por qué el agua para preparar los medios debe ser destilada?
3. Explica por qué en la preparación de materiales para esterilizar se utilizan papel Kraft y cinta reveladora de esterilización.



BIBLIOGRAFÍA

1. BROOKS, Geo. MORSE, Stephen. BUTEL, Janeth. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México. 25ª edición 2011.
2. CURTIS HELENA, SUE BARNES N., SCHNEK ADRIANA, FLORES GRACIELA. Biología. Editorial Médica Panamericana, 6ª. Edición, 2000.
3. DAVIS. Tratado de Microbiología. Edit. Salvat, 5ª. Edición. 2003.
4. DE LA ROSA, M. BRAVO, A., SAMPREDO, A. Microbiología en Ciencias de la Salud. Conceptos y Aplicaciones 2004.
5. JAWETZ ERNEST. Microbiología Médica. Editorial El Manual Moderno, 16ª. Edición. 2004.
6. JAWETZ, E., MELNICK, J. L., ADELBERG, E. A. Microbiología médica. Editorial El Manual Moderno S.A. de C.V. 20a Edición. 1998.
7. JOKLIK, W. K., WILLETT, H. P., AMOS, B. WILFERT, C. M. ZINSSER. Microbiología. Editorial Médica Panamericana. 20a Edición. 1995.
8. 8. Journal of Bacteriology. Disponible en: www.journals.asm.org
9. 9. Journal of Clinical Microbiology. Disponible en: www.journals.asm.org
10. 10. KARP GERALD. Biología Celular Y Molecular. Editorial McGraw Hill. Interamericana. 2004
11. KONEMAN, ALLEW, ROWELL, SOMMERS. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana, Nueva Edición. 2005
12. MADIGAN, M. T., BROCK, T. D. Microbiología. Prentice May Hispanoamericana. México. Sexta Edición. 2002
13. MATTAR, S., BERMUDEZ, A., VISBAL, J. Guía Terapéutica Antimicrobiana. Universidad de Córdoba, Montería. 2004.
14. PRIETO, Santiago. Manual de Laboratorio Clínico Básico. Bogotá. Editorial McGraw Hill. 2005.
15. Revista BIOMEDICA. Disponible en: www.ins.org.co



16. Revista ILADIBA. Disponible en: www.iladiba.com
17. Revista INFECTIO. Disponible en: www.acin.org.co
18. WALKER. S. Microbiología. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. 2003.
19. ZINSSER. Microbiología. Editorial Panamericana. 3ª. Edición. 2004.
20. Procedimientos en Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón 37. METODOS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA. 2010
21. Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards M02, M07, and M11. 28th Edition
22. CLSI Boletín de noticias Volumen 2, Número 1 junio 2017
23. CLSI, HALOS DE INHIBICION: ENERO 2016 M100S 26th ed.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

