

CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE MICROBIOLOGÍA

II SEMESTRE

Roberto González

Odontólogo Esp. En Ortopedia Maxilar

Magister en Microbiología Molecular

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Odontología





Corporación Universitaria Rafael Núñez.

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación

2020

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

Director programa de Odontología

Patricia Castro Villamizar

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Jonathan Harris Ricardo

Revisión y corrección de estilo

Raúl Padrón Villafañe

Jair Buelvas Caro

Autor

Roberto Gonzáles



TABLA DE CONTENIDO

	Págs.
PRESENTACIÓN	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE	7
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	8
PRÁCTICA NO. 1. MICROSCOPIO.	9
PRÁCTICA NO. 2. OBSERVACIÓN DE BACTERIAS DE LA SUPERFICIE DE LA MUCOSA (TINCIÓN SIMPLE)	18
PRÁCTICA NO. 3. TINCIÓN DE GRAM (TINCIÓN DIFERENCIAL)	23
PRÁCTICA NO. 4. COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN (ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE)	30
PRÁCTICA NO. 5. TINCIÓN NEGATIVA (TINCIÓN ESPECÍFICA)	34
PRÁCTICA NO. 6. MEDIOS DE CULTIVO	38
PRÁCTICA NO. 7. MANEJO DE AUTOCLAVE	41
PRÁCTICA NO. 8. SIEMBRA	44
PRÁCTICA NO. 9. ANTIBIOGRAMA	56
PRÁCTICA NO. 10. OBSERVACIÓN DE HONGOS	62
PRÁCTICA NO.11. MICROBIOLOGÍA DE LA CARIES	65
PRÁCTICA NO. 12. MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA	68
BIBLIOGRAFÍA	71



PRESENTACIÓN

La microbiología es la rama de la biología que estudia los microorganismos o microbios. Bajo esta denominación se incluyen seres de tamaño microscópico y organización muy simple, de estructura subcelular, unicelular o pluricelular, aunque en este último caso no forman tejidos diferenciados

La parte de la microbiología que tiene un carácter general se ocupa del análisis de la morfología, estructura, fisiología, genética, sensibilidad *in vitro* a diversos agentes, hábitat de los microorganismos, etc., mientras que la que tiene un carácter sistemático lo hace del estudio pormenorizado de los distintos grupos o taxones en los que se reúnen los microbios.

La microbiología oral, como parte de la microbiología médica y clínica, tendrá, tanto en los aspectos generales como sistemáticos, sus mismos contenidos, haciendo, como es lógico, hincapié en los microorganismos propios de la cavidad bucal y la respuesta de ésta frente a aquéllos (microbiología general y sistemática e inmunología microbiana orales). Igualmente, su estudio se extenderá a las relaciones que los microbios establecen entre sí y con los tejidos.

Los estudiantes de odontología deben conocer los distintos microorganismos presentes en cavidad oral, ya que estos son causantes de enfermedades orales, tales como la caries dental, la cual presenta una alta prevalencia a nivel mundial.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

1. Antes de realizar una práctica, debe leerse detenidamente para adquirir una idea clara de su objetivo, fundamento y técnica. Los resultados deben ser siempre anotados cuidadosamente apenas se conozcan.
2. El orden y la limpieza deben presidir todas las experiencias de laboratorio. En consecuencia, al terminar cada práctica se procederá a limpiar cuidadosamente el material que se ha utilizado.
3. Cada grupo de prácticas se responsabilizará de su zona de trabajo y de su material.
4. Antes de utilizar un compuesto hay que fijarse en la etiqueta para asegurarse de que es el que se necesita y de los posibles riesgos de su manipulación.
5. Todo el material, especialmente los aparatos delicados, como lupas y microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
6. No pipetear nunca con la boca. Se debe utilizar la bomba manual, una jeringuilla o artificio que se disponga en el Centro.
7. Las pipetas se cogerán de forma que sea el dedo índice el que tape su extremo superior para regular la caída de líquido.
8. Cuando se calientan a la llama tubos de ensayo que contienen líquidos debe evitarse la ebullición violenta por el peligro que existe de producir salpicaduras. El tubo de ensayo se acercará a la llama inclinado y procurando que ésta actúe sobre la mitad superior del contenido y, cuando se observe que se inicia la ebullición rápida, se retirará, acercándolo nuevamente a los pocos segundos y retirándolo otra vez al producirse una nueva ebullición, realizando así un calentamiento intermitente. En cualquier caso, se evitará dirigir la boca del tubo hacia la cara o hacia otra persona.
9. Los cubreobjetos y portaobjetos deben cogerse por los bordes para evitar que se engrasen.
10. Durante el desarrollo de la práctica utilice siempre su bata blanca.



11. Debe revisar su microscopio antes de empezar la práctica. Si detecta alguna anomalía avise inmediatamente al docente.
12. En el laboratorio se prohíbe comer, fumar, conversar en voz alta. Trabaje en silencio.



PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se va a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica no se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente, sino que también requerirá de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
3. Asegúrese de 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 y/o cajas de 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 después de la práctica. Recuerde que este equipo es fundamental para su trabajo. ¡Cuídelo!
11. Siempre tenga en cuenta las normas de bioseguridad.



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. Guantes desechables.
8. Mascarilla o tapabocas.
9. Gafas de protección.
10. Toalla pequeña.
11. Papel de arroz.
12. Asa bacteriológica.
13. Muestra solicitada.
14. Guías de laboratorio previamente estudiadas.



PRÁCTICA No1 EL MICROSCOPIO

I. INTRODUCCIÓN

El microscopio fue inventado por el tallador de vidrios Antón Van Leeuwenhoek (holandés) en el año 1608. Este, en las muestras que observó, describía muchos “animáculos”. Sin duda vio las formas más comunes de bacterias: cocos, bacilos, espiroquetas. Pero lamentablemente él hizo todo esto como un pasatiempo y nadie siguió su trabajo. Sin embargo, en 1678 Robert Hooke desarrolló el microscopio compuesto y confirmó los descubrimientos de Leeuwenhoek.

El microscopio se puede definir como un instrumento óptico que nos permite observar objetos pequeños que escapan a la percepción del ojo humano.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Describir las partes del microscopio
- ❖ manejar correctamente el microscopio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Manejar correctamente el microscopio.
- ❖ Señalar los componentes mecánicos y ópticos que constituyen el microscopio.

III. DESARROLLO

El microscopio es el instrumento más necesario para un microbiólogo, ya que permite la observación de organismos que no pueden ser apreciados en detalle a simple vista, es decir de los microorganismos. Existe una gran variedad de microscopios que, según la fuente de iluminación utilizada, se agrupan en:



- **Microscopios ópticos:** La fuente de iluminación es la luz.
 - a. De campo claro.** Permiten la observación de preparaciones, en su color natural o contrastadas mediante tinciones, resaltadas sobre un fondo más brillante.
 - b. De campo oscuro.** Permiten la observación de formas celulares que destacan brillantes sobre un fondo oscuro. Este efecto se consigue utilizando diafragmas especiales.
 - c. De contraste de fases.** Gracias a la utilización de diafragmas y objetivos especiales, que consiguen aumentar las diferencias en el índice de refracción de las células y el medio que las rodea, permiten la observación de células vivas, ya que no es necesario realizar ninguna tinción de las mismas.
 - d. De interferencia.** Permiten observar células vivas sin teñir, obteniéndose una imagen en relieve de las mismas.
 - e. De fluorescencia.** La fuente de iluminación proporciona luz ultravioleta que excita ciertas moléculas presentes en las células (bien de forma natural o añadidas a la preparación) que emiten fluorescencia en el espectro visible.
- **Microscopios electrónicos:** La fuente de iluminación es un chorro de electrones y las lentes son electroimanes.
 - a. De transmisión.** Permiten la observación de muestras teñidas con sustancias que son resistentes al paso de electrones y cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos. Los electrones no son visibles directamente por lo que éstos se envían a una pantalla que emite fluorescencia más o menos intensa según el número de electrones que inciden en ella. Las estructuras celulares que se tiñan más intensamente impedirán el paso de electrones y por lo tanto no permitirán la emisión de fluorescencia, por lo que estas estructuras aparecerán oscuras en un fondo más brillante. Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos.
 - b. De barrido.** Permiten la observación de células enteras, sin necesidad de cortes finos, de modo que aparecen los relieves originales y las superficies externas. Alcanzan entre 1.000 y 10.000 aumentos.

Durante las prácticas se empleará el microscopio óptico de campo claro, cuyos componentes fundamentales (mecánicos, de iluminación y ópticos) se muestran en la Figura 1. La capacidad de un microscopio para observar diferentes estructuras se refleja en el número de aumentos y en el límite de resolución (LR).



Figura 1. Fuente:

<https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/microscopio.html>

- **Microscopio simple**

Compuesto por lentes convergentes que producen imágenes virtuales derecha y aumentada. Este microscopio aumenta de 15-20 veces la imagen del objetivo observado.



- **Microscopio compuesto**

En él se combinan la amplificación de dos sistemas de lentes, ambos convergentes que se encuentran colocados en los extremos de un tubo.

- **OBJETIVO:** este lente se sitúa cerca del objeto que se observa.
- **OCULAR:** es o son los lentes del microscopio más próximos al observador.

Se pueden obtener aumentos de 50 a 1.000 veces según la combinación de lentes y longitud de onda utilizada en la iluminación, producen una imagen virtual e invertida.

Tiene dos partes:

1. **Parte mecánica.** Pie, columna, platina, tubo y revólver.

- **Pie:** es la base del microscopio, soporta peso y da estabilidad al microscopio. en él reposa la fuente luminosa.
- **Columna:** es un vástago perpendicular al pie, también llamada brazo, en la parte superior sustenta el tubo del microscopio.
- **Platina:** es una plataforma con un orificio central circular, sobre esta se coloca la preparación, que permite el paso de los rayos procedentes del foco situado por debajo de ella. Es paralela al pie y perpendicular a la columna a la cual va unida. Puede deslizarse a lo largo de la columna mediante un tornillo situado en ella llamado Macrométrico o de avance rápido. Existe otro tornillo más pequeño con un movimiento más lento: el micrométrico o de ajuste fino del enfoque. Tiene dos pinzas que retienen el portaobjetos. Tiene un sistema de cremallera guiado por dos tornillos de desplazamiento (carro) que permiten mover la preparación de delante hacia y en forma horizontal.



- **Tubo:** es una cámara oscura y está unida a la columna por medio de una cremallera en cuyo extremo superior están los oculares y en el inferior está ubicado el revólver.
- **Revólver:** pieza metálica en forma de casquete en donde están ubicados los diferentes objetivos.

2. Parte Óptica: Objetivos, oculares, aparato de iluminación.

- **Objetivos:** Sistema de lentes convergentes montados en un tubo metálico. Proporciona una imagen **real aumentada e invertida**. El aumento inicial del objeto es producido por el objetivo; la imagen se transite al ocular donde se realiza el aumento final, a mayor aumento mayor número de lentes forman el objetivo.

Este aumento está grabado en el tubo del objetivo: 10X = aumenta 10 veces

Según las condiciones de empleo y mecanismos de construcción los objetivos se clasifican en:

I. Objetivos a seco: no necesitan interponer ninguna sustancia entre el objetivo y la preparación. La preparación y el lente están separados por el aire.

- ❖ Objetivos de exploración: 3.5X o 4.5X
- ❖ Objetivos de bajo aumento: 10X

II. Objetivos de corrección: corrige el defecto que tienen los objetivos a seco empleando en la preparación un cubre objeto.

1. Objetivos de gran aumento: 40X

III. Objetivos de inmersión: son los que requieren que entre el lente frontal y la preparación se interponga un líquido transparente con un índice de refracción superior al del aire. Son los que producen mayores aumentos, pero la principal razón de su uso es la propiedad descubierta por Amici de que a igualdad de aumento son mucho más luminosos, pues el líquido interpuesto impide la desviación de los rayos más oblicuos y la lente frontal recoge así muchos más rayos



para la formación de la imagen. Se puede utilizar como sustancia de inmersión, agua, aceite y monobromuro de naftaleno.

- **Ocular:** consta de dos o más sistemas de lentes que se encuentran adaptados en el extremo superior del tubo del microscopio. Recoge la imagen del objetivo transformándola en una imagen **virtual, aumentada y derecha**. La lente que pega con el ojo humano: ocular, lente inferior – interna: recolectora o de campo; los oculares cubren una gama de aumentos que varía de 6 a 25X, las más usadas son de 10X.

Se obtiene mayor resultado con objetivos de gran aumento que con oculares de mayor aumento debido a que el poder de resolución reposa en el objetivo.

- **Sistema de iluminación:** La luz es producida por una lámpara halógena situada en la base del microscopio, seguidamente encontrarán el condensador y el diafragma o Iris que ayudan a regular la intensidad y la cantidad de luz respectivamente. Entre la fuente de luz y el condensador de algunos microscopios existe el portafiltros: ellos interceptan el haz de luz antes de que entre al condensador.

PODERES O CAPACIDAD DEL MICROSCOPIO

Se podría pensar que al emplear lentes adicionales se lograrían aumentos, pero en la formación de la imagen no solo es importante la ampliación, se requiere que la imagen sea nítida, para lo cual es necesario combinar los diferentes poderes del microscopio como son:

- I. Poder de aumento o ampliación**
- II. Poder de resolución o separación**
- III. Poder de definición**



I. Poder de aumento o ampliación

Permite magnificar la imagen. Es el poder de amplificar los objetos lo suficiente para que el ojo aprecie los detalles más finos con precisión e independientemente. Se indica colocando X después de un número.

10X 40X 110X Objetivos

5X 10X 15X Oculares

En el microscopio compuesto la ampliación es igual al proceso del aumento del objetivo por el aumento del ocular.

$$A \text{ Total} = A \text{ Objetivo} \times A \text{ Ocular}$$

II. Poder de resolución o separación

Es la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy próximos, el poder de resolución radica en el objetivo. Es la capacidad de distinguir los detalles finos.

❖ Límite de resolución

Es la distancia mínima a la que pueden estar situados dos puntos para su perfecta diferenciación.

Depende de la longitud de onda de la luz utilizada en la observación y de la apertura numérica del objetivo.

$$\text{❖ Poder de resolución} = \frac{\lambda}{2 \times \text{N.A}}$$

λ = Longitud de onda

2 = Constante

N.A = Apertura numérica



El poder de resolución es mayor cuanto menor es el límite de resolución.

III. Poder de definición

Permite formar imágenes claras con contornos definidos. Se está hablando principalmente de contraste y depende de la calidad del lente.

Los lentes tienen defectos que se llaman aberraciones esféricas y aberraciones cromáticas.

a) Aberración esférica

Es la imposibilidad de la lente de hacer coincidir todos los rayos en el foco.

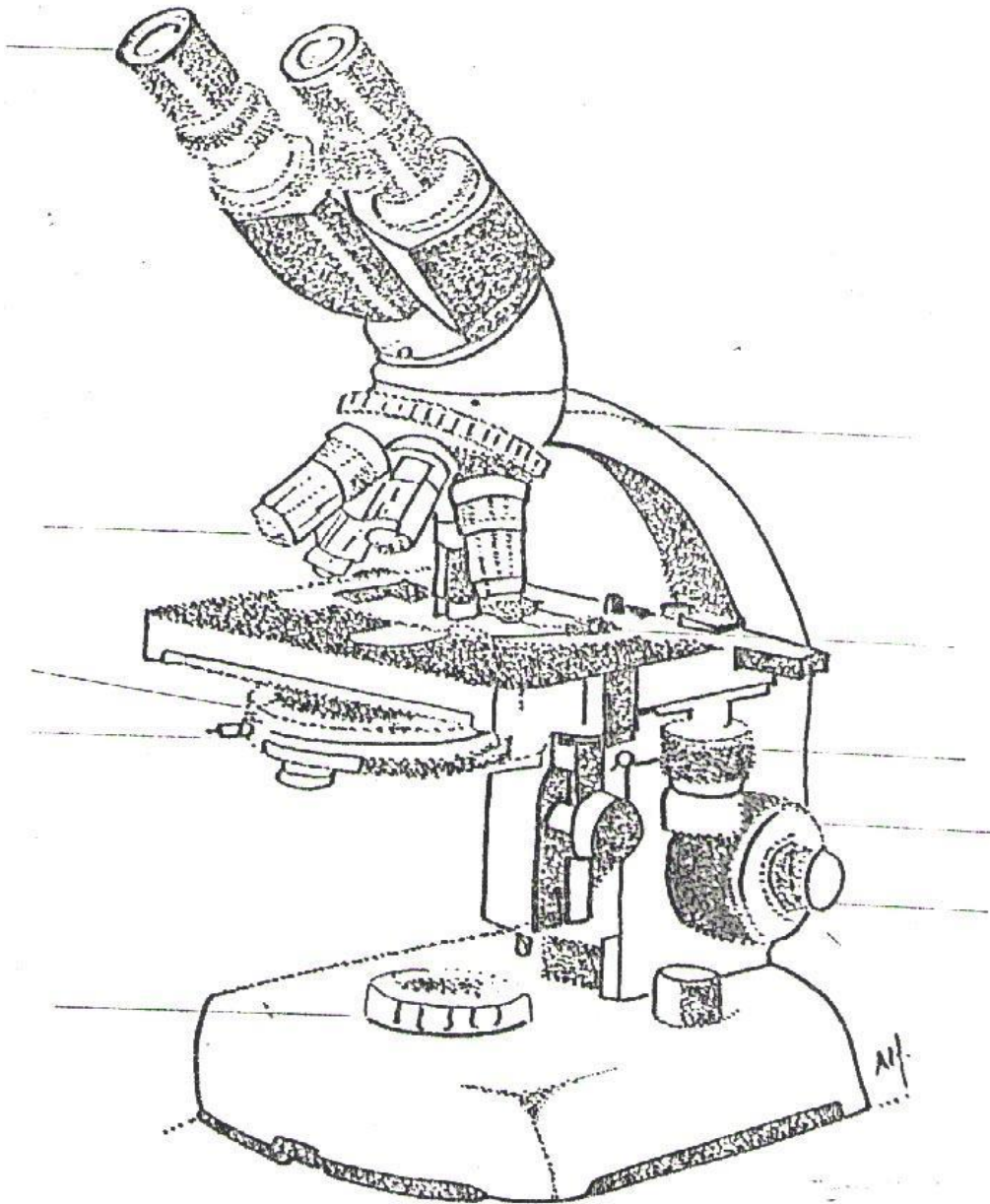
b) Aberración Cromática

Es el defecto de la lente que produce imágenes borrosas y coloreadas. Estas aberraciones son corregidas por el empleo de lentes y de mineral fluorítico.



TALLER

Identificación de las partes del microscopio.





PRÁCTICA No 2. OBSERVACIÓN DE BACTERIAS DE LA SUPERFICIE DE LA MUCOSA BUCAL (TINCIÓN SIMPLE)

I. INTRODUCCIÓN

En la cavidad oral existe un conglomerado de bacterias llamado placa dental bacteriana, la cual está formada por microorganismos adheridos entre sí, a las superficies dentarias, al epitelio y otras que permanecerán flotantes.

Las bacterias de la placa están mezcladas y rodeadas de un material extracelular abiótico.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer la morfología bacteriana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las bacterias según su forma.
- Diferenciar las células eucarióticas de las bacterias.
- Identificar los distintos tipos de tinciones simples.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Azul de metileno.
- Microscopio.
- Espátula.
- Cubreobjetos.
- Bajalenguas.
- Portaobjetos.



IV. PROCEDIMIENTO

1. Raspe la mucosa del carrillo suavemente con un bajalenguas.
2. Extienda la muestra en un portaobjetos y deje secar (frotis).
3. Fije la muestra con calor.
4. Deje refrescar a temperatura ambiente por un minuto.
5. Coloque una gota de azul de metileno por un minuto.
6. Lávelo por 3 segundos.
7. Escurra y seque la preparación.
8. Enfoque a 10x, 40x y 100x.

V. TALLER

1. ¿Qué diferencias existen entre las bacterias y las células eucarióticas?
2. Clasifique las bacterias según su forma y dibújelas.
3. ¿Cuáles son los métodos microscópicos para la observación de las bacterias?
4. ¿Cuáles son los tipos de tinciones empleados en microbiología? De ejemplos de cada una.

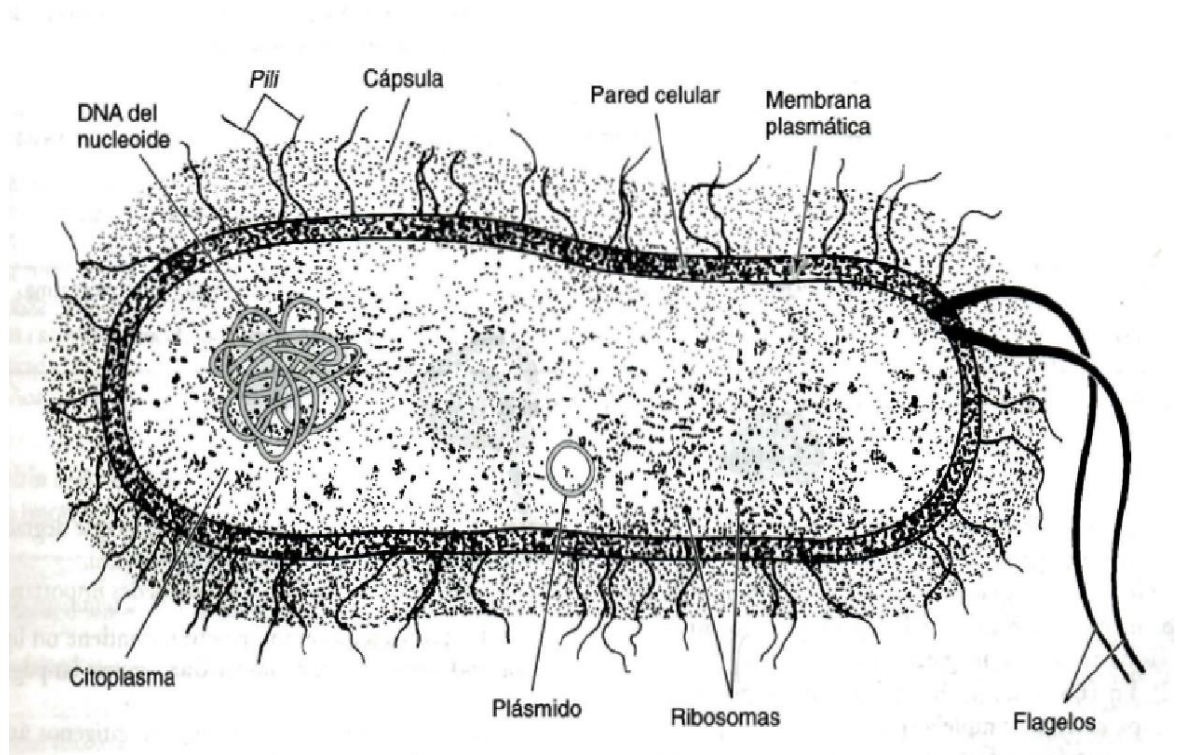
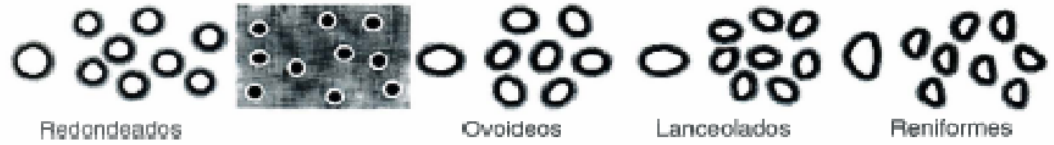


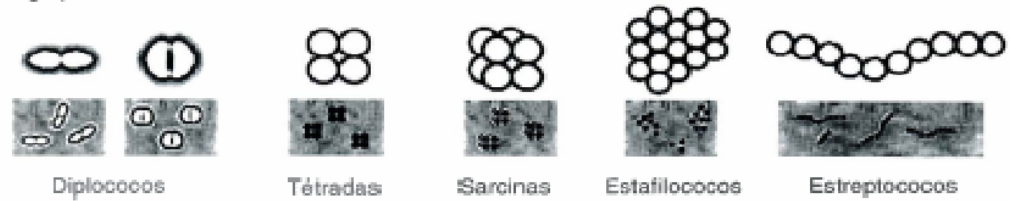
Imagen tomada de Microbiología oral. Liébana

A. Cocos

1. Individualizados



2. Agrupaciones



B. Bacilos

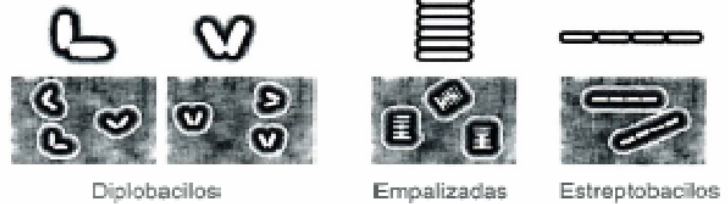
1. Individualizados



2. Extremos



3. Agrupaciones



C. Incurvados

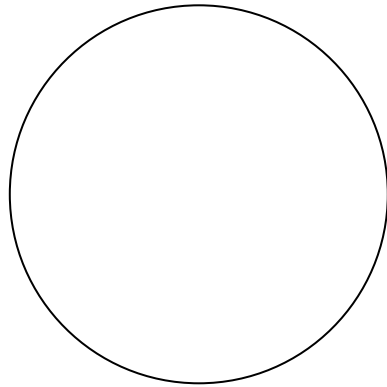


Imagen tomada de Microbiología oral. Liébana

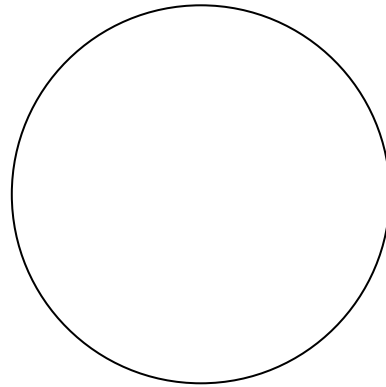


OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE BACTERIAS

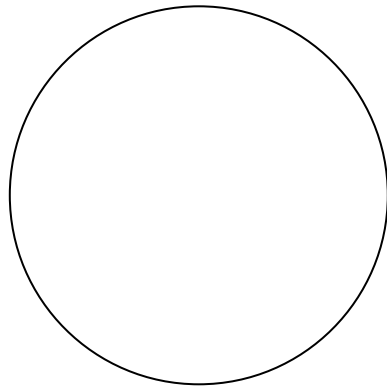
OBSERVACIONES



Aumento Total _____



Aumento Total _____



Aumento Total _____

CONCLUSIONES



PRÁCTICA Nº 3

TINCIÓN DE GRAM

(TINCIÓN DIFERENCIAL)

I. INTRODUCCIÓN

Antiguamente los biólogos habían dividido el mundo animal en dos reinos: Plantas y animales.

Con el desarrollo del microscopio se hizo evidente que algunos organismos no podían ser considerados como tales.

Ernest Haeckel, estableció la presencia de un tercer reino: El Protista.

En 1937 Edouard Chatton sugirió el término *procariótico* (significa antes del núcleo), para describir bacterias y el término *euariótico* (significa núcleo verdadero) para describir las demás células.

Con el desarrollo de la microscopía electrónica y las técnicas bioquímicas, se revelaron diferencias celulares básicas que inspiraron muchas propuestas de nuevas clasificaciones.

En 1969 R.H. Whittaker propuso la clasificación de cinco reinos que ha sido aceptada por la mayoría de los biólogos, sugiriendo la clasificación de los hongos en un reino aparte del reino Fungí, y no como parte del reino vegetal debido a que los hongos no son fotosintéticos y deben absorber nutrientes producidos por otros organismos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar la tinción de gram.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la morfología bacteriana.



- Identificar las bacterias Gram. positivas y Gram. negativas

III. FUNDAMENTO

Esta tinción fue desarrollada empíricamente por Christian Gram en 1884. A pesar del tiempo transcurrido, la tinción apenas se ha modificado y es uno de los primeros pasos que se realiza para cualquier identificación bacteriana. La técnica es capaz de diferenciar dos grandes grupos de eubacterias: Gram positivas (G+) y Gram negativas (G-).

La tinción de Gram requiere cuatro soluciones:

1. **Primer colorante:** es un colorante básico que, en contacto con las células cargadas negativamente, reacciona con ellas coloreándolas. El más utilizado es el cristal violeta.
2. **Solución mordiente:** fija las tinciones y aumenta la afinidad entre el colorante y las células. Los mordientes empleados suelen ser sales metálicas, ácidos o bases, como, por ejemplo, el Lugol.
3. **Agente decolorante:** es un disolvente orgánico, como, por ejemplo, alcohol-acetona (1:1).
4. **Colorante de contraste:** es un colorante básico de distinto color que el primer colorante, como, por ejemplo, la safranina o la fucsina.

Los dos grupos bacterianos que distingue esta técnica difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram+ se teñirán de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram- perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina. La diferencia está determinada por la composición de su envoltura celular. Las Gram+ poseen una malla de peptidoglicano en su parte más externa, mientras que las Gram-, recubriendo una fina capa de peptidoglicano, presentan una membrana externa que envuelve toda la célula.



Una de las precauciones al realizar esta tinción es la de trabajar con cultivos en fase exponencial. De lo contrario se pueden obtener resultados falsos. Por ejemplo, las bacterias Gram+ en fase estacionaria pueden aparecer como Gram-.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Aceite de inmersión.
- Coloración de Gram.
- Microscopio.
- Mechero.
- Portaobjetos.
- Palillo.

V. PROCEDIMIENTO

- Con un palillo de dientes retire un poco de sarro dental y prepare un extendido fino, deje secar al aire.
- Fije el material pasando el portaobjeto tres o cuatro veces por la lama del mechero, controlando la temperatura con el dorso de la mano.
- Agregue cristal violeta hasta cubrir la muestra y deje actuar el colorante por un minuto, lave la muestra con agua del chorro.
- Cubra la preparación con yodo de Gram. durante un minuto, lave suavemente.
- Agregue alcohol acetona cuando la preparación no desprenda más colorante, requiere diez segundos. Lave con agua.
- Cubra la preparación con fucsina básica o safranina durante un minuto, lave con agua y deje que escurra el exceso. Seque la muestra al aire libre.
- Examine con mayor aumento y con objetivo de inmersión.

Las bacterias se observan de color violeta y de color rosa.

Las violetas se llaman Gram. positivas.

Las rosadas se llaman Gram. negativas.

- ¿Qué estructuras u organelos diferencia?
- ¿Por qué las diferencias en el color de las bacterias?

¿Cuáles son las funciones de los diferentes componentes del colorante de Gram?

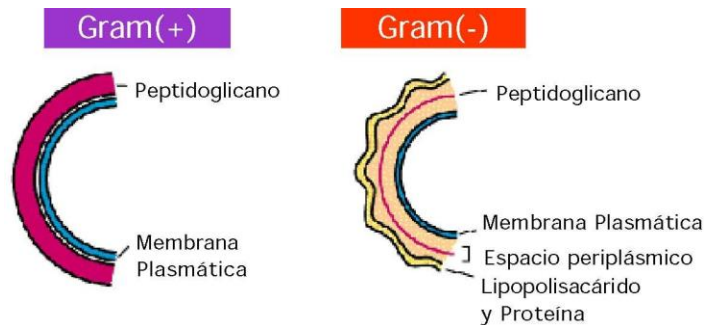


Imagen tomada de iquimicas.com

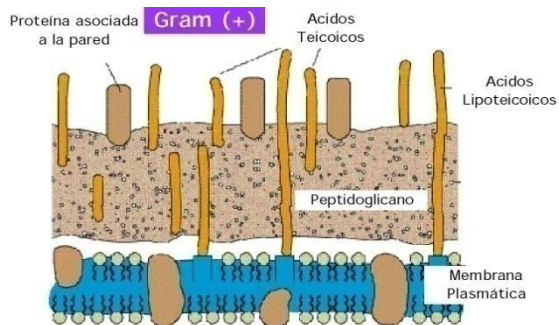


Imagen tomada de iquimicas.com

Staphylococcus aureus

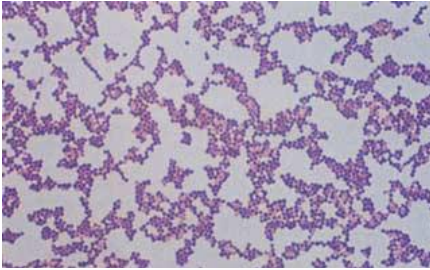


Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram +**
- **Morfología:** Coco.
- **Agrupaciones:** Racimos irregulares.
- **Antibiótico + eficaz:** Amoxicilina.
- Crece en Agar Manitol – Sal.

Enterococcus faecalis

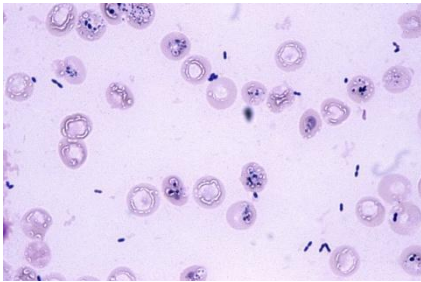


Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram +**
- **Morfología:** Coco.
- **Agrupaciones:** Cadenas.
- Ligeró crecimiento en Agar manitol sal.

Bacillus sp.

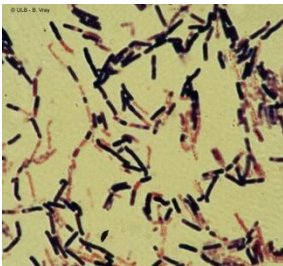


Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram +**
- **Morfología:** Bacilo grande esporulado.
- **Agrupaciones:** Cadenas.
- **Movilidad:** por vibración.
- **Antibiótico + eficaz:** Cloranfenicol.

Micrococcus luteus

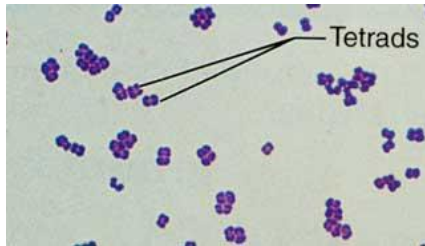


Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram +**
- **Morfología:** coco
- **Agrupaciones:** Tétradas
- **Movilidad:**
- **Antibiótico + eficaz:** Cefalexina
- Ligero crecimiento en Agar manitol sal

Escherichia coli

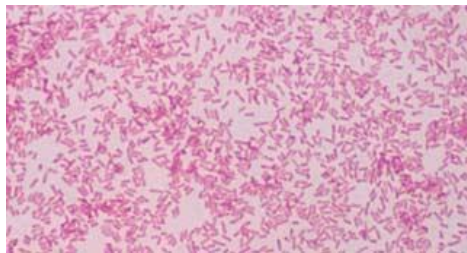


Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram –**
- **Morfología celular:** Bacilo pequeño no esporulado.
- **Agrupaciones:** Cadenas.
- **Movilidad:** Movimiento ondulante.
- **Antibiótico + eficaz:** Amoxicilina.
- Crece en Agar Entérico Ektoen □ Fermenta lactosa.

Serratia marcescens

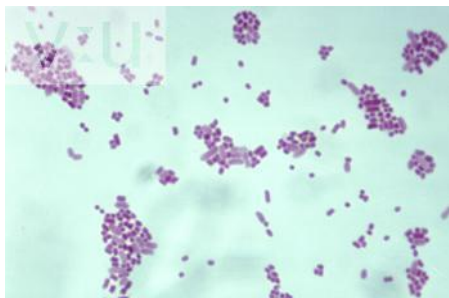


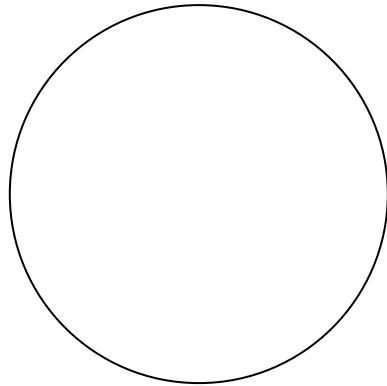
Imagen tomada de iquimicas.com

- **Gram –**
- **Morfología celular:** Bacilo pequeño no esporulado
- **Agrupaciones:**
- **Movilidad:**
- Crece en Agar Entérico Hektoen □ Fermenta Lactosa.
- Degrada Caseína, Tween-80 y DNA.

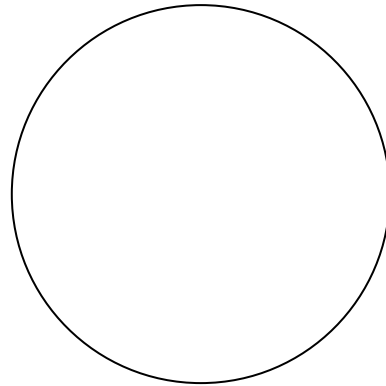


OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE BACTERIAS

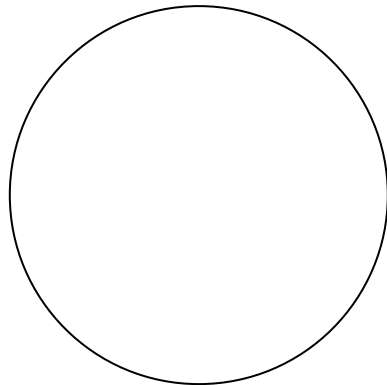
OBSERVACIONES



Aumento Total _____



Aumento Total _____



Aumento Total _____

CONCLUSIONES



PRÁCTICA No 4

COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN (ÁCIDO ALCOHOL RESISTENTE)

I. INTRODUCCIÓN

Tinción de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen). Se basa en que ciertos microorganismos no son desteñidos por una mezcla de ácido y alcohol si han sido previamente teñidos con fucsina fenicada. Se dice que son microorganismos ácido-alcohol resistentes. Una vez realizada la decoloración con esta mezcla se utiliza un colorante de contraste (el Azul de metileno) para poder observar las células sensibles a la decoloración por ácido-alcohol. Son microorganismos ácido-alcohol resistentes las **micobacterias**, por la específica composición de su pared celular, y **algunos actinomicetos**, como *Nocardia*. Algunos microorganismos patógenos son ácido-alcohol resistentes: *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculosis), *M. leprae* (lepra).

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar una coloración de Ziehl Neelsen.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar la morfología bacteriana.
- Identificar las bacterias ácido alcohol resistentes de las no ácido alcohol no resistentes.



III. PROCEDIMIENTO

- Extienda la muestra sobre un portaobjetos.
- Fije la muestra con calor.
- Coloque sobre la muestra Fucsina fenicada (con emisión de vapores durante 5 minutos).
- Lavar abundantemente con agua.
- Añadir ácido-alcohol y esperar 30 segundos.
- Lavar con agua.
- Añadir Azul de metileno (colorante de contraste) durante 1-2 minuto.
- Lavar con agua.
- Secar la muestra.
- Observar (x40, x100).

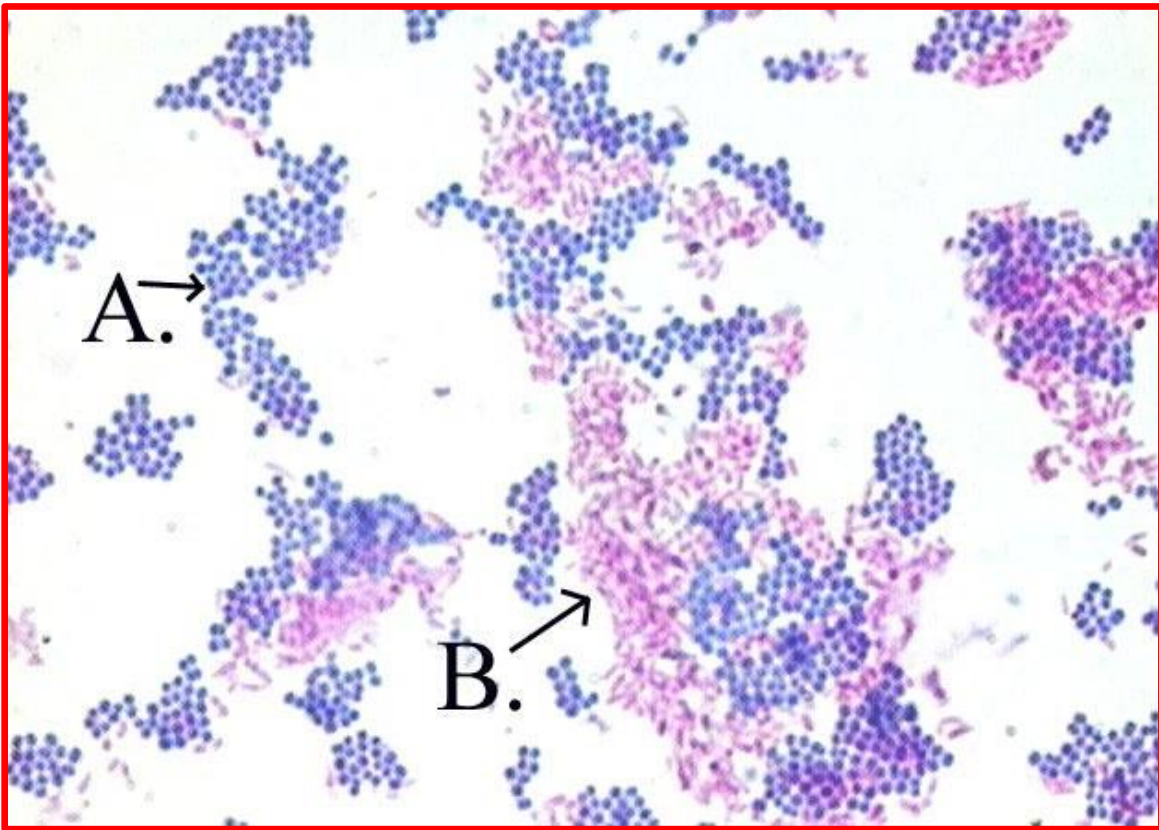


Imagen tomada de researchgate.com

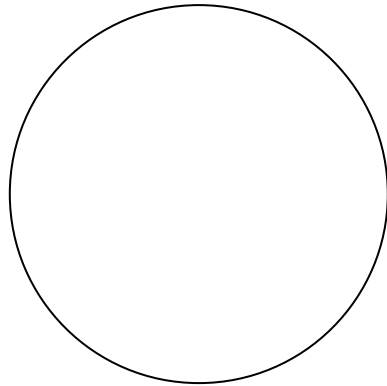
IV. TALLER

¿Cuáles son las bacterias ácido alcohol resistentes y ácido alcohol no resistentes?

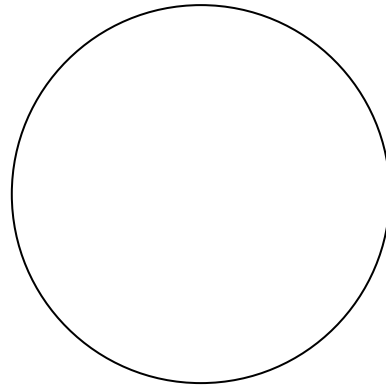


**OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE BACTERIAS CON
COLORACIÓN DE ZIEHL NEELSEN**

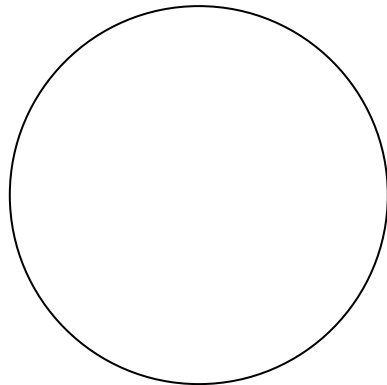
OBSERVACIONES



Aumento Total _____



Aumento Total _____



Aumento Total _____



PRÁCTICA No. 5

TINCIÓN NEGATIVA

(TINCIÓN ESPECÍFICA)

I. INTRODUCCIÓN

La tinción negativa es un método de coloración especial para destacar la presencia de la cápsula en algunos microorganismos principalmente *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Cryptococcus neoformans*, provenientes de muestras clínicas o de cultivos puros.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar una coloración con tinta china.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las bacterias capsuladas.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Aceite de inmersión.
- Tinta china.
- Microscopio.
- Mechero.
- Portaobjetos.
- Palillo.



IV. PROCEDIMIENTO

Material biológico a utilizar: *biofilm dental*.

Técnica A:

1. Aplique una gota de *tinta china* diluida en portaobjetos.
2. Cubra con portaobjetos.
3. Examine al microscopio.

Técnica B:

1. Coloque una gota de tinta china diluida sobre portaobjetos. Mezcle la muestra con el asa.
2. Deje secar al aire y fije brevemente con calor.
3. Coloree con *safranina* por 15 seg.
4. Lave y seque el frotis.
5. Examine al microscopio.

Resultado: Bacterias encapsuladas se ven con halo blanco sobre un fondo oscuro. Célula de la bacteria color rosado o rojo. (Figura 4.3)



BACTERIAS CAPSULADAS

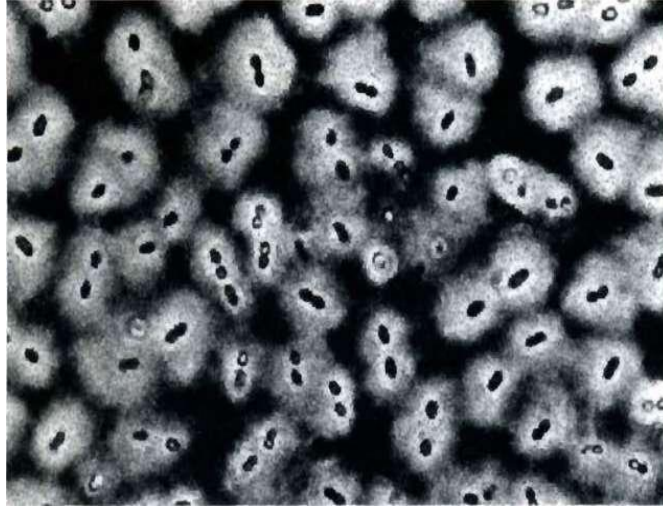
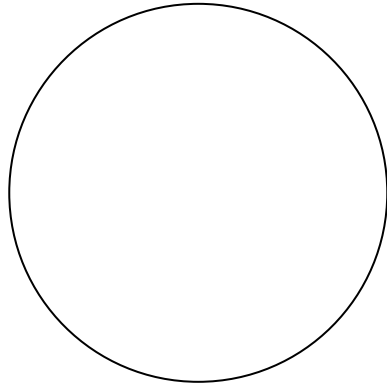


Imagen tomada de urg.es

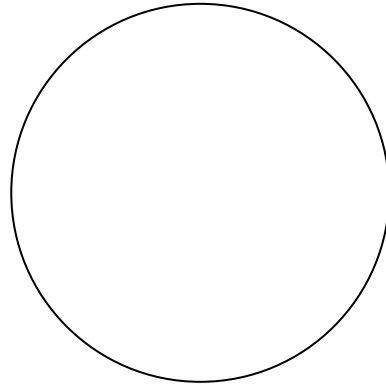


OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE BACTERIAS CON TINCIÓN NEGATIVA

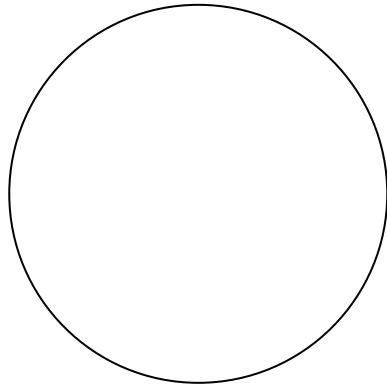
OBSERVACIONES



Aumento Total _____



Aumento Total _____



Aumento Total _____



PRÁCTICA No 6 MEDIOS DE CULTIVOS

I. INTRODUCCIÓN

Son preparados que intentan reproducir artificialmente las condiciones del hábitat natural de las bacterias, estos son preparados con elementos en cantidades precisas y equilibradas, que permiten el crecimiento y la multiplicación bacteriana (cultivo bacteriano). La inoculación de bacterias en un medio de cultivo se denomina siembra.

COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

- **Mc Conkey** su composición es: peptonas (20gr/l), lactosa (10gr/l), sales biliares (5gr/l), cloruro sódico (5gr/l) y rojo neutro (0.075gr/l).
- **Kliger**_su composición es: extracto de carne (3gr/l), extracto de levadura (3gr/l), peptonas (20gr/l), lactosa (10 gr/l), destrosa (1gr/l), cloruro sódico (5gr/l), citrato amónico y Fe²⁺ (0.50gr/l), rojo fenol (0.03gr/l) y agar (15gr/l).
- **Mueller-Hinton**_su composición es: peptonas (17.5gr/l), extracto de vaca (4gr/l), almidón (1.5gr/l), agar (15gr/l).
- **Agar nutritivo** su composición es: extracto de carne (1gr/l), extracto de levadura (2gr/l), peptonas (5gr/l), cloruro sódico (5gr/l) y agar (15gr/l).



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer los distintos medios de cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar los medios de cultivo según su composición.
- Diferenciar los medios de cultivo según su estado.
- Identificar las condiciones fisicoquímicas que afectan los cultivos.

III. MATERIALES Y EQUIPOS

- Placas de Petri.
- Polvos de los medios de cultivo.
- Balanza.
- Autoclave.
- Beaker.
- Pipeta.

IV. PROCEDIMIENTO

En la práctica elaboraremos agar nutritivo, Para elaborarlo primero pesamos 28gr de polvo y medimos 1 Litro de agua destilada y lo llevamos a ebullición. Luego esterilizamos en el autoclave durante 15 minutos a 121°C.

- Antes de disolver el medio, hemos calentado el agua y, luego, lo disolvemos poco a poco.



- Una vez disueltos se tienen que verter en un matraz Erlenmeyer que sea del doble de capacidad.
- Luego lo tapamos con papel de aluminio, y le pondremos la tira del autoclave (es como un esparadrapo que al llegar a 121°C cambia de color) y lo pondremos en el autoclave.
- Lo dejaremos en la autoclave entre 1 hora y media y 2 horas. Hemos de tener cuidado porque cuando lo saquemos de la autoclave aún estará caliente.
- Cuando la temperatura empiece a bajar de 45°C se empezará a solidificar, por eso lo tenemos que poner en las placas de petri o en los tubos antes de que se enfríe.
- Una vez en las placas lo dejamos enfriar.



PRÁCTICA No 7

MANEJO DEL AUTOCLAVE

I. INTRODUCCIÓN

Entre los requisitos para el trabajo con microorganismos están los cultivos y la técnica aséptica. Dadas la ubicuidad de los microorganismos y la existencia de endosporas termorresistentes, se han desarrollado varios procesos de esterilización, o sea de eliminación o destrucción de todo organismo vivo.

Así todo objeto esterilizado está libre de organismos viables capaces de reproducirse. La destrucción de endosporas termorresistentes se realiza a temperaturas mayores de 100°C, aplicada mediante vapor a alta presión, no alcanzables con el agua líquida.

La esterilización con vapor a presiones superiores a la atmosférica se logra en las autoclaves. Usualmente se utiliza para esterilizar medios de cultivo y soluciones a 121°C, 15 lb (1.2 atm) de presión por 15-30 minutos.

Esterilización por calor húmedo (vapor) y alta presión en el autoclave

1. Reconozca inicialmente las partes del autoclave.
2. Verifique el nivel de agua de la cámara de vapor. Este debe estar siempre por encima de la resistencia, y 1-2 cm por debajo de la parrilla.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Aprender el manejo de la autoclave.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar medios de cultivo y esterilizarlos.
- Aprender el manejo de la autoclave en odontología.

III. TALLER DE PREGUNTAS

- a) ¿Cuál es el mecanismo por el cual el vapor saturado a presión mata los microorganismos?
- b) ¿Cuáles son los métodos más corrientes utilizados para esterilizar?
- c) Ciertos organismos poseen la estructura biológica más termorresistente, para supervivencia ¿Cuál es y en qué organismos se encuentra?
- d) ¿Usualmente cómo se esterilizan las cajas de Petri?
- e) ¿Cómo se verificaría que un medio de cultivo procesado en el autoclave quedó realmente esterilizado?



DIBUJE LAS PARTES DE UN AUTOCLAVE





PRÁCTICA No 8 SIEMBRA

I. INTRODUCCIÓN

El trabajo con microorganismos no se realiza con células aisladas, sino con poblaciones extensas y homogéneas del microorganismo a estudiar, por lo que el microbiólogo utiliza técnicas que permiten obtener un cultivo puro, y luego cultivar a gran escala dicho microorganismo.

Para la siembra es importante: la **esterilización del material** de trabajo (asas de siembra, medios de cultivo, frascos de toma de muestras, etc.) y el mantenimiento de un **ambiente estéril** (mechero bunsen, campanas de flujo laminar) para la manipulación de microorganismos.

Para obtener colonias individualizadas se puede efectuar lo que se denomina una **siembra por agotamiento**. Para ello se toma un inóculo con un asa en forma de ojal y se extiende sobre la superficie del medio por diversos procedimientos, por ejemplo, mediante estrías que se continúan unas con otras o en forma de cuadrantes. Tras la incubación se podrá observar un conjunto de colonias que estarán más separadas unas de otras cuanto más lejos se encuentren de la primera zona. A partir de las colonias pueden seguirse sistemáticas muy variadas, pero todas ellas pretenden en definitiva demostrar que se investigan por separado cepas distintas, es decir obtener un **cultivo puro** teniendo en cuenta que el término cepa hace referencia a un clon que procede de una sola célula bacteriana perteneciente a una especie determinada. Para conseguir el fin último del diagnóstico directo (identificación de los microorganismos y estudio de la sensibilidad a los antibióticos) y otros secundarios (por ejemplo, **conservar las cepas** en estudio), cada colonia diferente se procesará por separado, bien directamente o bien tras su inoculación (repicado) en medios sólidos o líquidos a fin de incrementar la masa bacteriana y



simultáneamente se procederá a su **identificación**. Para esto último se podrá recurrir a la realización de **pruebas bioquímicas**, que detectan generalmente productos catabólicos, al estudio morfológico y por microscopía de las colonias y, a veces, a las características antigénicas, de forma excepcional, a técnicas cromatográficas o de biología molecular

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar una siembra bacteriana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las bacterias sembradas.
- Identificar bacterias de la placa dental.

III. PROCEDIMIENTO



ESTERILIZACIÓN DE ASAS DE SIEMBRA

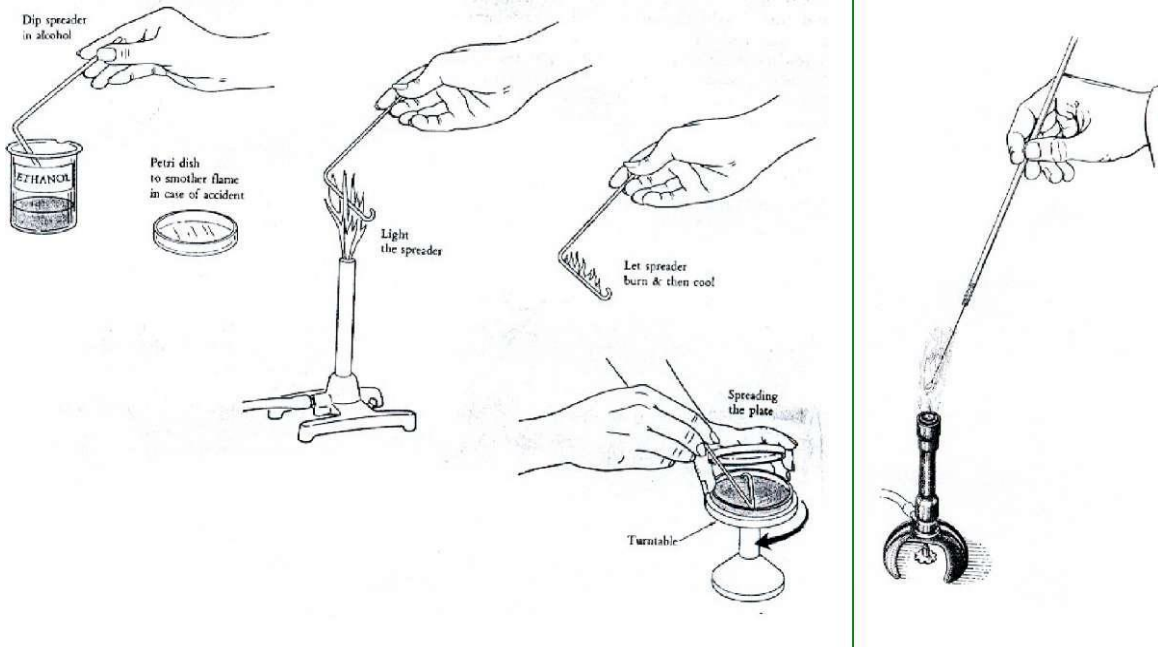


Imagen tomada de oocities.org

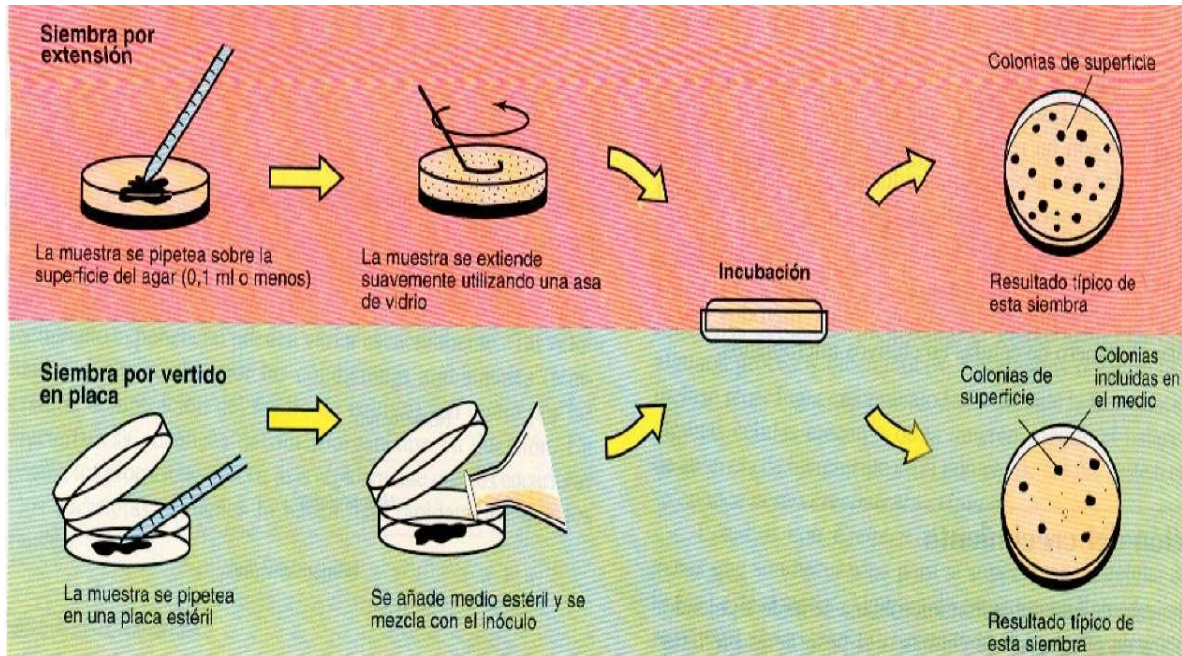


Imagen tomada de oocities.org

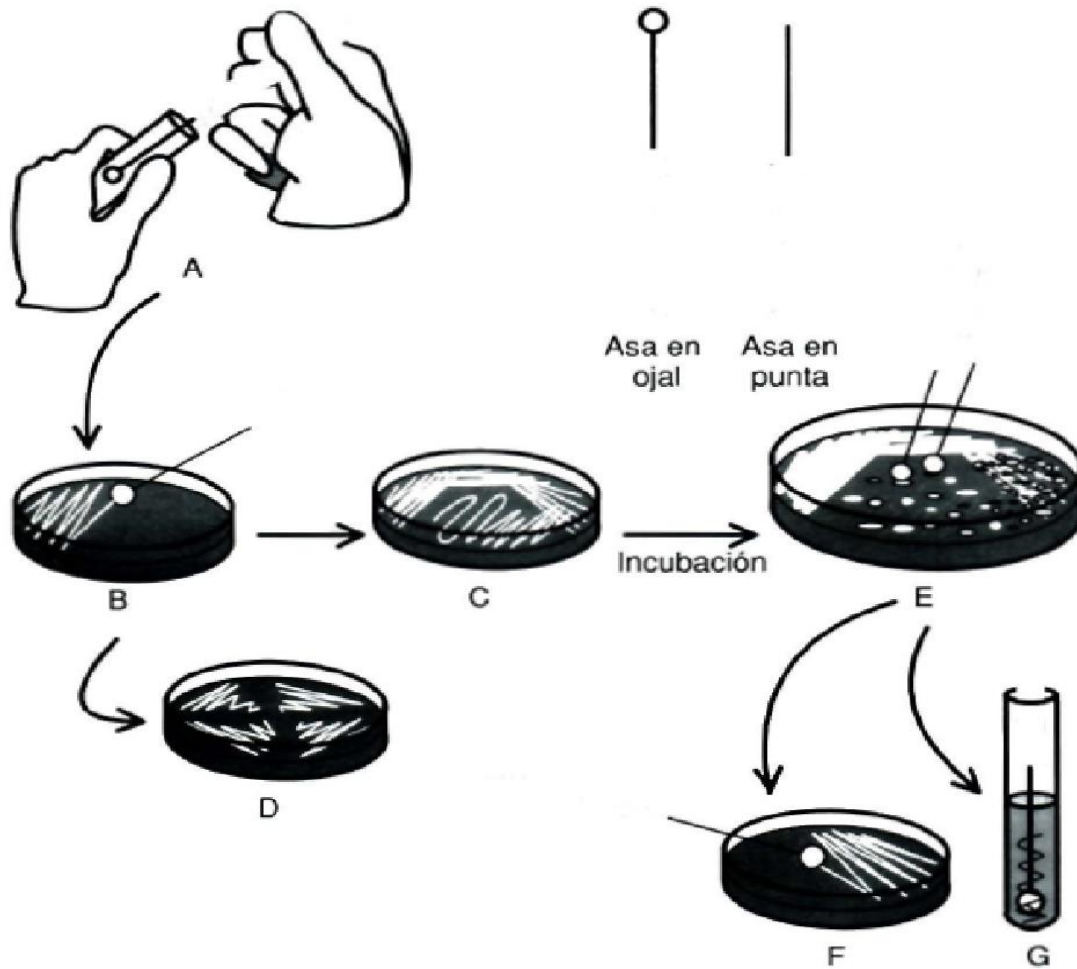


Imagen tomada de oocities.org

Obtención de un cultivo microbiano puro a partir de una muestra clínica.

- A.** Toma del inóculo de la muestra mediante un asa en ojal.
- B.** Siembra en medio sólido para aislamiento, que puede realizarse por las técnicas: en cinco estrías o en cuadrantes.
- C.** Tras la incubación, recogida de dos colonias diferentes para obtener un cultivo puro.
- D.** Inoculación en medios sólidos.
- E.** Inoculación en medios líquidos.



AISLAMIENTO Y RECUENTO BACTERIANO

TÉCNICAS DE AISLAMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CULTIVOS PUROS

A partir de un cultivo mixto, se pretende obtener un cultivo puro de bacterias, a través de la obtención de colonias aisladas. Cada colonia representa una población de microorganismos procedentes de una sola célula, a partir de la cual se posee la seguridad de obtener dicho cultivo puro de un solo tipo de microorganismo. Para ello se utilizan diferentes técnicas de aislamiento, basadas en diluir la muestra inicial para obtener colonias aisladas. Una vez que se ha obtenido un cultivo puro, se puede mantener haciendo resiembras en tubos de agar inclinado o bien congelando las células en glicerol (10-30%) a -70°C , en Nitrógeno líquido a -173°C , o mediante liofilización.

- **Agotamiento:** para obtener colonias aisladas por la técnica del agotamiento la muestra se extiende sobre la superficie según se indica en la figura, de forma que al final de dicha siembra "por agotamiento", la cantidad de inóculo se espera sea lo suficientemente bajo como para que se depositen células aisladas y distanciadas en la superficie del agar a partir de las cuales surjan, tras incubar, colonias aisladas.
- **Estrías escocesas.** Se procede de forma similar al caso anterior, en lo que se respecta al método general para la siembra en placa y permite también obtener colonias aisladas.

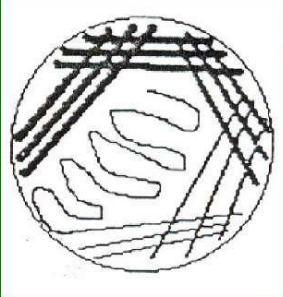
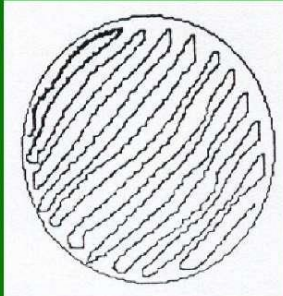

<p>(1)</p>	<p>(2)</p>	<p>ESTRÍAS ESCOCESAS</p>  <p>ESTRÍAS POR AGOTAMIENTO</p> 
<p>(3)</p>	<p>(4)</p>	
<p>↓</p>		

Imagen tomada de oocities.org

- **Técnica de aislamiento y recuento. Banco de diluciones.** técnica que consiste en obtener una suspensión de la mezcla de microorganismos y



hacer diluciones seriadas que se vierten en una placa Petri hasta conseguir colonias aisladas.

Instrucciones: se debe trabajar, como siempre, en condiciones estériles, flameando la boca de los tubos antes y después de introducir la pipeta, en las proximidades del mechero.

Mediante una pipeta estéril, tomar una muestra del cultivo mixto, y depositar 1ml en el primer tubo con 9ml de suero fisiológico (o en nuestro caso: 0,5ml en 4,5ml respectivamente) (dilución 10^{-1}).

Agitar hasta conseguir una suspensión homogénea.

Tomar otra pipeta estéril, y transferir de esta primera dilución 0,1ml al siguiente tubo con 10ml de suero fisiológico (10^{-2}), y así sucesivamente.

A partir del tubo con dilución 10^{-2} y 10^{-4} , con una pipeta estéril, inocular 0,1ml en placa AN extendiendo la muestra sobre la superficie con el asa de vidrio, la cual se debe esterilizar mediante su introducción en alcohol y posterior flameado, por lo que se pasa el asa impregnada en alcohol por el mechero y se deja consumir el alcohol completamente.

Tras incubar se podrán obtener colonias aisladas. El recuento de estas colonias permitirá conocer el número de células existentes en el cultivo original.

Figura 6: Diluciones seriadas

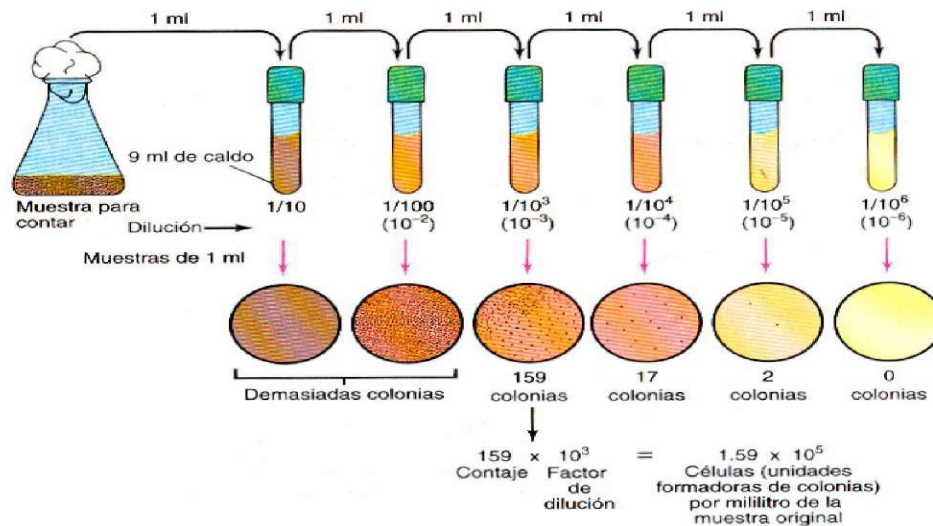


Imagen tomada de sgpwe.izt.uam.mx

$$C_i = N \times D \times 10$$

C_i = Concentración inicial (unidades: **número de células / ml**)
 N = n° de colonias
 D = dilución

MÉTODOS DE RECUENTO Y MEDIDA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

- **Contaje directo en cámara de recuentos:** se basa en el recuento directo del número de células en un volumen determinado, prefijado en la cámara de recuento, mediante su observación al microscopio. El método no permite distinguir entre células viables y no viables.

Ejemplo de cámara de recuento

Figura 8.8 Recuento microscópico directo. La cámara de recuento de Petroff-Hauser se usa, junto a un microscopio, para realizar un recuento directo de células. Consta de un porta que tiene unos pocillos superficiales (de 0,02 mm de profundidad). En el fondo del porta hay grabada una rejilla de 1 mm², dividida en 25 cuadrados grandes, cada uno de los cuales está dividido en 16 cuadrados más pequeños. De esta manera, el volumen total de la rejilla es de 0,02 (un quinceavo) mm³, y cada cuadrado grande es un veinticincoavo de esta cantidad.

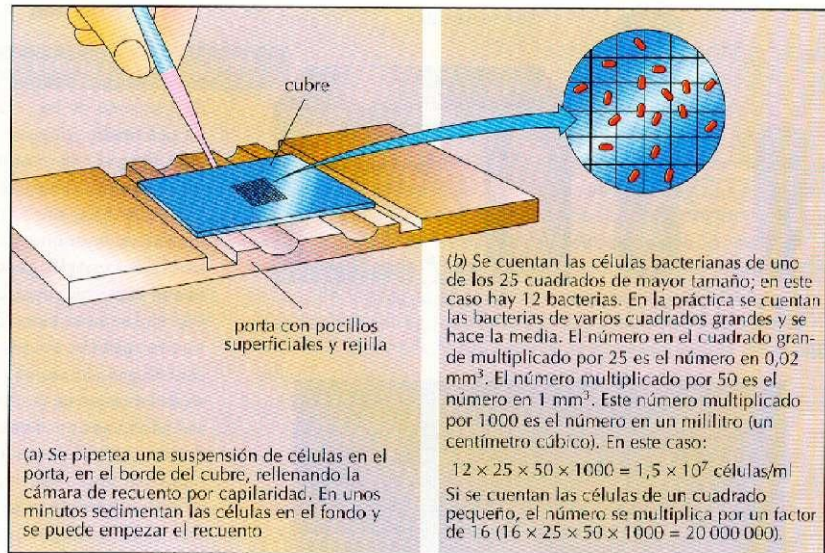


Imagen tomada de sgpwe.izt.uam.mx

- **Medición de la densidad óptica en el espectrofotómetro:** se trata del método más habitual para el seguimiento del crecimiento de un cultivo bacteriano. La medición de alícuotas o muestras del cultivo a lo largo del tiempo, permite desarrollar curvas de crecimiento de la población bacteriana. Ello permitirá, a su vez, la comparación de tasas de crecimiento en diferentes condiciones, el establecimiento de las condiciones óptimas, etc.

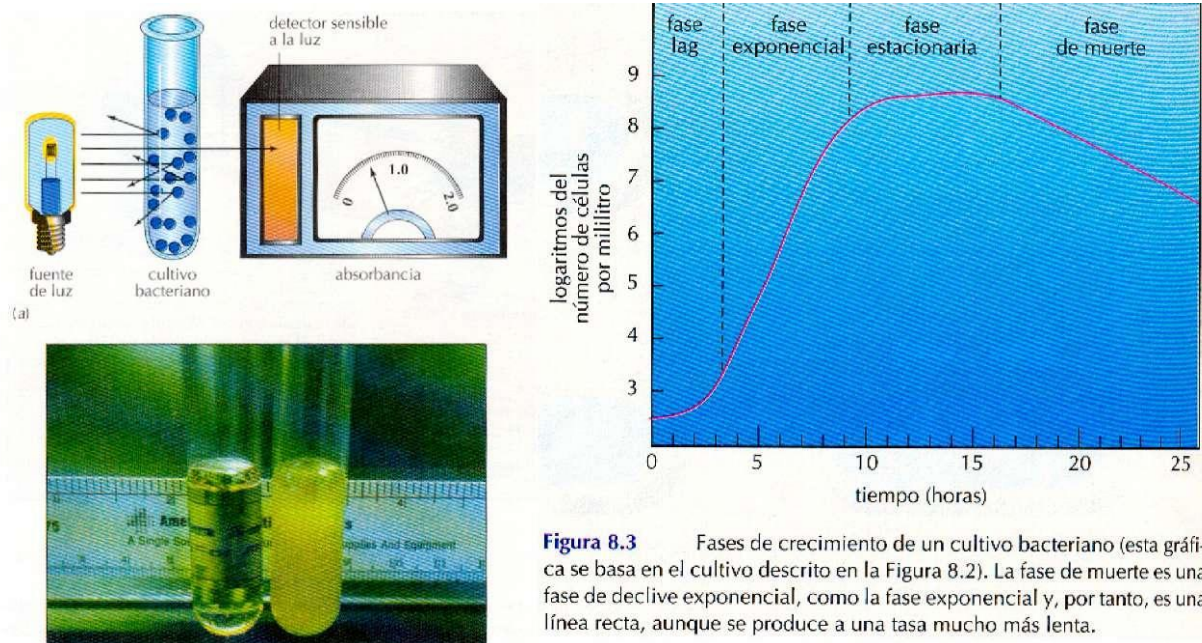


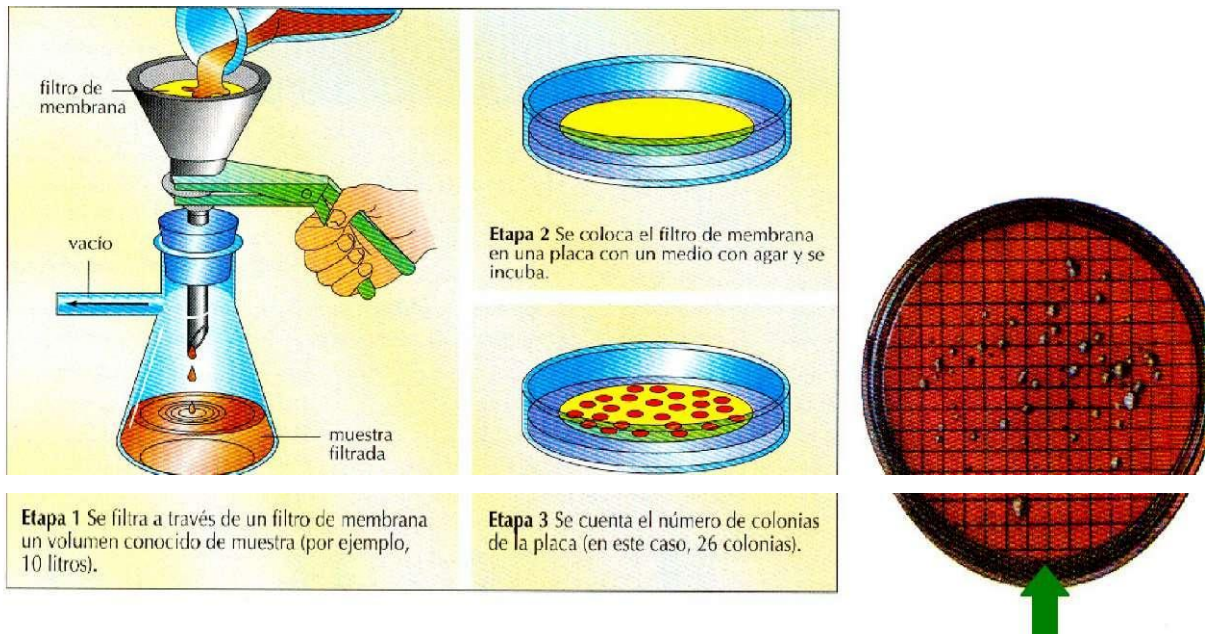
Imagen tomada de sgpwe.izt.uam.mx

El incremento en el número de células es lento al principio y después llega a ser de forma exponencial. La gráfica anterior es característica de un cultivo en un recipiente cerrado en el que los nutrientes son limitados. En la curva se distinguen:

1. **Fase de latencia.** Fase de adaptación de las células a las nuevas condiciones del medio de incubación al que han sido transferidas. Las células no crecen inmediatamente sino después de este tiempo de latencia. Las células son metabólicamente activas, se adaptan al medio y eventualmente lo modifican. Para un mismo inóculo, esta fase de latencia varía dependiendo del medio al que se transfieren y de las condiciones de incubación.
2. **Fase de crecimiento exponencial.** Fase en la que las células se están dividiendo regularmente a ritmo constante. En condiciones apropiadas durante esta fase, el grado de desarrollo es máximo. Es en este periodo donde puede calcularse el tiempo de generación de un microorganismo.
3. **Fase estacionaria.** El n° de células no se incrementa más porque los nutrientes del medio se van agotando y posibles sustancias tóxicas pueden ir acumulándose.

No hay incremento neto del n° de células, el n° de células que se originan es igual al n° de las que mueren.

- **Recuento de viables:** se determina el número de células capaces de generar colonias sobre la superficie de un medio sólido. En la práctica habitual se considera que el número de colonias en una placa debe oscilar entre 30 y 3000, con objeto de que la muestra sea estadísticamente representativa, y evitando que aparezca crecimiento confluyente.



Recuento de viables

Mediante la realización de diluciones, en caso de muestras concentradas o mediante técnicas de filtración, de volúmenes determinados, y posterior incubación del filtro en que han quedado retenidos los microorganismos sobre la superficie de medios sólidos. Ello permite el uso de medios selectivos para el aislamiento y cuantificación de determinados grupos de microorganismos.



PRÁCTICA No 9

ANTIBIOGRAMA

I. INTRODUCCIÓN

Los **antibióticos** son compuestos orgánicos de bajo peso molecular sintetizados por microorganismos, que a bajas concentraciones inhiben el desarrollo o matan a otros microorganismos.

CARACTERÍSTICAS GENERALES

1. Inhiben el crecimiento (bacteriostáticos) o matan (bactericidas).
2. Son efectivos a bajas concentraciones.
3. Poseen toxicidad selectiva: actúan sobre el patógeno sin afectar al organismo hospedador.
4. Pueden actuar frente a procariontas o eucariotas.
5. Pueden ser de acción muy específica o de amplio espectro.
6. Solubles en agua.
7. Poseen estabilidad química.
8. Son productos del metabolismo secundario.

Es importante tener en cuenta la posibilidad de aparición de resistencia a determinados antibióticos en algunos microorganismos durante el tratamiento de una infección.

MICROORGANISMOS PRODUCTORES

Se encuentran tanto dentro del grupo de procariontas como en el de eucariotas.

Procariontas: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Nocardia* **Eucariotas:** *Penicillium*,
Aspergillus, *Cephalosporium*

CLASIFICACIÓN

Hay muy diversas clasificaciones:

Según su **origen:**



- Naturales: sintetizados por microorganismos.
- Sintéticos: obtenidos completamente por síntesis química.
- Semisintéticos: parte de compuesto sintetizada por microorganismos y otra parte sintetizada químicamente. Según su **estructura química**
- B-lactámicos: penicilinas, cefalosporinas.
- Macrólidos: eritromicina.
- Aminoglucósidos: estreptomicina.
- Polipeptídicos: bacitracina.
- Poliénicos: anfotericina B
- Tetraciclinas.
- Derivados del benceno: cloranfenicol.

Según su mecanismo de acción:

- Actúan sobre la pared celular bacteriana inhibiendo su síntesis: penicilinas.
- Actúan sobre la membrana celular alterando su permeabilidad.
- Inhiben la síntesis proteica.
- Inhiben la síntesis de ácidos nucleicos: mitomicina.

Los antibióticos en general pueden ser de amplio espectro o de espectro reducido, estos últimos van a matar gérmenes más específicamente. Dependiendo del origen o localización de la infección, se va a utilizar uno u otro. Por ejemplo, en una infección de garganta no se debería utilizar uno de amplio espectro ya que mataría también a la microbiota tan importante para nosotros.

El antibiograma consiste en el estudio de la sensibilidad o resistencia de determinado microorganismo (o grupo de ellos) a varios antibióticos. Se puede utilizar para tratar un patógeno, añadir a alimentos, en definitiva, para saber cómo se comporta un germen frente a determinado antibiótico.



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Realizar un antibiograma.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprender el fundamento del antibiograma, preparación y posibles fuentes de error en su realización.
- Realizar una buena elección del antimicrobiano para el posterior tratamiento de infecciones.

III. PROCEDIMIENTO

El antibiograma se puede hacer tanto en medio líquido como en medio sólido. En nuestro caso vamos a utilizar un agar ordinario, pero modificado, de manera que gérmenes y antibióticos puedan difundir correctamente, agar de Mueller-Hinton.

Se utilizan para poner los antibióticos, unos discos impregnados que llevan unas letras que nos indican el antibiótico del que se trata y un número que indica la concentración en mg/ml que tenía la disolución en la que se impregnaron. Por ejemplo, el Cloranfenicol a concentración 30mg/ml

Además, utilizamos unas pinzas para poner los discos sobre el agar. Pipetas estériles para sembrar la placa. Un hisopo estéril para extender por la superficie el inóculo. Y asa de siembra y mechero para esterilizar.

Partimos de un cultivo puro de 48 horas. La cepa es potencialmente patógena de humano y como crece en nuestro cuerpo, la incubación se ha hecho a 37°C. Vamos a sembrar 0.5ml que cogemos con la pipeta (agitando para resuspender las células del fondo) y lo vertemos sobre la placa. Con el hisopo estéril extendemos bien el inóculo por toda la superficie de la placa. Con las pinzas cogemos los cuatro discos de antibióticos y los ponemos en la placa bien separados entre sí y de los bordes.



La placa se pone a incubar 48 horas a 37°C y en posición invertida. Tras la incubación va a aparecer toda la superficie llena de colonias y alrededor de cada disco aparecerá o no un halo de inhibición dependiendo de que el germen sea sensible a ese antibiótico.

El tamaño del halo nos va a permitir conocer el grado de sensibilidad al antibiótico o si es resistente. Puede aparecer un pequeño halo aun siendo resistente, esto se debe a la alta concentración de antibiótico en el medio inmediato al disco.

Resultados, los antibióticos utilizados han sido:

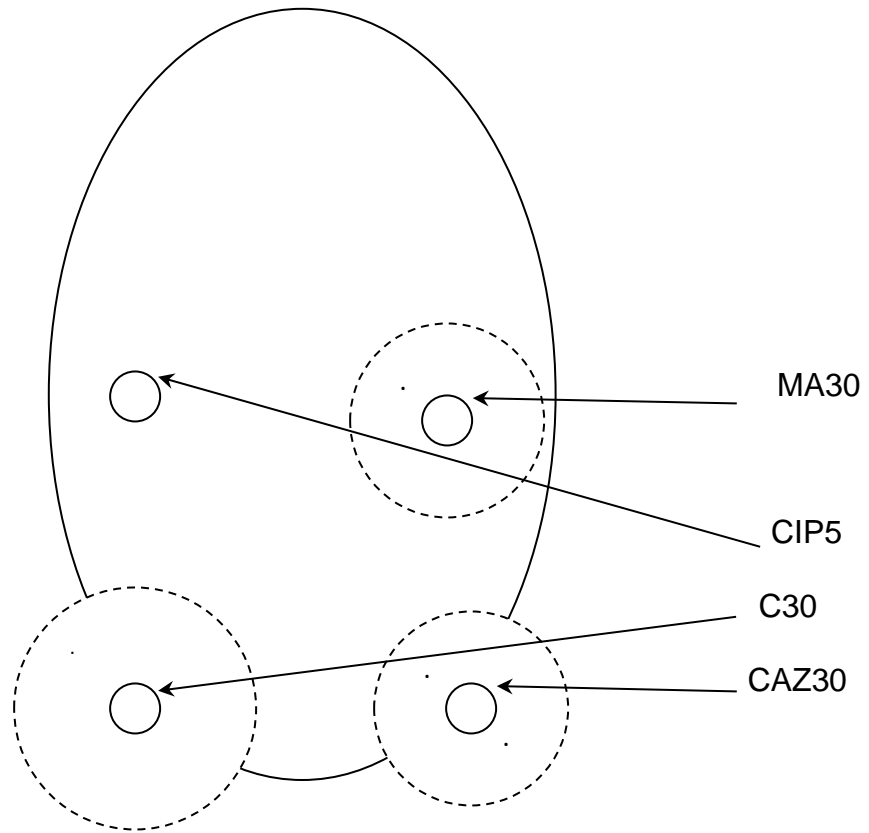
C30: Cloranfenicol 30mg/ml Halo >> 19cm, alta sensibilidad.

MA30: Cefamandoles 30mg/ml > 19cm, alta sensibilidad.

CAZ30: Ceftadina 30mg/ml > 19cm, alta sensibilidad.

CIP5: Ciprofloxacín 5mg/ml Resistente, aparece un halo muy pequeño que no es significativo.

Puede aparecer alguna colonia dentro de los halos, esto se debe a mutaciones espontáneas que hacen a algunas bacterias resistentes.



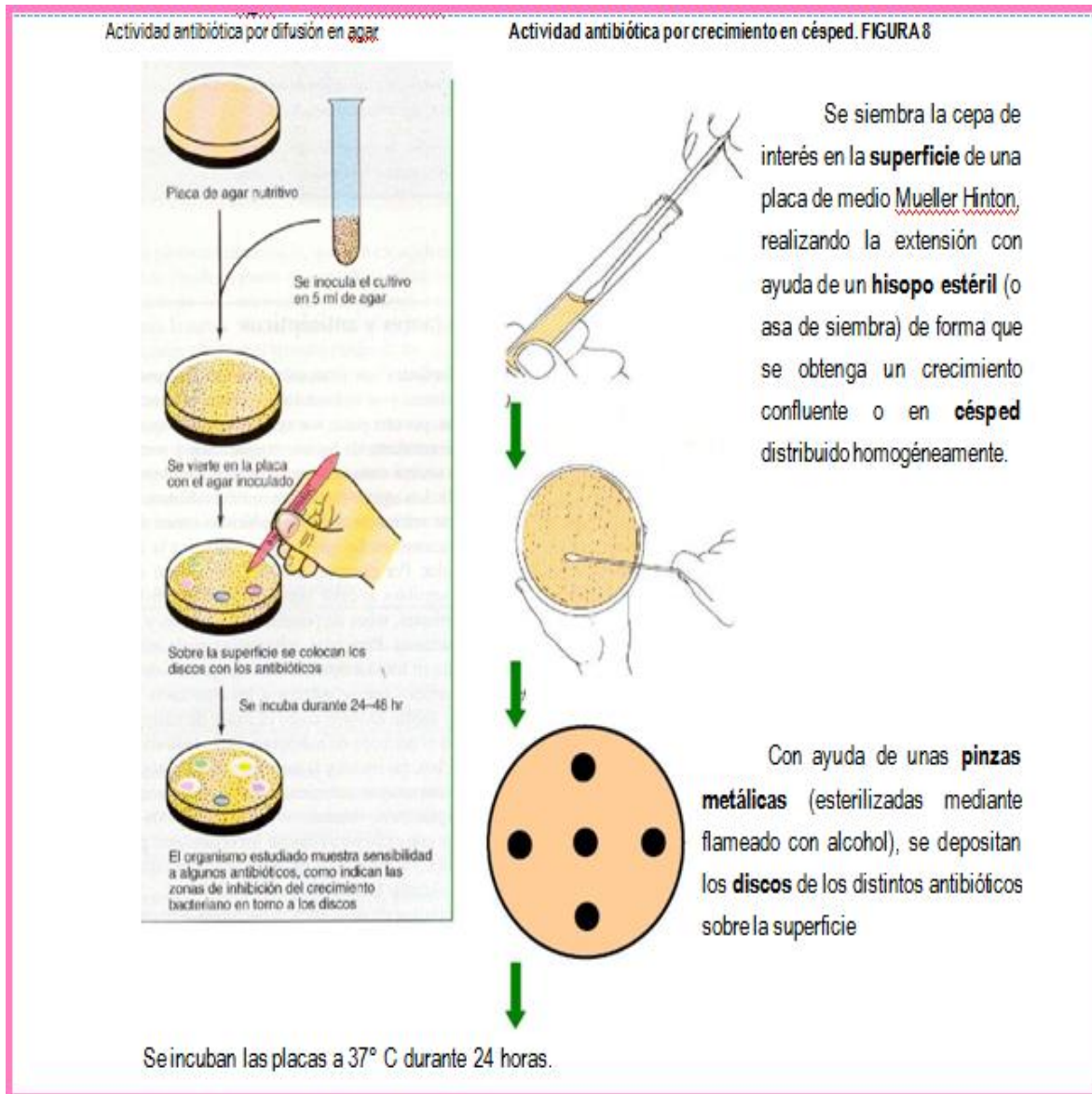


Imagen tomada de sgpwe.izt.uam.mx



PRÁCTICA N° 10 OBSERVACIÓN DE HONGOS

I. INTRODUCCIÓN

OBSERVACIÓN DE ORGANISMOS PERTENECIENTES AL REINO FUNGI: El reino fungi consiste en una amplia variedad de organismos eucarióticos cuya diversidad los hace difícil de caracterizar. Se caracterizan principalmente por tener una estructura celular eucariótica, y que es compartida con organismos de otros tres reinos: animales, vegetales y hongos.

Las células eucarióticas tienen núcleo verdadero y otros organelos rodeados de membrana como mitocondria y retículo endoplasmático.

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

- ❖ Identificar las características eucarióticas de los hongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Conocer las principales diferencias y semejanzas de los vegetales y los hongos.

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- ❖ Azul de metileno.
- ❖ Agua destilada.
- ❖ Lugol.
- ❖ Pinzas.



- ❖ Portaobjetos.
- ❖ Cubreobjetos.
- ❖ Pan enmohecido.
- ❖ Agua estancada.
- ❖ Microscopios.

IV. PROCEDIMIENTO:

Con una pequeña aguja de disección desprenda una pequeña porción de la masa algodonosa que creció sobre el sustrato (pan, bollo de yuca) de manera que incluya parte de este.

Colóquela sobre el portaobjeto una gota de azul de lactofenol. Disperse el extendido con la aguja de disección.

Identifique: micelio vegetativo, hifas, esporas, rizoides, conidio. Haga los dibujos correspondientes.

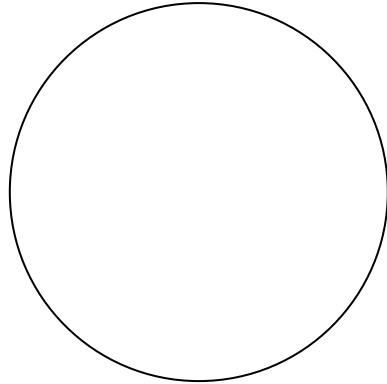
V. TALLER

- ¿Cómo se nutren los hongos?
- ¿Cuáles son las semejanzas y diferencias entre los vegetales y los hongos?

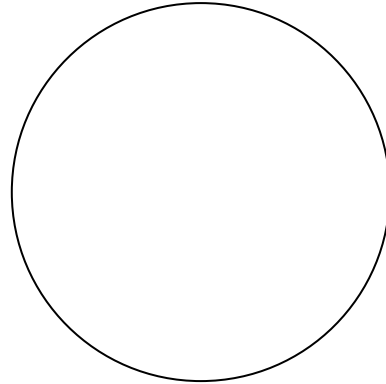


OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE HONGOS

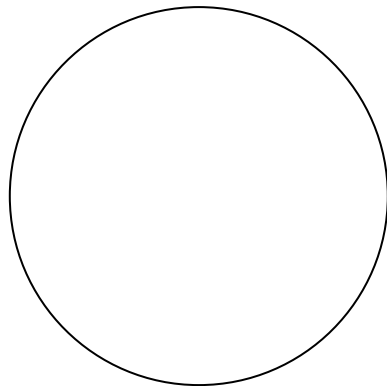
OBSERVACIONES



Aumento Total _____



Aumento Total _____



Aumento Total _____



PRÁCTICA No 11 MICROBIOLOGÍA DE LA CARIES

I. INTRODUCCIÓN

Quizás la definición más completa de la caries es aquella que la considera como una enfermedad infecciosa, crónica, transmisible, muy prevalente en el ser humano, que se caracteriza por la destrucción localizada de los tejidos duros dentales, por la acción de los ácidos producidos por los depósitos microbianos adheridos a los dientes

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer los microorganismos responsables de la caries dental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Conocer el metabolismo del *streptococo mutans*.
- Conocer el metabolismo de los *lactobacillus*.
- Conocer el metabolismo de los *actinomices*.

DETERMINANTES BACTERIANOS DE CARIOGENICIDAD

De las bacterias que forman parte de la microbiota de la placa bacteriana es interesante seleccionar los determinantes de la virulencia o cariogenicidad de los microorganismos más implicados en el inicio y desarrollo de la caries: estreptococos del grupo mutans, *Lactobacillus* spp. y *Actinomyces* spp. Según Marsh (1999), tres son las características distintivas más importantes de las bacterias cariogénicas: a) capacidad de transportar azúcares en competencia con otros microorganismos de la placa; b) capacidad de convertir rápidamente estos azúcares en ácidos y c) capacidad de mantener estas funciones en condiciones ambientales extremas.



Estreptococos del grupo mutans

Los estudios epidemiológicos han demostrado una correlación significativa entre los niveles de estas bacterias en la placa y la saliva con la prevalencia e incidencia de caries. Se han aislado en distintas superficies dentarias antes de la aparición de las lesiones y están implicadas en el inicio de las mismas. El poder cariígeno de los estreptococos del grupo mutans es, aunque con algunas diferencias, muy similar en todas las especies y está muy ligado a la sacarosa, ya que tienen la capacidad de metabolizarla mucho más rápidamente que cualquier otro microorganismo de la cavidad oral

Factores metabólicos de cariogenicidad de los estreptococos del grupo mutans:

- Poder acidógeno. Producen ácidos.
- Poder acidófilo. Son muy tolerantes a los ácidos^{l2)}
- Poder acidúrico. Siguen produciendo ácidos a pH ácido.
- Rápido metabolismo de los azúcares a ácido láctico y otros ácidos orgánicos.
- Pueden conseguir el pH crítico para la desmineralización del esmalte más rápidamente que cualquier otro microorganismo de la placa.
- Producción de polisacáridos extracelulares a partir de, la sacarosa y su movilización.
- Producción y movilización de polisacáridos in-
- Producción de dextranasas y Fructanasas.

S. sobrinus posee algunas características diferentes del resto de las especies cariógenas para el hombre: tiene menor poder acidógeno pero es más acidúrico y no sintetiza polisacáridos intracelulares. Recuérdese la importancia de una ATPasa muy activa, la denominada puerta del lactato y la síntesis de proteínas.



III. TALLER PREGUNTAS

- ¿Cuáles son los microorganismos cariogénicos?
- Explique el mecanismo de formación de una caries dental.
- Dibuje cómo sucede la formación de placa dental.



PRÁCTICA No 12

MICROBIOLOGÍA ENDODÓNTICA

I. INTRODUCCIÓN

La endodoncia es la disciplina que estudia las enfermedades de la pulpa dentaria y mantiene una estrecha relación con la microbiología.

La pulpa dental es un tejido conjuntivo que se encuentra en el interior de una cámara de dentina y se relaciona con el área periapical a través del agujero apical. La porción coronal del diente está recubierta de esmalte y la porción radicular, de cemento. La integridad del esmalte y de la dentina protege la pulpa y constituye una barrera física que, no obstante, al estar encerrada en su interior, le **impide la distensibilidad**. Por otra parte, a través del agujero apical, la pulpa presenta una **limitada comunicación vascular** y nerviosa con el resto del organismo. Estos dos hechos, junto con la **ausencia de una circulación colateral eficaz**, determinan una importante dificultad para la reparación de los distintos cuadros inflamatorios que tienen lugar en la pulpa.

PATOGENIA DE LA INFECCIÓN ENDODÓNTICA

A pesar de la protección natural que posee la pulpa dental, algunas bacterias pueden invadirla, aunque, normalmente, las defensas del hos-pedador detienen el proceso infeccioso. El cuadro clínico y la gravedad de estas infecciones están relacionados con la interacción entre la microbiota, presente en los conductos radiculares y en la cámara pulpar tras la infección bacteriana, y la respuesta defensiva del hospedador.



Vías de invasión de la microbiota

■ **Comunicación directa** **de la cavidad oral con la pulpa**

Esta situación puede deberse a diversas causas como **lesión por caries, fracturas dentales** (de la corona o de la raíz) derivadas de traumatismos dentales intensos, **grietas o fisuras del esmalte** a consecuencia de traumatismos continuados, atricción patológica por bruxismo, oclusión traumática, abrasión, reabsorción interna-externa y **maniobras operatorias** que exponen accidentalmente, incluso a veces de forma imperceptible, el tejido pulpar.

■ **Túbulos dentinarios**

La causa más prevalente de infección de la pulpa dental es la comunicación con la dentina cariada a través de los túbulos dentinarios. Esta infección puede producirse, antes de que la pulpa quede expuesta directamente al medio oral a través de la cavidad de caries, por contaminación directa de bacterias, por toxinas o por productos derivados del metabolismo bacteriano; todos ellos llegan al tejido pulpar a través de los túbulos dentinarios. A su vez, las abrasiones, las atricciones y erosiones cervicales, o las maniobras operatorias, pueden exponer los túbulos dentinarios al medio oral, posibilitando también, de esta forma, la contaminación de la pulpa dental.

▪ **Vía periodontal**

En las enfermedades periodontales puede producirse la destrucción del aparato de inserción del diente (cemento, ligamento periodontal y hueso alveolar). Si la pieza afectada presenta un conducto lateral, o un conducto en el techo de la furca en los dientes multirradiculares o la profundidad de la bolsa periodontal alcanza la proximidad del agujero apical, puede irritarse o contaminarse la pulpa dental, con su consiguiente inflamación. Es más probable que se produzca la lesión de la pulpa si el conducto lateral se expone al medio oral como consecuencia del avance de la lesión periodontal (la exposición es tan grave como la producida por una caries). Estas lesiones pulpares tienen unas implicaciones importantes clínicas, debido a la



dificultad de su diagnóstico, ya que es necesario discriminar si se necesita tan sólo tratamiento de conductos, tratamiento periodontal o ambos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Conocer los microorganismos implicados en los procesos endodónticos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las rutas metabólicas de los microorganismos implicados en procesos endodónticos.

III. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿De qué se encarga la endodoncia?
2. ¿Cuáles son los microorganismos relacionados con problemas endodónticos?



BIBLIOGRAFÍA

WALTER T.S. "Microbiologic". Ed. McGraw- Hill Interamericana. México D.F 2000

BAILEY-SCOTT. Diagnóstico microbiológico IX edición. Buenos Aires Editorial Médica Panamericana 2004.

MURRAY PR, ROSENTHAL KS, KOBAYASHI GS, PFALLER MA. Microbiología Médica" 4a ed. Madrid, ed. Mosby. Elsev Science. 2002.

KONEMAN, Elmer. ALLEN, Stephen. JANDA, William. Diagnóstico Microbiológico. 6° ed. Buenos Aires Editorial. Panamericana 2008.

GAMAZO C, LÓPEZ-GOÑI I. "Manual práctico de Microbiología". 3 ed. Barcelona, Ed. Masson S.A., 2005

LIÉBANA U.J. Microbiología Oral. Barcelona. ed. Mc Graw Hill Interamericana. 2010



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.

