



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Química Farmacéutico Biológica

Área Bioquímica Clínica

Manual de Microbiología General I

APROBADO POR EL COMITÉ ACADÉMICO DE CARRERA

6 de marzo de 2020



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	1 / 182

Coordinador

Yolanda Flores Cabrera

Autores en orden alfabético

Ana Lilia Gutiérrez Romero

Beatriz Elena Arellano Pimentel

Carina Gutiérrez Iglesias

Enrique Escalera Zúñiga

Gabriel Alejandro Romero Díaz

Joel Saucedo Constantino

José Oscar González Moreno

María de la Mercedes Zamudio Duran

María Galia Martínez Flores

Marisol Gandarillas Ortiz de Montellano

Yolanda Flores Cabrera



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	2 / 182

Tabla de Contenido

Reglamento del laboratorio	3
Evaluación	4
Material Básico para el módulo de Microbiología General I	6
Introducción	8
Práctica 1: Microscopio	9
Práctica 2: Clasificación de los Microorganismos	19
Práctica 3: Preparación de material para microbiología, limpieza y esterilización	26
Práctica 4: Clasificación de los medios de cultivo microbiológicos y su utilidad en el diagnóstico	35
Práctica 5: Siembras	56
Práctica 6: Características macroscópicas de cultivos (Morfología colonial)	62
Práctica 7: Morfología microscópica (Tinciones)	70
Práctica 8: Aislamiento y cuantificación de microorganismos	80
Práctica: 9 patogenicidad y virulencia	87
Práctica: 10 Multiplicación bacteriana (Requerimientos físico-químicos)	95
Práctica 11. Control microbiológico I (Efecto de los factores físicos)	104
Práctica 12: Control Microbiológico II (Efecto de los factores químicos)	114
Práctica 13: Control microbiológico III (Efecto de los antibióticos)	127
Práctica 14: Fisiología Bacteriana	135
Práctica 15: Leche, análisis microbiológico y las reacciones bacterianas	155
Práctica: 16 Análisis microbiológico del agua	165
Práctica 17: Fermentación (Producción de Vino)	180



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	3 / 182

Reglamento de laboratorio

1. Sólo se permitirá trabajar en el laboratorio cuando se encuentre un asesor del módulo.
2. Trabajar con bata blanca de algodón y zapatos serrados.
3. Cuando se trabaje con microorganismos debe emplearse guantes de látex y cubre bocas.
4. Las superficies de trabajo deben ser descontaminadas antes y después de una sesión de trabajo e inmediatamente después de algún derrame de material contaminante.
5. Deberán lavarse las manos después de manipular cultivos bacterianos, así como al salir del laboratorio.
6. Todos los medios de cultivo inoculados con microorganismos deberán ser esterilizados antes de ser desechados.
7. Los materiales que estén en contacto con microorganismos deberán ser esterilizados por métodos físicos (con calor húmedo) o químicos (por ejemplo con cloro) antes de ser lavados o desechados en los lugares designados por el asesor.
8. No se permite pipetear ningún líquido con la boca.
9. Está prohibido ingerir alimentos o bebidas dentro del laboratorio.
10. Está prohibido fumar dentro del laboratorio.
11. Deberá mantener limpia y ordenada el área de trabajo y el laboratorio.
12. Todos los resultados y cálculos deben ser registrados en una bitácora exclusiva para el laboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	4 / 182

Evaluación

El alumno deberá cumplir con el 80% de asistencias para poder ser evaluado.

La calificación del módulo de Microbiología General I se obtiene acreditando la teoría y el laboratorio con una calificación mínima de seis (6)

Teoría 60% de la calificación.

Calificación del módulo

Laboratorio 40% de la calificación.

Laboratorio

El laboratorio se acredita promediando los siguientes rubros:

Rubro a evaluar	Ponderación
Examen práctico	40%
Trabajo o desempeño en el laboratorio	20%
Evaluación de la práctica	20%
Mesa redonda	10%
Informe de laboratorio	10%

Nota: Para poder ser promediados todos los aspectos deben tener calificación promedio mínima de SEIS (6.0)

Examen práctico 40%

Calificación aprobatoria mínima de seis (6.0)

Se realiza en forma individual con base en las instrucciones del asesor.

Considerando los siguientes aspectos:

- Tinción de Gram y manejo adecuado del microscopio
- Selección de los medios de cultivo
- Siembra y aislamiento
- Selección y fundamento de las pruebas bioquímicas
- Informe del examen práctico, con la estructura que indique el asesor.

No hay reposición del examen práctico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	5 / 182

Trabajo o desempeño en laboratorio 20%

Calificación promedio aprobatoria mínima de seis (6.0)

Se evaluará el desempeño individual de los alumnos en el laboratorio durante el desarrollo del experimento, considerando los siguientes aspectos

- Asistencia y puntualidad (sin valor para calificación) Se requiere contar con una asistencia mínima de 80% para ser evaluado.
- Contar con el material básico y muestras para el desarrollo del experimento.
- Limpieza durante y al final del experimento.
- Organización para el desarrollo de trabajo colaborativo.
- Habilidad para el desarrollo de las actividades prácticas.

Evaluación de la práctica 20%

Calificación promedio aprobatoria mínima de seis (6.0)

Se realizará una evaluación de conocimientos previos, el instrumento (formato del examen escrito) para realizar esta evaluación queda a criterio del asesor.

Mesa redonda 10%

Calificación promedio aprobatoria mínima de seis (6.0)

Los asesores realizarán la mesa redonda con los equipos que asesora; en un tiempo máximo de 40 minutos, en la cual se abordarán los fundamentos, método, e información inherentes a la práctica; así mismo el asesor evaluará los conocimientos previos que poseen los alumnos antes de dar inicio a la sesión práctica. Para lo cual será indispensable que el alumno lleve su bitácora con la investigación correspondiente, ya que esta será tomada en cuenta para su evaluación.

Informe de laboratorio 10%

Calificación promedio aprobatoria mínima de seis (6.0)

La estructura del reporte será como lo indique el asesor y deberá incluir como mínimo: carátula, objetivo, resultados, análisis de resultados conclusiones y referencias escritas con base en los criterios de Vancouver.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	6 / 182

Material Básico para el laboratorio del módulo de Microbiología General I

Individual

- Bata blanca para laboratorio.
- Caja de guantes de látex de cirujano.
- Guantes de látex para uso doméstico (para lavar material)
- Cubre bocas.
- Asas bacteriológicas (una asa recta y una asa redonda)
- Llave del candado para la gaveta que se les asigne.
- Una fotografía tamaño infantil.
- Libreta forma francesa de pasta dura (bitácora)

Por equipo

- Un paquete grande de Algodón plisado
- Gasa por rollo
- Frascos goteros color ámbar
- Masking tape (de una pulgada de ancho)
- Marcador permanente de punto fino
- Cinta testigo
- Caja de porta objetos
- Caja de cubre objetos
- Pinzas de disección de punta roma
- Papel seda
- Tijeras que corten tela
- Papel kraft o un kg de papel estraza grueso
- Gradilla para tubos 18X150 (OPCIONAL)
- Jeringas de 5 y 10 mL
- 4 botes medianos diferentes tamaños (como fruta en almíbar, leche, etc)
- Caja de cartón para transportar el material
- Bandeja de plástico mediana
- Candado con varias llaves (una para cada integrante del equipo)
- Rociador



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	7 / 182

- Hipoclorito de sodio
- Un frasco con torundas de algodón en alcohol al 70%
- Etanol al 70%
- Benzal al 10 % v/v
- 2 Mecheros Bunsen con manguera
- Franelas que no dejen residuos de pelusa
- Jabón líquido para manos
- Jabón líquido para trastes
- Escobillón para tubos
- Fibra para lavar trastes
- 2 encendedores o cajas de cerillos
- Tela de alambre (sin asbesto)
- Espátula
- Recipiente para guardar frascos goteros con colorantes
- Termómetro de 150 °C
- 1 Agitador de vidrio



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	8 / 182

Introducción

Los microorganismos y su relación con el medio ambiente han sido parte importante de la historia del hombre, ya que se encuentran presentes desde hace muchos años proporcionando alimento y bebidas o enfermándolo como lo muestran los estudios de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* encontrado en momias egipcias de 3 000 años de antigüedad lo que indica que las bacterias han estado presentes desde hace mucho tiempo sin que el hombre tuviera noción de su existencia y no fue hasta el siglo XVII que Anton Van Leeuwenhoek con la ayuda del microscopio; que había construido, observó por vez primera microorganismos vivos de agua y materia orgánica a los que llamó “animáculos” y es a partir de ello que inicia la ciencia de la microbiología, su desarrollo y evolución han sido muy rápidos; la mayoría de las aportaciones a la microbiología han ocurrido en los últimos doscientos años; actualmente se cuenta con una serie de recursos como pruebas, bioquímicas (fisiología), inmunológicas, de biología molecular y biotecnología para el estudio e identificación de los microorganismos.

El propósito del módulo de Microbiología General I es que el alumno conozca los aspectos básicos de la microbiología, los aspectos morfológicos de las bacterias, las condiciones adecuadas para su desarrollo y las pruebas bioquímicas que nos permiten la identificación de bacterias de importancia sanitaria, médica e industrial. Además de la forma y los fundamentos para preparar diferentes medios de cultivo, su aplicación dentro de la bacteriología y los métodos esterilización, asepsia y control microbiológico.

El manual de Microbiología General I tiene el objetivo de ser una guía metodológica para la realización de las prácticas que permitan al alumno complementar con la experiencia los aspectos teóricos del módulo, conociendo la importancia de preparar y utilizar adecuadamente un medio de cultivo que contenga los elementos necesarios para desarrollar un microorganismo, o para poner de manifiesto una actividad metabólica o favorecer la producción de un metabolito para uso industrial, las técnicas correctas de siembra, cultivo y los factores para su óptimo desarrollo; así como conocer las técnicas empleadas para aislar microorganismos de fuentes naturales o de muestras clínicas, o evidenciar su capacidad de patogenicidad y virulencia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	9 / 182

Práctica 1: Microscopio

Objetivo

Conocer las partes que integran un microscopio, así como el correcto manejo y cuidado del mismo

Aspectos teóricos

La microbiología es el estudio de los microorganismos y sus actividades, su forma, estructura, reproducción, fisiología, metabolismo e identificación, cómo están distribuidos en la naturaleza, sus relaciones con otros seres, los efectos benéficos o perjudiciales que ejercen sobre los humanos y las alteraciones físicas y químicas que provocan en su medio.

La microbiología empezó cuando el hombre aprendió a pulir piezas de vidrio y a combinarlas para lograr ampliaciones lo bastante grandes para poder ver los microbios. *Anthony van Leeuwenhoek* fue el primero en comunicar sus observaciones con descripciones y dibujos precisos, *Leeuwenhoek* observó entre otras cosas, bacterias y protozoarios en el agua de lluvia, en infusiones diversas y en su sarro dental. *Leeuwenhoek* registró cuidadosamente sus observaciones en una serie de cartas dirigidas a la *British Royal Society*, sus cartas fueron leídas con interés por científicos británicos, pero es claro que la importancia y trascendencia de sus descubrimientos no fue debidamente valorada.

El estudio microscópico de los microorganismos proporciona datos fundamentales para su identificación, determinar su forma, tamaño, reacción a diferentes colorantes y estructuras celulares; orienta al microbiólogo cuando trata de aislar microorganismos y permite establecer características como la pureza, presencia de contaminantes, variedad o edad de una población, entre otras cosas. Por ello, el microscopio es uno de los instrumentos de mayor importancia en bacteriología, su descubrimiento y desarrollo fueron los acontecimientos más importantes en el florecimiento de la microbiología.

MICROSCOPIO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	10 / 182

Los microscopios pertenecen a dos clases, el de luz (óptico) y el electrónico, según el principio en el que se basa la amplificación. El microscopio mediante el cual la amplificación se obtiene por medio de un sistema de lentes ópticos (microscopios de luz) abarca los siguientes tipos: a) campo claro o luminoso, b) campo oscuro, c) luz ultravioleta, d) fluorescencia y e) contraste de fases. El microscopio electrónico, como su nombre lo indica, se basa en un haz de electrones (en lugar de ondas luminosas) y un campo magnético para obtener la imagen amplificada. La microscopia electrónica abarca dos tipos: a) microscopia electrónica de transmisión y b) microscopia electrónica de barrido, esta última presenta la característica de dar una notable impresión tridimensional, aunque su poder de resolución es menos que el obtenido al utilizar un microscopio electrónico de transmisión.

MICROSCOPIO ÓPTICO DE CAMPO CLARO

En la microscopia de campo claro, el campo microscópico o área observada está brillantemente iluminada y los objetos en estudio aparecen más oscuros en el fondo. Un microscopio óptico de fondo claro consiste en un armazón de metal que contiene tres sistemas principales que son:

1. SISTEMA MECÁNICO. Consta de los siguientes elementos:

Base, brazo y cuerpo del tubo, los cuales sirven para mantener en posición todos los componentes del microscopio.

Tubo intercambiable del microscopio, el cual se encuentra insertado en la parte superior del cuerpo del tubo. Soporta el ocular y permite alinearlos con el objetivo seleccionado para una observación.

Platina, en ella se coloca la preparación o portaobjetos de estudio. La platina está equipada con pinzas para sujetar la preparación y dos tornillos para desplazarla, lo cual facilita la localización del objeto y la revisión de la preparación.

Revólver, es el disco que soporta a los objetivos y que se gira para colocar el objetivo requerido bajo el tubo.

Tornillo macrométrico o de enfoque rápido, permite desplazar el tubo del microscopio acercando el objetivo a la preparación, lo cual permite localizar la imagen y lograra un enfoque aproximado.

Tornillo micrométrico o de enfoque fino, éste puede desplazar el tubo en forma más lenta, lo cual permite hacer movimientos finos que se requieren para obtener un enfoque exacto y preciso.

2. SISTEMA DE ILUMINACIÓN. El cual consta a su vez de los siguientes elementos:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	11 / 182

Interruptor. Fuente de luz, la cual es una lámpara que se encuentra colocada debajo del objeto y emite la luz que pasa por el condensador, para después iluminar la preparación. Para regular la intensidad de la luz algunos microscopios tienen integrado a la lámpara un diafragma, el cual se abre o se cierra de acuerdo a la cantidad de luz que se desee; en otros únicamente de regula el voltaje.

Diafragma de campo.

Condensador, está interpuesto entre la luz y la muestra. El condensador recibe la luz de la lámpara, rectifica los rayos de luz y los concentra o enfoca en un cono de luz sobre el campo donde se sitúa la muestra, de tal manera que los rayos, después de atravesar la preparación, penetran a la lente del objetivo con el menor ángulo posible. Para ello, el condensador se baja o se sube hasta alcanzar una posición que origine un foco preciso.

Diafragma iris, controla el diámetro del círculo de luz que sale del sistema condensador. Su propósito no es controlar la intensidad de luz que llega al objeto, sino asegurar que la que sale del condensador llene exactamente la lente del objetivo; si el diafragma es demasiado grande, parte de la luz pasará alrededor del objeto y originará brillo, reduciendo la claridad de la imagen (Fig. 1.1)

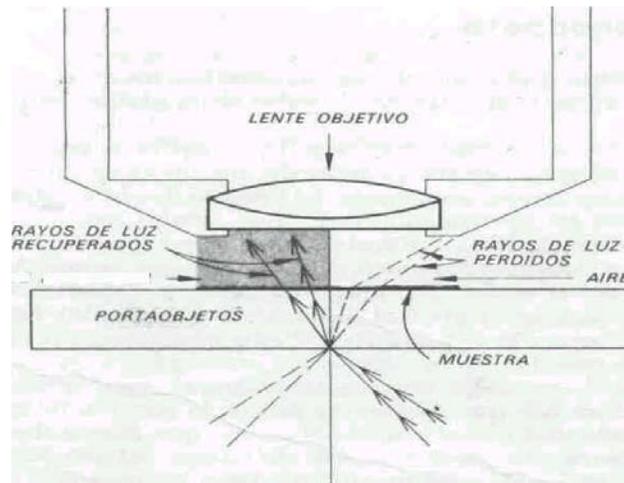


Fig. 1.1 Aumento de la cantidad de luz que pasa a la lente objetivo, procedente de la muestra en el objetivo de inmersión

3. SISTEMA ÓPTICO: Consta de los siguientes elementos:

Objetivos, son las lentes que amplifican la imagen del campo microscópico y por lo tanto, del objeto en estudio. La mayoría de los microscopios tienen tres objetivos que proporcionan diferentes aumentos, el coeficiente de aumento está indicado para cada lente objetivo por un número grabado en su tubo, por ejemplo, 10X, que indica que su poder de aumento es de 10 veces o 10 diámetros.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	12 / 182

Los objetivos más comunes son: 5X o lupa; objetivo 10X o seco débil, la cual abarca un campo microscópico con una superficie mayor y se utiliza para localizar los objetos de interés y para seleccionar el espécimen a observar; objetivo 40X o seco fuerte, el cual permite la visualización detallada de microorganismos grandes, como algas, protozoarios y hongos; y el objetivo de 100X o de inmersión, que se utiliza para observar bacterias o microorganismos eucariotes pequeños.

Ocular, esta lente amplifica aún más la imagen procedente del objetivo y permite que el ojo la perciba. El ocular se encuentra insertado en el tubo intercambiable. Los coeficientes de aumento de los oculares y de los objetivos permiten calcular el aumento total o capacidad amplificadora de un microscopio, que es igual al producto de los coeficientes de aumento del ocular y del objetivo que se utilizan; por ejemplo: en un microscopio con un ocular de 10X y los objetivos de 10X, 40X y 100X, la imagen se amplifica 100, 400 y 1000 veces respectivamente (Fig. 1.2)

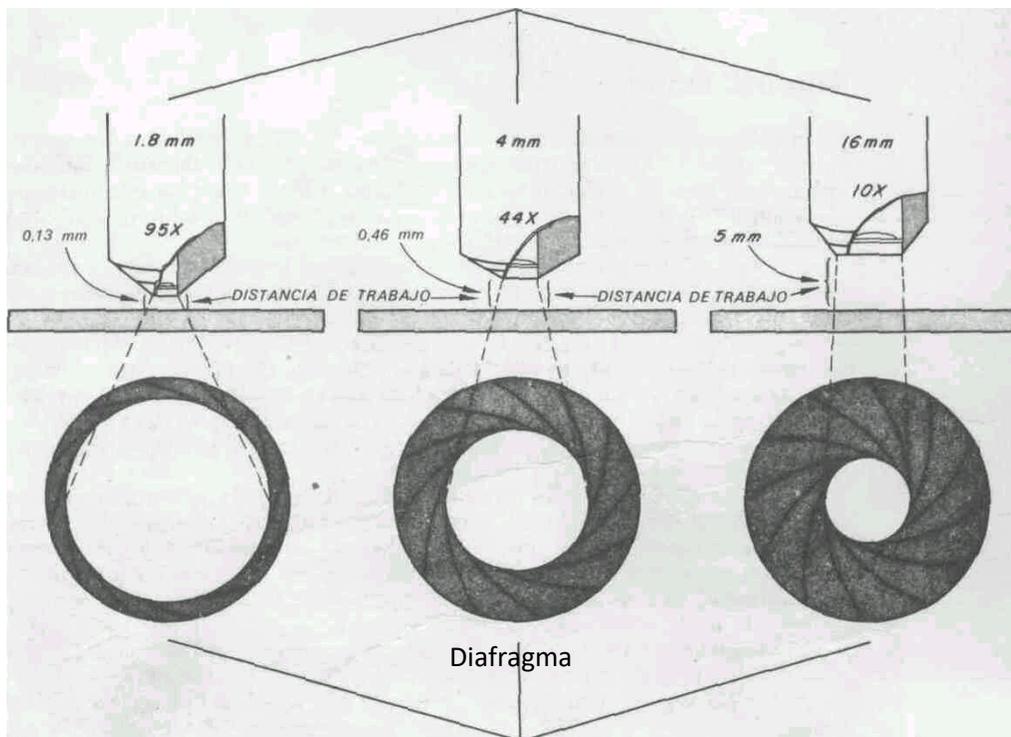


Fig. 1.2 Objetivos

Un concepto muy importante con respecto al uso del microscopio es el Poder de Resolución, el cual se puede definir como la capacidad de distinguir dos puntos adyacentes como distintos y separados. A poca resolución, las estructuras se ven juntas; entre mayor es la resolución, mayor es el detalle con el que se observan.

El poder de resolución de un microscopio depende de dos factores:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	13 / 182

El poder de resolución es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz que se usa para la iluminación; cuyos límites se encuentran entre el rango 400-700 nm en un microscopio de luz visible.

La apertura numérica, la cual determina la máxima cantidad de luz admitida por el lente objetivo.

El poder de resolución (d) se expresa mediante la siguiente ecuación:

$d = \text{longitud de onda} / \text{apertura numérica}$.

De acuerdo con la teoría óptica, la resolución más alta posible en un microscopio de luz compuesto permitirá ver con claridad objetos cuyo diámetro sea de casi 0.2 μm . De este modo, en un microscopio óptico compuesto, los objetos de dimensiones menores a las señaladas, al ser amplificados, darán lugar a imágenes difusas.

MICROSCOPIO ÓPTICO DE CAMPO OSCURO

El efecto producido por la técnica del campo oscuro consiste en un fondo negro sobre el cual se ven los objetos intensamente iluminados. La microscopía de campo oscuro es de un valor especial en el examen de microorganismos sin teñir que exhiban algún aspecto morfológico en vivo y en suspensión (preparaciones húmedas y en gota pendiente).

MICROSCOPIO ÓPTICO DE LUZ ULTRAVIOLETA

El microscopio de luz ultravioleta permite un mayor poder de resolución con útiles y mayores ampliaciones que las obtenidas con el microscopio de luz ordinario, ya que la luz ultravioleta tiene una longitud de onda más corta (180-400 nm frente a 400-700 nm) que la luz visible, su aplicación principal es la diferenciación de componentes celulares sobre la base de una mayor o menor facultad de absorber la luz ultravioleta.

MICROSCOPIO ÓPTICO DE FLUORESCENCIA

Algunas sustancias químicas absorben la energía de las ondas ultravioletas y la emiten como ondas visibles de mayor longitud. Así, un material aparece con un color a la luz ordinaria y con otro del todo distinto con luz ultravioleta, a estos materiales se les llama fluorescentes y al fenómeno fluorescencia. Los microorganismos que se tiñen con un colorante fluorescente aparecen como objetos luminosos cuando se observan al



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	14 / 182

microscopio con luz ultravioleta. Los colorantes fluorescentes tienen varias aplicaciones en microbiología, entre ellas, una de las más notables ha sido detectar las reacciones inmunológicas, es decir, reacciones de anticuerpos con antígenos.

MICROSCOPIO ÓPTICO DE CONTRASTE DE FASES

Mejora las diferencias de contraste entre las células y el medio circundante, lo que permite observar células vivas sin tinción. El microscopio de contraste de fases permite que la luz pase a través de objetos transparentes, como las células y se fusiona en diferentes fases dependiendo de las propiedades de los materiales de a través de los cuales pasa. Este efecto se amplifica en la lente objetivo, lo que da origen a la formación de una imagen oscura en un entorno luminoso.

Permite el examen de estructuras celulares en células vivas de organismos más grandes: levaduras, algas, protozoarios y algunas bacterias.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO

El microscopio electrónico utiliza ondas de electrones y campos magnéticos para producir la imagen, se utiliza principalmente para el examen de virus y de la ultraestructura de las células microbianas. La resolución superior de la microscopía electrónica se debe al hecho de que los electrones tienen una longitud de onda mucho más corta que los fotones de la luz blanca.

Hay dos tipos de microscopio electrónico el microscopio electrónico de transmisión, que tiene muchas características en común con el microscopio de luz y el microscopio electrónico de barrido

Conociendo los parámetros anteriores y un manejo adecuado del microscopio, se espera la obtención de resultados satisfactorios.

Material y reactivos

Material

- Papel seda.

Material biológico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	15 / 182

- Preparaciones fijas.

Reactivos

- Aceite de inmersión.

Equipo

- Microscopio.

Servicios

- Electricidad
- Agua

Procedimiento

I. CUIDADO DEL MICROSCOPIO E IDENTIFICACIÓN DE SUS COMPONENTES

Recibir el microscopio, sujetándolo firmemente con ambas manos para trasladarlo, con una mano tomarlo de su brazo y con la otra por debajo del soporte o pie, nunca tomarlo de lado o por la platina porque se puede caer y dañarse irremediabilmente. Depositarlo sobre la mesa con suavidad.

Identificar cada uno de los componentes del microscopio.

Asegurarse de que se encuentren limpias las piezas ópticas, de no ser así, límpielas cuidadosamente siguiendo el procedimiento para limpieza del microscopio. Los lentes por limpiar son: oculares, objetivos y condensador; las cuales no deben quitarse de su lugar porque podría introducirse polvo al interior del microscopio.

Observar los datos del microscopio e identificar:

En el ocular, el coeficiente de aumento.

En el objetivo: el coeficiente de aumento, la apertura numérica, la longitud mecánica del tubo y el espesor del portaobjeto a emplear.

Calcular el total de amplificación que se puede obtener con los diferentes objetivos.

Alinear el objetivo de menor aumento con el tubo del microscopio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	16 / 182

Con el tornillo macrométrico, acercar al máximo la platina al objetivo, observando lateralmente para que no lleguen a chocar.

II. ILUMINACIÓN

Encender la lámpara.

Abrir los diafragmas (de campo y de iris).

Subir el condensador.

Seleccionar el objetivo (5X o 10X).

Ajustar la distancia interpupilar (distancia entre los ojos).

Enfocar con el macrométrico y micrométrico.

Cerrar el diafragma de campo.

Descender ligeramente el condensador hasta ver nítido el borde del diafragma de campo.

De ser necesario, centrar el condensador con la ayuda de sus dos tornillos laterales; una vez centrado el condensador, abrir el diafragma de campo, e intensificar un poco más la luz.

III. ENFOQUE DE LA PREPARACIÓN

Colocar la preparación en la platina.

Con el tornillo macrométrico llevar la platina lo más cercano posible al objetivo (observando lateralmente).

Observar por el ocular, mover lentamente el tornillo macrométrico para separar el objetivo de la preparación hasta que aparezca la imagen del objeto.

Para mejorar la nitidez de la imagen utilice el tornillo micrométrico, disminuya la intensidad de la luz cerrando el diafragma de la lámpara o bajando ligeramente el voltaje de la misma. Colocar el objeto de interés en el centro del campo microscópico, moviendo ligeramente la platina.

Girar el revólver y alinear el objetivo de 40X con el tubo microscópico.

Observar por el ocular y verificar que la imagen permanezca enfocada ajustar solamente si es necesario con el tornillo micrométrico nunca con el macrométrico porque esto dañará el microscopio.

Girar el revolver, colocar sobre la preparación un cubreobjetos y una gota de aceite de inmersión y continuar girando hasta alinear el objetivo de 100X.

Observar por el ocular y verificar que la imagen permanezca enfocada ajustar si es necesario con el tornillo micrométrico y para muestras tenidas aumentar la intensidad de la luz.

Después de retirar la preparación y Al terminar de hacer las observaciones, limpiar tanto el ocular como los objetivos siguiendo el procedimiento para limpieza del microscopio. Dejar



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	17 / 182

el microscopio con el objetivo de menor aumento alineado con el tubo y lo más cercano posible a la platina.

Entregar las preparaciones fijas al profesor de prácticas después de quitarles el aceite.

Reporte de resultados

Reportar las observaciones de las preparaciones proporcionadas por el profesor, anotar los datos importantes de la preparación y de la observación: muestra, tinción, aumento total y descripción de lo observado.

Muestra	Tinción	Aumento total	Descripción de la observación

Cuestionario

1. Menciona brevemente como funciona cada uno de los siguientes tipos de microscopio: de campo claro, de campo oscuro, de contraste de fases, de luz ultravioleta, de fluorescencia y electrónico.
2. ¿Cuál es la principal utilidad de cada uno de los microscopios antes mencionados?
3. Defina lo que es poder de resolución y discuta los factores que lo condicionan.
4. ¿Por qué es necesario el uso de aceite de inmersión cuando se realizan enfoques con el lente objetivo de alto poder?
5. Describa la técnica correcta para enfocar un frotis bacteriano.
6. ¿Qué cuidados se deben tener en el uso y manejo del microscopio?
7. Defina el término apertura numérica.
8. ¿Por qué los objetivos están ubicados en un revolver?
9. ¿Qué es el índice de refracción?
10. ¿Qué es el índice de difracción?

Referencias

1. Microbiología! (outside), microscopía [internet] [consulta 19/Julio/2016]
URL:<http://www.microbiología.com.ar/index.html>



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	18 / 182

2. Caprette D. Light microscopy. [internet] [consulta 20/Julio/2016] URL: <http://www.ruf.rice.edu/~bioslabs/methods/microscopy/microscopy.html>
3. Cowan ST y Steel KJ. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª ed. México: Compañía Editorial Continental; 1993.
4. Delaat NCA. Microbiología. 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 1985.
5. Pelczar M, Reid R y Chan E. Microbiología. 4ª ed. México: McGraw-Hill; 1982.
6. Finegold S and Martín W. Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 8th ed. USA: The Mosby Company; 1990.
7. Ramírez R, Luna B, Velásquez O, Vierna L, Mejía A, Tsuzuki G, Hernández L y Muggenburg I. Manual de prácticas de microbiología general. 4ª ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2000.
8. Brooks FG, Carroll CK, Butel SJ, Morse AS y Mietzner AT. Jawetz, Melnick y Adelberg microbiología médica. 25ª ed. México: Mc Graw Hill; 2011.

Práctica 2: Clasificación de los Microorganismos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	19 / 182

Objetivo

Determinar la ubicación de los microorganismos dentro de los seres vivos, así como las características distintivas de cada uno de los diferentes grupos de microorganismos.

Aspectos teóricos

Desde su introducción en 1959, el sistema de clasificación de RH Whittaker se ha convertido en uno de los más ampliamente utilizados en biología. En este sistema, los diferentes organismos vivos son colocados en uno de los cinco reinos con base en su tipo y arreglo celular, así como en sus requerimientos nutricionales. Este sistema de clasificación cuenta con cinco reinos, los cuales son:

1. **REINO ANIMAL.** Son organismos pluricelulares eucarióticos, el principal modo de nutrición es por ingestión, muchos animales son móviles y generalmente carecen de las paredes celulares rígidas de las plantas. Frecuentemente ocurre una considerable migración y reorganización celular de los tejidos durante el curso del desarrollo embrionario. Su reproducción es primariamente sexual.
2. **REINO VEGETAL.** Son organismos eucariotes pluricelulares fotosintéticos. Carecen de órganos de motilidad.
3. **REINO PROTISTA.** Son organismos eucariotas que incluyen a los autotróficos fotosintéticos unicelulares y pluricelulares (algas) y a los heterótrofos unicelulares o coloniales simples (protozoarios). Su modo de nutrición incluyen la fotosíntesis, la absorción y la ingestión, La reproducción es asexual y sólo algunas formas tienen reproducción sexual. Se mueven por flagelos, cilios o pseudópodos, o son no móviles.
4. **REINO FUNGI.** Son organismos eucarióticos filamentosos o unicelulares (levaduras). Los hongos son heterótrofos, saprofitos o parásitos, y la nutrición es por absorción. Cerca de 100.000 especies han sido descritas.
5. **REINO MONERA.** Son células procariotas (carecen de envoltura nuclear), son unicelulares, pero a veces se presentan como filamentos u otros cuerpos superficialmente multicelulares. Su modo de nutrición predominante es heterótrofo, por absorción, pero algunos grupos son autotróficos, ya sea fotosintéticos o quimiosintéticos. La reproducción es primariamente asexual, por fisión binaria o gemación, pero en algunos ocurren intercambios genéticos como resultado de conjugación, transformación, transducción e intercambio de plásmidos. Las formas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	20 / 182

móviles se desplazan por medio de flagelos bacterianos o por deslizamiento. El reino mónera contiene representantes de dos linajes distintos: Archeobacterias y Eubacterias.

A finales de la década de los 1960's se identificaron tres tipos diferentes de células basándose en la observación de que los ribosomas no son iguales en todas las células (los ribosomas proveen un método para comparar células ya que están presentes en todas las células). Al comparar las secuencias de nucleótidos en el ARN ribosomal (rRNA) de diferentes tipos de células se encontró que existen tres grupos celulares diferentes: los eucariotes y dos tipos diferentes de procariotes (tan distantemente relacionados entre ellos como los están de los eucariotes), las eubacterias (o bacterias verdaderas) y las arqueobacterias.

En 1990 C Woese, O Kandler y ML Wheelis propusieron una nueva clasificación de los seres vivos, colocando los tres tipos celulares en un nuevo taxón por encima de los reinos, el cual recibió el nombre de dominio. Ellos propusieron que las arqueobacterias y las eubacterias (también llamadas simplemente bacterias) ocuparan diferentes dominios en el árbol evolutivo a pesar de su similitud en apariencia. De esta manera se definieron los tres dominios actuales de los seres vivos, el Dominio *Eukarya* (que incluye animales, plantas, fungi y protistas), el Dominio *Bacteria* que incluye procariotas que contienen peptidoglucanos en su pared celular) y el Dominio *Archaea* (que incluye procariotas que no contienen peptidoglucanos en su pared celular; viven frecuentemente en ambientes extremos, llevan a cabo procesos metabólicos poco usuales, se dividen en 3 grupos principales: los metanógenos, que son organismos estrictamente anaerobios que producen metano CH₄ a partir de dióxido de carbono e hidrógeno; los halófilos extremos, los cuales requieren altas concentraciones de sal para sobrevivir; y los hipertermófilos, los cuales normalmente se desarrollan en ambientes muy calientes).

Por otra parte, los virus son diferentes a todas las formas de vida, éstos se encuentran entre los microorganismos más pequeños y se requiere de un microscopio electrónico para su visualización. Se compone de fragmentos de ácido nucleico (ADN o ARN, nunca ambos) rodeado por cubiertas proteicas, carecen de una "maquinaria" sintética y no muestran ninguna actividad observable a excepción de la replicación, la cual sólo puede ser llevada a cabo dentro de células vivas; debido a todo esto, los virus no entran en la definición de lo que es una célula y por lo tanto no se incluyen en ninguno de los grupos mencionados anteriormente; sin embargo, los virus son responsables de un gran número de enfermedades humanas importantes, entre las que se encuentran la influenza, la hepatitis A y B, la varicela, y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) entre otras.

Materiales y reactivos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	21 / 182

Material

- Papel seda.
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Asa bacteriológica.
- Pipeta Pasteur.
- Aguja de disección (o asa micológica)

Material biológico

- Agua de charco.
- Pulque.
- Fruta contaminada con hongo.
- Yogurt natural.
- Material fecal.

Reactivos

- Lugol.
- Safranina.
- Azul de algodón de lactofenol

Equipo

- Microscopio.

Servicios

- Electricidad
- Agua

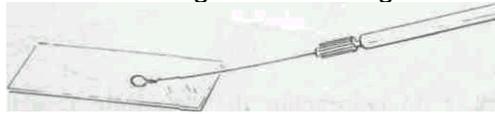


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	22 / 182

Procedimiento

I. PROTOZOARIOS

1. Con una semana de anticipación, cada equipo colocará en un frasco pequeño de boca ancha un poco de pasto o paja con agua de charco a temperatura ambiente.
2. El día de la práctica se colocará una gota de esta agua entre porta y cubreobjetos.



3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.

II. HONGOS Y LEVADURAS

1. Tomar una muestra de la fruta contaminada con una aguja de disección (o asa micológica) y colocarla entre el porta y cubreobjetos, colocando una gota de azul de algodón de lactofenol.
2. Desmenuzar la muestra antes de colocar el cubreobjetos.
3. Observar al microscopio en objetivo seco débil y seco fuerte.
4. Realizar el procedimiento anterior con el pulque, tomando la muestra con una pipeta Pasteur.
5. Realizar descripciones y anotaciones de los organismos observados.

III. BACTERIAS

1. De la muestra de yogurt, tomar con el asa bacteriológica una muestra y hacer una extensión delgada sobre un portaobjetos con una gota de lugol y cubreobjetos.
2. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte.
3. Observar que las bacterias se aprecian como puntos móviles y refringentes en todo el campo.
4. Realizar las actividades anteriores con la muestra de heces.
5. Estas observaciones se pueden realizar utilizando safranina en vez de lugol.

Reporte de resultados



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	23 / 182

Reportar las observaciones de cada una de las muestras, anotando los siguientes datos y ubicarlos en alguno de los cinco reinos y en alguno de los tres dominios.

Muestra	Colorante	Descripción de la observación	Ubicación en reino y dominio

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. ¿Cuáles son las diferencias entre células eucariotas y procariotas?
2. De un ejemplo de microorganismos intermedios entre:
 - a) virus y bacterias.
 - b) Bacterias y hongos.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	24 / 182

3. De las características generales de los virus por las cuales no son incluidos en ningún reino.
4. ¿Qué es un prión?
5. Mencione las diferencias entre algas unicelulares y protozoarios.
6. Explique el término taxonomía y los diferentes niveles taxonómicos que existen.
7. ¿Qué es la taxonomía binomial?
8. Explique qué es la taxonomía numérica.
9. Indique los criterios generales que se utilizan para clasificar a los virus.
10. Clasifique el reino al que pertenecen los siguientes microorganismos:
 - a) *Tripanosoma cruzi*.
 - b) *Candida albicans*.
 - c) *Paramecium sp.*
 - d) *Aspergillus niger*.
 - e) Rotavirus.
 - f) *Euglena sp.*

Referencias

1. Microbiología (outside), microscopía [internet] [consulta 19/Julio/2016]
URL:<http://www.microbiología.com.ar/index.html>
2. Ramírez R, Luna B, Velásquez O, Vierna L, Mejía A, Tsuzuki G, Hernández L y Muggenburg I. Manual de prácticas de microbiología general. 4ª ed. México: Facultad de Química, UNAM; 2000.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	25 / 182

3. Tortora JG, Funke RB y Case LC. Introducción a la microbiología . 9ª ed.. México: Editorial Médica Panamericana; 2007.
4. Ingraham J. Ingraham C. Introduction to microbiology. 2nd ed. California: Brooks/Cole-Thomson Learning, 2000.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica 3: Preparación de material para microbiología, limpieza y esterilización

Objetivos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	26 / 182

- Comparar los diferentes procesos de esterilización utilizados en el laboratorio de microbiología.
- Describir las diversas técnicas para la preparación del material a esterilizar por calor húmedo.

Aspectos teóricos

En microbiología, como en cualquier otra ciencia es indispensable el uso del método científico, por lo cual es necesario manejar para su práctica el menor número de variables posibles, entre las variables que se pueden controlar se encuentra el material utilizado dentro del laboratorio de microbiología.

En primer lugar, el material de vidrio que comúnmente se usa en el laboratorio de control microbiológico debe estar limpio, seco y libre de cualquier tipo de contaminantes, ya que la presencia de éstos aún en pequeñas concentraciones puede afectar los resultados analíticos. Otro paso importante es el enjuague del material, éste debe ser suficiente y adecuado usando para ello agua destilada con la finalidad de eliminar residuos de las soluciones detergentes, las cuales se ha demostrado que pueden inhibir el crecimiento de los microorganismos o bien alterar el pH de algunas reacciones.

Finalmente, para poder estudiar el comportamiento de los microorganismos en el laboratorio, el microbiólogo deberá contar, entre otras cosas, con material y medio de cultivo estériles que eviten la presencia de microorganismos indeseables que pudieran en un momento dado alterar los resultados obtenidos de un análisis microbiológico.

ESTERILIZACIÓN

La esterilización es el proceso de destruir todas las formas de vida microbiana; un objeto esterilizado, en el sentido microbiológico, está libre de microorganismos vivos. Los términos estéril, esterilizar y esterilización se refieren a la ausencia o destrucción completa de los microorganismos y no se utilizan en sentido relativo, una sustancia o un objeto están estériles o no están estériles, pero no semiestériles o casi estériles.

Los métodos de esterilización son por: calor (ya sea seco o húmedo), filtración, radiaciones y agentes químicos.

ESTERILIZACIÓN POR CALOR



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	27 / 182

La alta temperatura combinada con un alto grado de humedad es uno de los métodos más efectivos para destruir microorganismos. Es importante distinguir entre calor húmedo y calor seco en cualquier procedimiento de control microbiano; el calor húmedo mata a los microorganismos porque coagula sus proteínas y es más rápido y efectivo que el seco, que los destruye al oxidar sus constituyentes químicos. Los procedimientos prácticos se dividen convenientemente en dos categorías:

1. **El calor húmedo:** que comprende los métodos de esterilización por vapor a presión (autoclave) y la tinalización o esterilización fraccionada.
2. **El calor seco:** que comprende la esterilización con aire seco o caliente (horno) y la incineración.

ESTERILIZACIÓN POR FILTRACIÓN

Algunos materiales, particularmente los líquidos biológicos como el suero de los animales o las soluciones de sustancias como las enzimas y algunas vitaminas o antibióticos, son termolábiles, o sea, se destruyen por el calor; asimismo, otros agentes físicos como las radiaciones son perjudiciales para estos materiales e imprácticos para esterilizarlos, en consecuencia, queda la opción de hacerlo por filtración. El material filtrante es de diferente naturaleza y puede ser de asbesto, tierra de diatomeas o porcelana; actualmente el más usado corresponde a las membranas de éster de celulosa. La eliminación de los microorganismos está en función de la carga eléctrica y del tamaño de los poros del material filtrante; para su uso, en condiciones de asepsia, se coloca el material filtrante sobre el soporte de la unidad de filtración (que debe ser previamente esterilizada), se fija y posteriormente se hace pasar el líquido a través de la membrana o material filtrante, recolectándose el filtrado en un matraz.

Los filtros también se utilizan para esterilizar aire, y un ejemplo cotidiano en el laboratorio de microbiología corresponde al uso de las torundas de algodón que se emplean para tapar frascos, matraces, tubos y pipetas; el aire circula a través del algodón y los microorganismos que están suspendidos en el aire quedan atrapados en el algodón y no pasan al interior del material (ni tampoco salen del cultivo al exterior) a menos que el algodón este húmedo.

ESTERILIZACIÓN POR RADIACIONES

Las radiaciones más comunes que se usan para destruir a los microorganismos son:

1. **La luz ultravioleta.** Se utiliza principalmente para la esterilización de áreas y superficies, y cuya principal limitación es que debe ser absorbida para ser efectiva, no pasa a través del vidrio transparente u objetos opacos e irrita los ojos y la piel.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	28 / 182

- La luz infrarroja.** Se emplea para reducir la contaminación de ciertos alimentos y se aplica durante la preparación de los mismos; el efecto esterilizante de este tipo de radiaciones se debe a la energía térmica que imparte de manera rápida, y por ello oxidan los componentes celulares de los microorganismos.
- Radiaciones ionizantes.** Se utilizan para la esterilización de material quirúrgico sensible al calor y otros materiales usados en medicina.

ESTERILIZACIÓN GASEOSA

Algunos gases ejercen una poderosa acción letal sobre los microorganismos, ya que destruyen varias enzimas y estructuras que son vitales para la duplicación de los mismos. El óxido de etileno es un gas que se difunde a través de los materiales porosos y penetra fácilmente la mayoría de los plásticos, tiene gran utilidad en la esterilización de artículos desechables, como las jeringas de plástico, así como los instrumentos voluminosos, tales como las máquinas cardiopulmonares. La esterilización se lleva a cabo a una temperatura de 50 ± 2 °C, con una humedad relativa de 33% durante tres horas; los productos que han sido sometidos a este tratamiento pueden usarse hasta después de 24 horas de haber sido esterilizados, debido a que este gas es muy tóxico, especialmente para los tejidos. Finalmente, se debe recordar, además, que el material biológico utilizado en microbiología (bacterias, hongos, etc.) NO debe ser desechado del laboratorio sin previa esterilización, pues este material ya sea patógeno o no, está contribuyendo a un desequilibrio ecológico cuyas consecuencias no se pueden determinar.

Material y reactivos

Material

- Olla de presión
- Tripie
- Mecheros Fisher
- Guantes de asbesto
- 12 tubos de ensaye 13x100 con torunda.
- 12 tubos de ensaye 18x150 con torunda.
- 8 cajas de Petri.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	29 / 182

- Matraz Erlenmeyer de 1L con torunda.
- Pipetas de 5 y 10 mL.
- Aplicadores de madera.
- Algodón.
- Papel de estraza o Kraft.
- Gasa.
- Tijeras
- Pinzas de disección punta roma.

Servicios

- Electricidad.
- Agua.
- Gas.

Procedimiento

I. LAVADO

LIMPIEZA GENERAL U ORDINARIA

1. Colocar el material en recipientes que contengan soluciones detergentes apropiadas (de preferencia usar Dextrán), procurando que el material quede totalmente sumergido; para eliminar materia orgánica, dejar actuar durante 24 horas, si el material tiene sales someterlo a un ligero calentamiento con HCl concentrado por espacio de 30 minutos,
2. Lavar el material con la solución detergente, auxiliándose de escobillones en buen estado y de esponjas de celulosa o estropajos. No usar limpiadores abrasivos.
3. Enjuagar con abundante agua de la llave y al final con agua destilada por lo menos tres veces.

TRATAMIENTO SEVERO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	30 / 182

Si después del lavado ordinario en el material de vidrio permanecieran algunos contaminantes que se manifiesten por la presencia de residuos o porque la superficie del mismo no se humecta uniformemente, se recomienda sumergir el material en mezcla crómica o en ácido sulfúrico como a continuación se indica.

1. Observando las medidas de seguridad adecuadas, sumergir el material en mezcla crómica o en ácido sulfúrico durante 10-15 minutos.
2. Sacar el material y aplicarle el lavado ordinario como se indicó anteriormente.

II. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

1. Envolver con papel las cajas de Petri como lo indique el profesor, anotar en el papel el número de equipo y la fecha de preparación.
2. Poner en la boquilla de las pipetas un filtro de algodón, de tal manera que el aire pase libremente a través de él.
3. Envolver con papel cada pipeta, marcando en la envoltura el volumen de cada una de ellas.
4. Tapar cada uno de los tubos y matraces con torundas de algodón, siguiendo las indicaciones del profesor. Las torundas deben prepararse a la medida de la boca del matraz o tubo, no deben deformarse, ni ser forzada su entrada, ni de caerse al ser invertidos estos y deben llevar una cubierta de gasa para evitar que la pelusa contamine al medio de cultivo.
5. Colocar los tubos en un cesto de alambre o en un bote y cubrirlos con papel Kraft (esta envoltura protege los algodones y evita que durante la esterilización estos se humedezcan).
6. Los hisopos se preparan con aplicadores de madera y algodón, el cual debe ser enrollado con fuerza y en suficiente cantidad, de tal manera que no se desprenda ni presenta asperezas.
7. Todo el material debe ser identificado con su correspondiente etiqueta antes de ser esterilizado.

III. ESTERILIZACIÓN

ESTERILIZACIÓN POR CALOR HÚMEDO (15 LB, 121 °C X 15-20 MIN).

1. Este proceso se aplica al material que no resiste temperaturas arriba de 135° C (material de vidrio con torunda de algodón, jeringas desarmadas –no agujas-, recipientes con tapón de rosca –no cerrados fuertemente-, tapones de hule envueltos en papel).
2. Todo material a tratar en forma individual o conjunta debe cubrirse perfectamente con material permeable, resistente al calor, no debe usarse papel aluminio o celofán.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	31 / 182

3. Operar el esterilizador (autoclave) de acuerdo a las instrucciones del equipo. De manera general el procedimiento es el que se indica a continuación: meter el material en la autoclave, cerrarla, dejar calentar con la válvula abierta y esperar a que el aire del interior de la autoclave sea desplazado totalmente por el vapor de agua, lo que se habrá conseguido cuando a través de la válvula salga una columna continua de vapor de agua. Cerrar la válvula y esperar a que la presión suba hasta 15 lb/in² (15 psia) y una temperatura de 121 °C. Mantener estas condiciones de 15 a 20 minutos (condiciones generales requeridas para esterilizar el material).

ESTERILIZACIÓN POR CALOR SECO (180 °C durante una hora).

1. Este proceso se aplica a todo material cuya resistencia térmica sea superior a los 150 °C (material de vidrio o metal con cierre hermético, cera, vaselina, aceite, talco).
2. Todo material a tratar de forma individual o conjunta debe cubrirse perfectamente con papel aluminio o colocarse en recipientes de acero inoxidable. No usar fibras sintéticas o de algodón.
3. Al final del proceso dejar enfriar el material dentro del horno.

IV. PRUEBA DE ESTERILIDAD

Pueden utilizarse bioindicadores (por ejemplo, esporas de *Bacillus stearothermophilus*) o tiras indicadoras.

V. ALMACENAMIENTO

Debe guardarse el material esterilizado al resguardo del polvo, pasado un tiempo de 1 a 3 meses y dependiendo de las condiciones deberá ser esterilizado nuevamente.

VI. DOCUMENTACIÓN

Cada ciclo de esterilización debe registrarse en una libreta con los siguientes datos:

1. Fecha del proceso.
2. Condiciones del proceso (tiempo, temperatura y presión).
3. Material procesado.
4. Nombre y firma del operador.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	32 / 182

RECOMENDACIONES GENERALES

1. El material de vidrio que se utiliza en los análisis microbiológicos debe ser exclusivo para este fin.
2. Para el lavado ordinario usar soluciones detergentes alcalinas o neutras.
3. Para tratamiento severo utilizar mezcla crómica, ácido nítrico caliente, ácido sulfúrico, alcohol, hidróxido de potasio en alcohol o fosfato de sodio en solución acuosa.
4. Clasificar y separar el material contaminado del no contaminado y colocarlo en los lugares asignados para cada caso, en áreas físicas bien separadas.
5. El material contaminado debe colocarse en recipientes adecuados para su esterilización y lavado posterior.
6. El agar proveniente de matraces, tubos, cajas, etcétera, una vez esterilizado debe recolectarse en bolsas de plástico de alto punto de fusión para su eliminación posterior, no debe eliminarse por el drenaje.
7. El material desechable contaminado debe depositarse en recipientes especiales (ejemplo: bolsas de plástico de alto punto de fusión), y posteriormente esterilizarse, desecharse o incinerarse.
8. Las pipetas contaminadas inmediatamente después de su uso deben colocarse en recipientes que contengan soluciones germicidas, se les quita el algodón de la boquilla y se procede a su esterilización evitando depositar sobre ellas material que pueda quebrarlas. Finalmente debe someterse al procedimiento de lavado en forma manual.
9. Durante el lavado no usar fibras ni polvos, auxiliarse de escobillones en buen estado y de estropajos y/o esponjas.
10. Colocar el material en escurridores y/o canastillas. Dejar secar al aire o en una estufa.
11. Los portaobjetos y cubreobjetos luego de lavados y secados deben colocarse en un vaso con alcohol para desengrasarlos y posteriormente secarlos con papel seda o higiénico.

Reporte de Resultados

Con base en su bibliografía y el trabajo realizado, indicar si aplicó los métodos de esterilización adecuados para el material que preparó.
Indicar si el proceso de esterilización aplicado fue eficiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	33 / 182

Describir las dificultades a las que se enfrentó y los errores que cometió durante el desarrollo de esta práctica, así como las consecuencias de estos en el desarrollo de la siguiente práctica de laboratorio.

Cuestionario

1. ¿Qué es esterilización?
2. ¿Qué métodos de esterilización existen?
3. Mencione por lo menos tres métodos de esterilización por agentes físicos.
4. ¿En qué consiste la pasteurización y qué finalidad tiene?
5. ¿Qué tipo de esterilización se efectúa en la autoclave?
6. ¿En qué principio se basa el funcionamiento de la autoclave?
7. ¿Qué método de esterilización es el más recomendado para el siguiente material:
 - a) un medio de cultivo termolábil
 - b) un medio de cultivo termoestable
 - c) jeringa de vidrio
 - d) un medicamento termolábil cuya vía de administración es intravenosa
 - e) instrumental quirúrgico
 - f) material de curación contaminado
8. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por calor seco?
9. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por medio del óxido de etileno?
10. ¿Cuál es el fundamento de la esterilización por medio de radiaciones (UV, infrarroja, radiaciones ionizantes)?

Referencias

1. Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE. Microbiology: with diseases by body system. 4a ed. Boston: Pearson; 2014.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	34 / 182

2. Cornelissen CN. Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology. 1 Flc Crds edition. U.S.A.: LWW; 2015.
3. Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV, Clark, DP. Brock: Biología de los microorganismos. 14a ed. España: Pearson Addison Wesley; 2015.
4. Pommerville JC. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2007.

Práctica 4: Clasificación de los medios de cultivo microbiológicos y su utilidad en el diagnóstico

Objetivo

Analizar el fundamento de los principales tipos de medios de cultivo para bacteriología.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	35 / 182

Aspectos teóricos

“Un medio de cultivo es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros compuestos que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de los microorganismos”

Todos los organismos necesitan para su desarrollo:

1. Sustancias esenciales para la síntesis de sus constituyentes celulares.
2. Una fuente de energía para que realicen sus funciones vitales.
3. Condiciones ambientales óptimas

Clasificación de las bacterias de acuerdo con la fuente de carbono y energía

Tipo	Descripción	Ejemplo
Fotoautótrofos (fotolitótrofos)	Usan la luz como fuente de energía y CO ₂ como su principal fuente de carbono.	Tiobacterias verdes y púrpuras
Fotoheterótrofos (fotoorganótrofos)	Usan la luz como fuente de energía y compuestos orgánicos como su principal fuente de carbono.	Bacterias Púrpuras que no usan azufre
Quimioautótrofos (Quimiolitótrofos)	Usan el CO ₂ como su principal fuente de carbono; su energía la obtienen por la oxidación de compuestos inorgánicos, como amoníaco, nitrato, hidrógeno, nitrógeno atmosférico, metano, etc.	Bacterias que usan hidrógeno, azufre y desnitrificantes
Quimiheterótrofos (Quimiorganótrofos)	Usan compuestos orgánicos para la obtención de energía y como su principal fuente de carbono.	La mayor parte de las bacterias

Fuente: joklik, W. 1998



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	36 / 182

Es posible cultivar la mayoría de las especies de bacterias, hongos y algunos protozoarios de importancia médica en medios artificiales, pero no existe un medio de cultivo universal que permita el crecimiento de todos ellos.

Hay algunas especies que solo pueden cultivarse en animales de experimentación, por ejemplo, *Mycobacterium leprae* y *Treponema pallidum*.

Los virus, las *Clamidas* y las *Rickettsias* no se producen *in vitro*, si no tiene células de tejidos vivos.

UTILIDAD EN LOS MEDIOS DE CULTIVO:

- Aislamiento
- Identificación
- Propagación
- Conservación
- Recuerdo
- Estudios especiales

FACTORES DE MÁXIMA IMPORTANCIA EN LA FORMULACIÓN DE UN MEDIO DE CULTIVO.

1. Debe contener elementos nutritivos esenciales.
2. Debe tener un contenido de humedad satisfactorio.
3. Debe tener un pH adecuado.
4. La consistencia del medio debe ser favorable para los fines establecidos.
5. Debe crecer el microorganismo deseado, si es selectivo, los otros deben ser inhibidos.

REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES:

1. HUMEDAD



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	37 / 182

Al contrario de lo que sucede con los organismos superiores, cuyos integumentos especializados retienen el agua, el metabolismo de las bacterias depende de un ambiente en el que exista agua.

2. FUENTE DE CARBONO

Brinda energía a través de la oxidación y además proporciona componentes estructurales.

Las bacterias autotróficas (litotróficas) solo requieren agua, sales inorgánicas y dióxido de carbono para su desarrollo.

Las baterías heterotróficas (organotróficas) que exigen una forma orgánica para su crecimiento como los azúcares o hidratos de carbono.

Hidratos de carbono.

Monosacáridos	Polisacáridos	Alcoholes poli hídricos
Ribosa Ribulosa Xilosa Arabinosa Glucosa Fructuosa Galactosa Manosa	Sacarosa Maltosa Lactosa	Adonitol Dulcitol Manitol Sorbitol

3. FUENTE DE NITRÓGENO

Brinda nitrógenos para la síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y coenzimas. Muchos medios contienen la peptona como fuente de nitrógeno. Las peptonas son hidrolisados de proteínas (soya, carne, gelatina, caseína) por medio de una reacción ácida, alcalina o por digestión enzimática. Están construidas por mezcla de proteasas, polipeptidos y aminoácidos que son fácilmente asimilados por los



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	38 / 182

microbios en crecimiento; además, son solubles y de fácil incorporación a la mayoría de los medios.

4. FACTORES DE CRECIMIENTO

Se llaman factores de crecimiento aquellos compuestos orgánicos específicos que son necesarios en cantidades muy pequeñas y no pueden ser sintetizados por el microorganismo. Muchas de las bacterias heterotróficas son incapaces de crecer a menos que se le suministren factores de crecimiento- Estas sustancias que habitualmente se pronuncian con el medio de cultivo en forma de extractos de la levadura, carne, hígado, cerebro, sangre entera, sangre desfibrada, plasma o suero, incluyen vitaminas, aminoácidos, ácidos grasos, purinas y pirimidinas.

5. IONES INORGÁNICOS

Cofactores necesarios para las enzimas; almacén de energías; sistema de transporte de electrones.

Todas las bacterias requieren pequeñas cantidades de un cierto número de iones inorgánicos (además del nitrógeno, azufre y el fósforo presente en la mayoría de los nutrientes esenciales) tales como el potasio, el magnesio, el calcio, hierro, manganeso, cinc, cobalto.

6. SISTEMA AMORTIGUADORES

El pH del medio que expresa su concentración de iones hidrógeno, es extremadamente importante para el desarrollo de los microorganismos, la mayoría de ellos crecen a pH aproximadamente neutros, y se determina por medida colorimétrica o electrométrica.

Debido a que muchas bacterias elaboran productos metabólicos ácidos o básicos algunos componentes son incorporados al medio de cultivo para mantener el pH dentro del rango óptimo de crecimiento bacteriano. Una combinación de KH_2PO_4 (fosfato potásico monobásico) y K_2HPO_4 (fosfato potásico dibásico), o sustancias como las peptonas previenen una desviación del pH.

7. INDICADORES DE PH

Indicadores ácido base se añaden a menudo a los medios de cultivo con objeto de detectar variaciones de pH.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	39 / 182

Microorganismos sugeridos para el control de calidad de algunos medios comúnmente usados.

Medio	Organismo control	Incubación	Reacción esperada
Agar Sangre	<i>Streptococcus</i> Grupo A	Aerobiosis 24h	Cultivo beta hemólisis
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	"	Cultivo Alfa hemólisis
	<i>Listeria monocytogenes</i>	"	Cultivo Beta hemólisis
Agar Chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i>	Aerobiosis 24h con CO	Cultiva
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	"	Cultiva
Agar Hektoen	<i>Salmonella ssp.</i>	Aerobiosis 24h	Colonias verdes, Centros negros
	<i>Echerichia coli</i>	"	Colonias rosadas algo inhibidas
	<i>Shigella ssp.</i>	"	Colonias verdes
Agar DNasa	<i>Serratia marcescens</i>	Aerobiosis 24h	Zona clara alrededor (con HCl)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	"	Sin zona clara alrededor
Agar EMB (Levine)	<i>Echerichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Color verde metálico
	<i>Proteus mirabilis</i>	"	Cultivo Incoloro
Agar Macconkey	<i>Echerichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Colonias rosadas
	<i>Proteus mirabilis</i>	"	Cultivo Colonias incoloras
	<i>Streptococcus faecalis</i>	"	No Cultiva
Agar Manitol Sal	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Colonias Amarillas
	<i>Escherichia coli</i>	"	No Cultiva
Salmonella-Shigella	<i>Salmonella</i>	Aerobiosis 24h	Colonias incolora centro negro
	<i>Escherichia coli</i>	"	No cultiva
Thayer-Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Aerobiosis 24h con CO ₂	Cultivo Colonias incoloras
	<i>Escherichia coli</i>	"	No Cultiva
	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	No Cultiva

Fuente: Niño, H. 1993

8. AGENTES REDUCTORES

Cisteína, tioglicolato y otros son agentes reductores que se añaden a los medios para crear condiciones que permitan el desarrollo de los gérmenes microaerofílicos o anaeróbicos estrictos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	40 / 182

CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS POR SU COMPOSICIÓN.

1. MEDIOS EMPÍRICOS

La composición exacta de estos medios es desconocida al participar en ellas sustancias de descomposición compleja y variantes (extractos de carne, levadura, etc.).

2. MEDIOS SINTÉTICOS

Son medios químicamente definidos en los que se conoce su proporción exacta de cada componente, se emplean para estudios de metabolismo y crecimiento bacteriano.

3. MEDIOS SEMISINTÉTICOS

Su composición participan compuestos químicos puros y sustancias orgánicas de naturaleza química poco definida (extracto de levadura, En peptona). Son los más extensamente utilizados para el aislamiento e identificación de la mayoría de los microorganismos.

CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A SU CONSISTENCIA.

1. LÍQUIDOS

Los elementos nutrientes se encuentran en una solución acuosa y reciben el nombre de Caldos.

2. SÓLIDOS

Son medios líquidos a los que se les añade, sin alterar su valor nutritivo, una sustancia solidificaste.

3. SEMISÓLIDOS

Son medios líquidos a los que añade una concentración de agar baja, según la consistencia que se quiera obtener. Se utiliza principalmente para estudiar la mortalidad de los microorganismos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	41 / 182

SUSTANCIAS USADAS COMO AGENTES SOLIDIFICANTES PARA FORMULACIONES NO LIQUIDAS.

1. EL AGAR

Es un polisacárido extraído de ciertas algas marinas principalmente de la clase Rhodophyceae, en particular de la especie *Gelidium corneum*. Funde aproximadamente a 92 °C Solidifica a no más de 42 °C.

Es digerida por muy pocos microorganismos y su adición al medio no afecta sus características nutricionales ni su pH.

La concentración de agar para un medio sólido es del 2% y para un medio semisólido es de 0.05-0.75%.

2. LA GELATINA

Es una mezcla de proteínas libre de carbohidratos obtenida a partir de colágeno de la piel, cuero, tendones y huesos de animales. Forma un gel de buenas características a concentraciones del 12-15% que permiten usarla como soporte; Como pueden ser digerida por algunos microorganismos se usa el 3% para determinar características proteolíticas. Su punto de fusión es de 22 °C, quedando destruidas sus propiedades al alcanzar temperaturas superiores a los 100 °C.

3. PLASMA

Una variante de los medios sólidos son los medios condensados preparados a partir de materiales coagulables como el suero o la albumina de huevo u condensado en forma de pico de flauta a temperaturas cuidadosamente controladas entre 70 y 80 °C.

CLASIFICACIÓN DE ACUERDO A SU APLICACIÓN.

1. MEDIOS GENERALES O BÁSICOS

Contienen los nutrientes básicos que permiten el desarrollo de una gran variedad de microorganismos, Por ejemplo Caldo Nutritivo, agar nutritivo, etc.

2. MEDIOS ENRIQUECIDOS

Son medios básicos que se han enriquecido con aditivos como son líquidos corporales, vitaminas, aminoácidos y proteínas específicas. Por ejemplo Agar con sangre; agar chocolate, etc.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	42 / 182

Medios de enriquecimiento. Son aquellos medios líquidos selectivos que enriquecen la población de un microorganismo específico de una población mixta. Se les incorporan sustancias para inhibir el crecimiento de microorganismos distintos a aquellos para los que fueron ideados. Ejemplos Caldo selenito y Caldo tetrionato que son útiles para el enriquecimiento de especies de *Salmonella* y *Shigella*.

3. MEDIOS DIFERENCIALES

Son aquellos en los que se pone de manifiesto propiedades que un determinado tipo de microorganismo posee. Ejemplo agar sangre, agar SS.

La diferenciabilidad de muchos microorganismos se basa en la producción de ácidos o álcalis a partir de varios sustratos utilizando por ellos. Es por eso que muchos de estos medios incluyen indicadores de pH que permiten la detección visual de estos cambios. Ejemplo agar MacConkey, agar SS.

4. MEDIOS ESPECIALES O DE ENSAYOS

Son medios empleados para comprobar una o más características bioquímicas, se crearon con el fin de identificar y clasificar a los microorganismos según sus actividades metabólicas. Ejemplo SIM, TSI, LIA, etc.

5. MEDIOS PARA EL TRANSPORTE

Son medios semisólidos o líquidos, su función es la de mantener la viabilidad de los microorganismos durante varias horas, permitiendo así el aislamiento de especies poco resistentes después de transcurrido cierto tiempo entre la toma de muestra y la entrega en el laboratorio. Ejemplo Amies, Cary Blair, Stuart.

POSIBLES FUENTES DE ERROR EN LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

- Medio inadecuado.
- Pesaje erróneo.
- Material de vidrio mal lavado.
- Agua de mala calidad.
- Sobrecalentamiento.
- Esterilización inadecuada.
- No ajustar pH.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	43 / 182

- Distribución incorrecta.
- Inadecuado almacenamiento.

MÉTODOS PARA CONOCER EL BUEN ESTADO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO PREPARADOS

1. CONTROL DE ESTERILIDAD

Sirve para verificar que los medios de cultivos son estériles. Se toma un 5% de la partida al azar y se incuban por 48 h a 37 °C y 7 días a temperatura ambiente. Para probar la esterilidad de los medios selectivos es necesario inocular muestras de cada partida en un medio no inhibidor.

2. **CONTROL DE CALIDAD.** Determinar la capacidad del medio para respaldar el desarrollo de presuntos microorganismos y/o exhibir una respuesta bioquímica típica.

El pH debe estar dentro de un intervalo de ± 0.2 del indicado por el fabricante.

3. CONTROL DE CADUCIDAD

En el momento de preparar los medios es preciso anotar de forma visible sobre cada tubo, placa, frasco o matraz, el nombre del medio de cultivo, fecha de preparación y su fecha de caducidad. De esta forma será fácil en todo momento llevar un control de los medios en cuanto a su fecha de caducidad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	44 / 182

Microorganismos sugeridos para el control de calidad de algunos medios comúnmente usados.

Medio	Organismo control	Incubación	Reacción esperada
Agar Sangre	<i>Streptococcus</i> Grupo A	Aerobiosis 24h	Cultivo beta hemólisis
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	"	Cultivo Alfa hemólisis
	<i>Listeria monocytogenes</i>	"	Cultivo Beta hemólisis
Agar Chocolate	<i>Haemophilus influenzae</i>	Aerobiosis 24h con CO	Cultiva
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	"	Cultiva
Agar Hektoen	<i>Salmonella</i> ssp.	Aerobiosis 24h	Colonias verdes, Centros negros
	<i>Echerichia coli</i>	"	Colonias rosadas algo inhibidas
	<i>Shigella</i> ssp.	"	Colonias verdes
Agar DNasa	<i>Serratia marcescens</i>	Aerobiosis 24h	Zona clara alrededor (con HC1)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	"	Sin zona clara alrededor
Agar EMB (Levine)	<i>Echerichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Color verde metálico
	<i>Proteus mirabilis</i>	"	Cultivo Incoloro
Agar Macconkey	<i>Echerichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Colonias rosadas
	<i>Proteus mirabilis</i>	"	Cultivo Colonias incoloras
	<i>Streptococcus faecalis</i>	"	No Cultiva
Agar Manitol Sal	<i>Staphylococcus aureus</i>	Aerobiosis 24h	Cultivo Colonias Amarillas
	<i>Escherichia coli</i>	"	No Cultiva
Salmonella-Shigella	<i>Salmonella</i>	Aerobiosis 24h	Colonias incolora centro negro
	<i>Escherichia coli</i>	"	No cultiva
Thayer-Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Aerobiosis 24h con CO ₂	Cultivo Colonias incoloras
	<i>Escherichia coli</i>	"	No Cultiva
	<i>Staphylococcus aureus</i>	"	No Cultiva

Fuente: Niño, H. 1993



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	45 / 182

Caducidad de algunos medios de cultivo de agar en tubo, según la temperatura y seguridad de cierre en su almacenamiento.

Medio	Tapón no Hermetico 4°C semanas	Tapón no Hermetico Temp. ambiente semanas	Cerradura hermética, en bolsa de plástico Temp. ambiente meses	Tapón de rosca sellado Temp. ambiente meses
Agar inclinado	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Billis Esculina	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Fenilalanina	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Lisina-Hierro	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Mot-Indol- Ornitina	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Mueller-Hinton	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Nutritivo	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar O-F	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Sangre	3-4	1-2	2-4	3-6
Agar Triple Azúcar-Hierro	3-4	1-2	2-4	3-6
Urea de Christensen	3-4	1-2	2-4	3-6

fuelle: Niño, H. 1993



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	46 / 182

Caducidad de algunos medios en caja según temperatura de almacenamiento y protección.

Medio	Refrigerador 4°C sin bolsa de plástico	Refrigerador 4°C con bolsa de plástico
Agar Sangre	15 días	50 días
Agar Chocolate	15 días	60 días
Agar Thayer-Martin	15 días	60 días
Agar Mueller-Hinton	15 días	70 días
Agar MacConkey	15 días	70 días
Agar EMB	15 días	70 días
Agar CLED	15 días	70 días
Agar Sabouraud	21 días	90 días
Agar de Manitol-Sal	15 días	60 días
Agar S-S	6 días	10 días

Fuente: Niño, H. 1993



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	47 / 182

**Microorganismos Control utilizados en el control de calidad de medios en tubo
(pruebas bioquímicas).**

Medio	Organismo control	Incubación	Reacción esperada
Arginina decarboxilasa	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aerobiosis 24h	Crec. Color azuloso(+) Crec. Color amarillo(-)
Citrato de Simmons	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Crec. Color azul (+) No crec. Perm. verde(-)
Fenilalanina (FeCl ₃)	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Crec. Color verde(+) Crec. Color original(-)
Indol (Kovac's)	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aerobiosis 24h	Crec. Color rojo (+) Crec. sin color (-)
Agar de Kligler	<i>Escherichia coli</i> <i>Shigella flexneri</i>	Aerobiosis 24h	Acida en la superficie / profundidad ácida Alcalina en superficie / profundidad ácida
Agar de Lisina-Hierro	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Aerobiosis 24h	Púrpura en la superficie/ profundidad púrpura, H ₂ S. Púrpura en superficie / Amarillo en profundo Superficie roja/ profundi- dad amarilla
Lisina Decarboxilasa	<i>Salmonella typhimurium</i> <i>Shigella flexneri</i>	Aerobiosis 24h	Crec. color azuloso Crec. color amarillo
Indol- Ornitina Motilidad; Agar Semisólido	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aerobiosis 24h	Mot(+), Indol(+) Ornitina(+) Mot(-), Indol(-) Ornitina(-)
Agar Semisólido Motilidad	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Aerobiosis 24h	Crecimiento. medio nebuloso (+) Crecimiento. Sin despla- zamiento (-)
Nitrato (Griess)	<i>Escherichia coli</i> <i>A. calcoaceticus</i> , v. <i>Iwoffii</i>	Aerobiosis 24h	Crec. color rojo Crec. no color rojo
Dextrosa de O-F	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Aerobiosis <i>Staphylococcus aureus</i> <i>A. calcoaceticus</i> , v. <i>Iwoffii</i>	Aerobiosis 24h	Crec. Oxidativo (O) Crec. Fermentativo F Crec. Reacción alcalina
Azúcar Triple- Hierro	<i>Shigella flexneri</i> <i>Citrobacter</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aerobiosis 24h	Superficie alcalina / ácido en profundo Superficie ácida / ácido en profundo H ₂ S(+) Alcalina en superficie / alcalino en profundo
Urea de Christensen	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Rosa todo el medio Rosa sólo en superficie Crec. sin color
Voges Proskauer con reactivo	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24h	Crec. color rojo Crec. Permanece color

Fuente: Niño, H. 1993



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	48 / 182

Material y reactivos

Material

- 9 Matraces Erlenmeyer de 1 L
- 1 Tripie
- 1 Tela de alambre sin asbesto
- 1 Agitador de vidrio
- 2 Tubos (13x100) con agar nutritivo inclinado
- 2 Tubos (18x 150) con gelatina nutritiva o medio SIM
- 2 Tubos (13x100) con caldo nutritivo
- 10 Tubos (18x150) con agar nutritivo (resiembra del cepario)
- 2 Cajas de Petri con agar chocolate
- 2 Cajas de Petri con ASC 5%
- 2 Cajas de Petri con EMB
- 2 Cajas de Petri con agar nutritivo

Equipo

- Incubadora

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

La cantidad de medio de cultivo que deberá de emplearse por litro, está especificado en cada frasco, se hacen los cálculos necesarios para las cantidades deseadas y a continuación se pesan.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	49 / 182

Colocar el polvo en un matraz Erlenmeyer y añadir poco a poco el agua destilada; agitando constantemente para evitar que se formen grumos; para efectuar la agitación se utiliza un agitador o varilla de vidrio; la cantidad completa de agua se añade cuando todo el polvo se haya mojado bien; los medios líquidos o caldos se disuelven bien a temperatura ambiente.

Los medios de agar tienen que calentarse hasta punto de ebullición para que se disuelvan por completo. Esto puede realizarse de varias formas; para cantidades (hasta 300 mg.), el mejor procedimiento es calentar el matraz manteniendo contenido bien agitado para impedir que se queme.

Otro método satisfactorio que reduce el tiempo de calentamiento del medio es hervir tres cuartas partes de agua destilada y suspender el medio deshidratado en el resto de agua fría, teniendo cuidado de que todo el medio sea suspendido uniformemente, entonces la suspensión se añade al agua hirviendo hasta que la solución sea completa; también debe tenerse cuidado de que la ebullición no sea demasiado fuerte y en un momento dado pueda ocasionar que el medio se derrame. Los medios de gelatina se disuelven mejor calentándose hasta 50 °C en un baño de agua (baño María).

Los medios de agar y gelatina tienen que estar en una completa solución antes de verterlos en los recipientes en los que habrán de esterilizarse.

Cuando se logra la disolución completa de los medios se prepara una torunda de algodón y gasa para el matraz en el cual se encuentra contenido el medio, se introduce en el autoclave para esterilizarlos; previamente marcados para su identificación.

Los medios de cultivo de agar están propensos a mostrar un precipitado, bajo una esterilización o calentamiento prolongado. La repetida fusión del agar solidificado o el mantenerlo en fusión a alta temperatura pueden, así mismo, causar la formación de un precipitado en el medio de cultivo.

Un medio que contenga agar también puede formar un precipitado floculante si el medio líquido se mantiene en un baño de agua (baño María), a una temperatura de 43 a 45 °C, por un tiempo superior a los 30 min. Este precipitado de agar floculante, no obstante puede disolverse calentando de nuevo el medio.

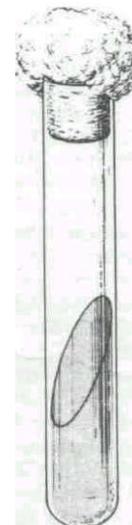


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	50 / 182

Un calentamiento del medio también da como resultado un aumento de la acidez. Por un calentamiento prolongado es posible destruir las propiedades de gelatinización y esta destrucción se acelera a medida que se aumenta la acidez.

Cumplido el tiempo necesario para la esterilización se saca de la autoclave e inmediatamente se coloca en los recipientes adecuados. Sus cajas de Petri y los tubos de ensayo estériles se destapan cerca de la flama de un mechero y se le agrega el medio para evitar cualquier contaminación.

El caldo nutritivo se distribuye en los tubos de ensayo estériles y se colocan en posición vertical. El agar nutritivo se distribuye en las cajas de Petri (Fig. 4.1) y en los tubos de ensayo estériles (Fig.4.2), estos últimos se colocan en posición inclinada aproximadamente a unos 45 °C, permitiendo que se solidifiquen en esta posición (Fig. 4.3). Al colocar los tubos en esta posición se debe tener cuidado de que el ángulo de inclinación sea el adecuado para impedir que la torunda se moje y pueda contaminar el medio.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	51 / 182

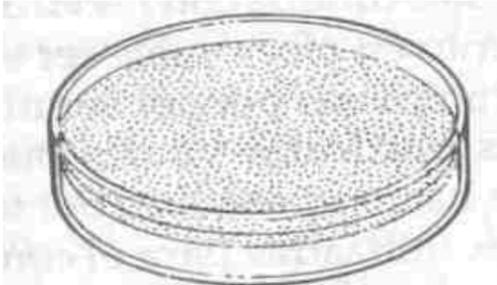


Fig. 4.1 Agar en caja

Fig.4.3 Agar inclinado

La gelatina nutritiva se distribuye en los tubos de ensaye estériles colocándolos en posición vertical, el medio SIM también se coloca en posición vertical. El agar sangre se prepara colocando la sangre desfibrinada estéril en el matraz que contiene el medio base para agar sangre ya estéril y se mezcla con un movimiento ligero formando un ocho, sobre la mesa de trabajo, a continuación se distribuye a las cajas de Petri. Debe asegurarse de que el medio base se enfríe justamente abajo de 56 °C, antes de agregarle la sangre (los glóbulos rojos sanguíneos se hemolizan a 56 °C y las proteínas se precipitan a 65 °C).

Se pueden esterilizar al mismo tiempo los medios líquidos en tubos de ensaye para evitar contaminaciones posteriores, cuando no se cuenta con un sistema de flujo laminar para el vaciado posterior.

El agar chocolate es básicamente el mismo que el agar sangre pero con la adición de sangre a la base, mientras esta última se mantiene aun a 80 °C; las proteínas precipitaran, los glóbulos rojos se lizarán y la hemoglobina se convertirá en hematina, haciendo con ella nutrimentos más fácilmente accesibles para el crecimiento de los microorganismos más exigentes.

Por lo general la siembra de microorganismos en medios de cultivo semisólidos y sólidos se utiliza para la identificación por pruebas bioquímicas.

Reporte de Resultados



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	52 / 182

Indique las dificultades y posibles fuentes de error al preparar medios de cultivo analizando las consecuencias y registrándolos en un cuadro que incluya los siguientes campos.

Medio de cultivo	Error	Consecuencia

Cuestionario

- Defina qué es un medio de cultivo y cuál es su utilidad.
- ¿Cómo se clasifican los medios de cultivo de acuerdo a su consistencia?
- ¿Qué sustancias se emplean para modificar la consistencia de los medios de cultivo?
- Mencione las propiedades fisicoquímicas del agar.
- Qué utilidad tiene cada uno de los siguientes tipos de medios de cultivo:
 - Líquido
 - Semisólido
 - Sólido
- Explique en qué consisten los siguientes medios de cultivo y cite tres ejemplos de cada uno:
 - Básicos
 - Enriquecido
 - Selectivo y/ o diferencial
 - Especial o de ensayo
- ¿Cuál es la diferencia entre el agar sangre y el agar chocolate?
- Indique la forma correcta de disolver un medio de cultivo que contenga agar.
- ¿Qué precauciones deben tomarse en cuenta al preparar un medio de cultivo?
- Realice una tabla para los siguientes medios de cultivo: EMB, Mac Conkey, Sal y Manitol, S- 110, SS, AN, ASC 5%, Agar Chocolate, Agar verde brillante, Agar tioglicolato, Agar Mueller Hinton y Agar base leche. Dicha tabla deberá de contener la siguiente información:
 - Nombre del medio de cultivo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	53 / 182

- b) Clasificación de acuerdo a su composición química
- c) Composición química
- d) Fundamento del medio
- e) Utilidad
- f) Interpretación

Referencias

1. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico, Texto y atlas a color. México: Médica Panamericana; 2009.
2. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Edit. Médica Panamericana; 2003.
3. Tortora G, Funke B, Case C. Microbiology an introduction. 8th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2004.
4. Mims C, Playfair J. Microbiología Médica. 2ª Ed. España: Harcourt Brace; 1999.
5. Murray RP. Microbiología Médica. 2ª Ed. España: Harcourt Brace; 1999.
6. Lynch MJ. Métodos de Laboratorio. 2ª. Ed. México: Editorial Interamericana; 1972.
7. Brock TD. Biología de los microorganismos. 5ª. Ed. Prentice Hall; 1988.
8. Stainer DA. Microbiología. 2ª. Ed. Aguilar: España; 1981.
9. Ingraham LJ. Introducción a la Microbiología. 1ª. Ed. Editorial Reverté, S.A; 1998.
10. Davis BD, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg HS. Tratado de Microbiología. 4ª ed. España: MASSON; 1996.
11. Delaat, AN. Microbiología. 2ª ed. México: Editorial interamericana; 1985.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	54 / 182

Práctica 5: Siembras

Objetivos

- Aprender la técnica de siembra adecuada dependiendo de la consistencia del medio de cultivo y la finalidad de dicha siembra (aislar, crecimiento masivo, enriquecimiento, conteo semicuantitativo y/o metabolismo bacteriano)
- Manipular los medios de cultivo en placa para obtener colonias aisladas mediante el procedimiento de siembra en cuadrantes (agotamiento e inóculo o siembra en T) y en tubo (medios líquidos, sólidos y semisólidos)

Aspectos teóricos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	55 / 182

En el laboratorio de microbiología todas las manipulaciones deben ser llevadas a cabo de tal modo que se impida la contaminación en el área de trabajo; los procedimientos utilizados se conocen como técnica aséptica, ésta tiene un doble objetivo a) evitar que el operador se contamine con microorganismos procedentes de las muestras o cultivos y b) evitar la contaminación de las muestras y cultivos con microorganismos procedentes del ambiente o del propio operador.

Principios fundamentales de la técnica aséptica:

- Limpiar el área de trabajo antes y después de la sesión de laboratorio con la solución sanitizante.
- Trabajar siempre al lado de la flama del mechero. Esta flama crea a su alrededor una atmósfera estéril y además se utilizará para esterilizar o flamear el material usado durante la siembra (asas bacteriológicas)
- Las asas deben esterilizarse antes de utilizarlas y una vez esterilizadas deben enfriarse antes de tomar la muestra de microorganismos con objeto de no destruirlos con el calor. El asa se enfría sobre el agar o sobre el material de vidrio (en zonas estériles del material de vidrio)
- Después de utilizar las asas se vuelven a esterilizar.
- Las bocas de los tubos y matraces de vidrio se flamean ligeramente una vez destapados antes y después de la inoculación.
- Durante la inoculación los tapones se mantienen en la mano sujetándolos de la parte que no entra en contacto con los tubos y matraces.
- Siempre que sea necesario abrir un tubo, debe mantenerse en posición inclinada para que el riesgo de contaminación sea mínimo.
- Las tapas de las placas de Petri nunca deben colocarse sobre la mesa de trabajo.

El método de siembra va a depender de dos factores:

1. La consistencia del medio de cultivo: Líquido, semisólido, sólido (en placa o en tubo)
2. La finalidad de la siembra: Aislar, hacer conteos, pruebas con antibióticos o agentes químicos, metabolismo bacteriano, etc.)

SIEMBRAS

SIEMBRA EN PLACA DE AGAR

Dependiendo de la finalidad que se persiga existen varias técnicas de siembra:

- **Aislamiento.** Siembra en "T" o por cuadrantes o por agotamiento de inóculo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	56 / 182

- **Siembra masiva**
- **Siembra para recuentos semicuantitativos**

SIEMBRA EN TUBO

Depende de la consistencia del medio:

- **Líquido:** Por dispersión o punto de contacto.
- **Semisólido:** Punción con asa recta.
- **Sólidos:** Siembra por picadura y estría o estría en pico de flauta

Material y reactivos

Material

- Mechero
- Asa recta
- Asa en aro
- Medios de cultivo elaborados en la práctica anterior

Material biológico

Cepas sugeridas por el asesor (cultivos puros)

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	57 / 182

Trabajar siempre con técnicas asépticas (Ver aspectos teóricos)

TOMA DE INÓCULO

1. Esterilizar el asa bacteriológica colocandola en un ángulo de 45° en la periferia de la flama del mechero hasta que tome un color rojo vivo en las tres cuartas partes del filamento del asa.
2. Tomar el tubo de la cepa con la mano izquierda y retirar el tapón con los dedos anular y meñique de la mano derecha sin que estos toquen la parte del tapón que va dentro del tubo.
3. Flamear la boquilla del tubo.
4. Introducir el asa tocando las paredes del tubo para enfriarla o tocar un extremo del agar donde no haya crecimiento.
5. Tocar con el asa el crecimiento (no debe ser muy denso el inóculo). Retirar el asa, flamear el tubo y tapar.

SIEMBRA EN PLACA DE AGAR.

TÉCNICA DE AISLAMIENTO POR CUADRANTES (3 CUADRANTES) O AGOTAMIENTO DEL INÓCULO

1. Tomar la placa Petri con la mano izquierda por la base con los dedos medio a meñique y la tapa con los dedos pulgar e índice. Abrir la placa cerca del mechero.
2. Descargar en un primer cuadrante masivamente, hasta la mitad de la placa. Tapar la caja.
3. Girar la placa 90°.
4. Esterilizar el asa. Enfriar tocando una parte de la periferia del agar (alejada de la parte donde se hizo la descarga).
5. Tocar con el asa el primer cuadrante tres veces y estriar el segundo cuadrante hasta la mitad de la caja. (2º cuadrante)
6. Nuevamente esterilizar el asa como se procedió anteriormente y realizar un 3er. Cuadrante (la estría es más abierta de manera que se obtengan colonias aisladas)

SIEMBRA EN TUBOS



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	58 / 182

LÍQUIDOS (CALDOS)

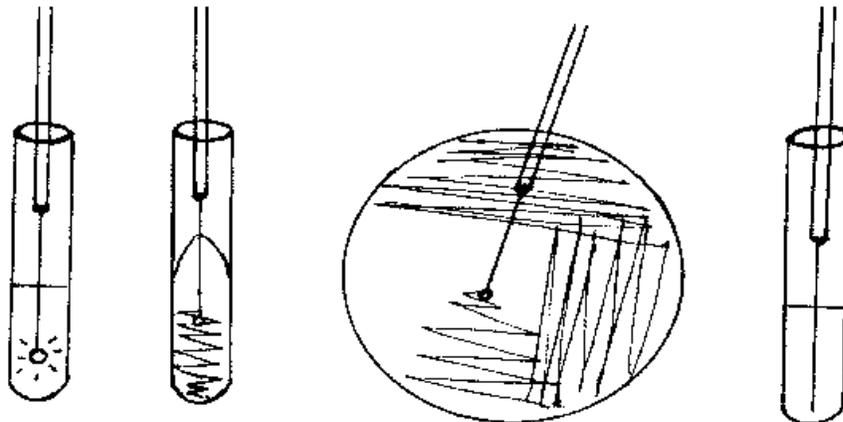
- Difusión (Punto de contacto): Inclinar el tubo en un ángulo de 30°, colocar el inóculo tocando la superficie interna del vidrio por encima del punto donde el medio forma un ángulo agudo. Colocar en posición vertical. El inóculo queda cubierto por el medio difundiendo el crecimiento.
- Dispersión: Colocar el inóculo rotando el asa dentro del medio de cultivo.

MEDIO SEMISÓLIDO

- Usar Asa recta para tomar el inóculo.
- Sembrar el medio por punción hasta las tres cuartas partes del tubo y retirar el asa.(tratar de hacerlo por la misma vía de punción)

MEDIOS SÓLIDOS (AGARES)

- **Fondo profundo.** Usar asa recta. Punción y estría en pico de flauta
- **Pico de flauta.** Estriar la superficie del agar en forma de zig-zag. Puede usar asa recta o en arillo.



Reporte de resultados

SIEMBRA EN PLACA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	59 / 182

- Se espera obtener colonias aisladas que se reportaran como se indica en la práctica 6

SIEMBRA EN TUBO

- Se reporta de acuerdo a las indicaciones de la práctica 6

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. Describa detalladamente las condiciones necesarias para el manejo adecuado de los tubos de ensayo para una siembra.
2. Describa la forma correcta de manipular una caja de Petri para realizar una siembra.
3. ¿Qué importancia tiene la siembra correcta de microorganismos?
4. Mencione las posibles formas de siembra en los medios de cultivo:
 - a) Líquido
 - b) Semisólido
 - c) Sólido en tubo de ensayo
 - d) Sólido en caja de Petri



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	60 / 182

5. Describa que es un cultivo
6. ¿Cómo cultiva a un microorganismo anaerobio?
7. ¿De qué manera siembra dos cepas de microorganismos diferentes, en un medio de cultivo en una sola caja de Petri, si desea obtener colonias aisladas de ambos?
8. Qué tipo de utensilio se usa para transferir la muestra o cultivo al medio que se desea inocular.
9. Describa la técnica de vaciado en placa.
10. Mencione tres métodos para obtener cultivos puros.

Referencias

1. Brooks GF, Morse SA, Carroll KC, Mietzner TA y Butel JS. Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica. 25ª ed. México: McGraw-Hill; 2011.
2. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica 6: Características macroscópicas de cultivos (morfología colonial)

Objetivo

Diferenciar las principales características de crecimiento de los microorganismos en medios sólidos, semisólidos y líquidos.

Aspectos teóricos



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	61 / 182

Una bacteria que se siembra en un medio de cultivo sólido quedará prácticamente fija y al reproducirse dará origen a millones de células reunidas en una masa observable a simple vista, a este conglomerado de bacterias se le conoce como “colonia bacteriana” y posee características morfológicas útiles para el aislamiento primario de la bacteria que le dio origen.

La interpretación de los cultivos primarios después de 24 a 48 horas de incubación requiere de una considerable habilidad, a partir de las observaciones iniciales, el microbiólogo debe evaluar el crecimiento de las colonias y decidir si son necesarios procedimientos adicionales.

Esta evaluación se hace observando las características y el número relativo de cada tipo de colonia recuperado en medios de agar, así como determinando la pureza y coloración de Gram y la morfología de las bacterias en cada tipo de colonia así como observando los cambios en el medio que rodea dichas colonias, los cuales reflejan actividades metabólicas específicas de las bacterias recuperadas.

La inspección de cultivos se lleva a cabo sosteniendo la placa en una mano y observando la superficie del agar, cada placa debe estudiarse con cuidado ya que las bacterias inicialmente recuperadas de muestras a menudo están en un cultivo mixto y puede haber una variedad de tipos de colonias, colonias puntiformes de bacterias que crecen lentamente pueden pasarse por alto entre colonias más grandes, en particular si el crecimiento tiene tendencia a diseminarse sobre la superficie de la placa. Durante el examen las placas deben inclinarse en varias direcciones, con una iluminación directa brillante, de modo que la luz se refleje desde varios ángulos. (Fig. 6.1) se recomienda el uso de una lupa o microscopio para disección como ayuda para detectar colonias diminutas o inmaduras y observar mejor sus características.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	62 / 182

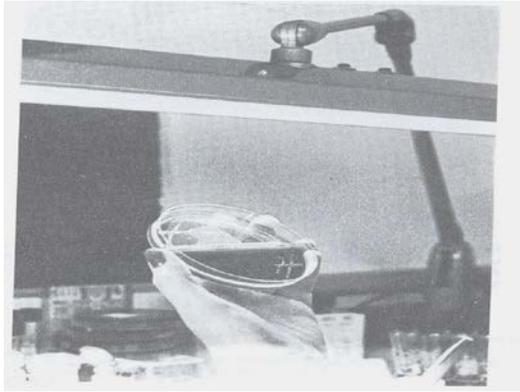


Fig. 6.1. Técnica para examinar un cultivo en placa con luz reflejada⁴.

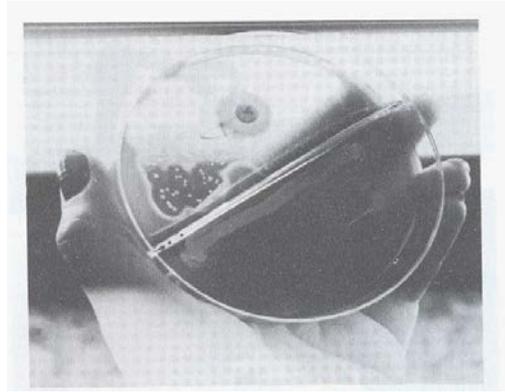


Fig. 6.2. Técnica para examinar un Cultivo de placa usando luz transmitida; útil para estudiar patrones hemolíticos⁴.

Las placas de agar sangre también deben examinarse con transiluminación con una luz brillante por detrás de la placa para detectar reacciones hemolíticas en el agar (Fig. 6.2), el tipo de hemólisis dependiendo del microorganismo puede ser:

1. Alfa. Se observa como un aclaramiento parcial de sangre alrededor de las colonias con coloración verde del medio; el contorno de los eritrocitos se encuentra intacto.
2. Beta. Se observa una zona de aclaramiento total de sangre alrededor de las colonias debido a la lisis de los eritrocitos
3. Gamma. No hay ningún cambio en el medio alrededor de la colonia; no hay lisis o coloración de los eritrocitos.
4. Alfa prima. Se observa un halo de lisis incompleta inmediatamente alrededor de las colonias con una segunda zona de hemólisis completa en la periferia.

LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS MÁS IMPORTANTES DE UNA COLONIA EN AGAR, SON LAS SIGUIENTES:

1. Tamaño: se mide en milímetros.
2. Forma de la colonia: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide, como en huso. (Fig. 6.3)
3. Borde de la colonia: entero, ondulado, lobulado, lacerado, filamentoso, rizado. (Fig. 6.3)
4. Elevación: elevada, plana, convexa, pulvinada, embonada, umbilicada. (Fig. 6.3)



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	63 / 182

5. Superficie: Lisa, brillante, radial, concéntrica, rugosa.
6. Luz transmitida: transparente u opaca.
7. Luz reflejada: brillante o mate.
8. Color de la colonia: depende del medio de cultivo y de las condiciones de incubación; en algunos casos presentan pigmentación propia como resultado de su metabolismo, la cual es constante y con valor diferencial.
9. Otras: Las que dependen específicamente del medio.
10. Textura: Seca, viscosa, pastosa, cremosa, algodonosa, etc.

EN MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDO O SEMISÓLIDO, NO HAY FORMACIÓN DE COLONIAS, LAS CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO OBSERVADAS SON:

1. Caldo de nutrientes:
Superficie de crecimiento: Floculenta, anillada, peliculada y membranosa.
2. Siembra por picadura en medio de cultivo sólido o semisólido:
Forma de crecimiento: Filiforme, perlada, papilar, vellosa, arborescente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	64 / 182

Forma

puntiforme



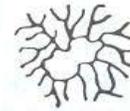
irregular



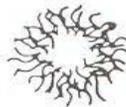
circular



rizoide



filamentosa



como huso

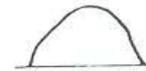


Elevación

elevada



pulvinada



plana



umbonada



convexa

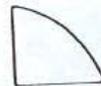


umbilicada



Margen

entero



lacerado



ondulado



filamentoso



lobulado



rizado



Fig.6.3 Características Morfológicas Macroscópicas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	65 / 182

Material y reactivos

Material

- Asa bacteriológica.
- Lupa.
- Mechero.

Material biológico

- Cultivos elaborados en la práctica anterior.

Servicios

- Agua.
- Gas.

Procedimiento

Observar y registrar la morfología macroscópica (colonial) de los cultivos realizados en la práctica anterior, considerando las siguientes recomendaciones:

1. Situarse en un lugar bien iluminado, cerca de la flama del mechero y evitando corrientes de aire.
2. La colonia a observar debe estar completamente separada de las otras (aislada)
3. Para observar el borde de la colonia claramente puede utilizar una lupa.
4. La consistencia de la colonia se determina con ayuda del asa estéril.
5. Si alguna característica de la colonia no se observa claramente a través de la caja de Petri, esta última puede abrirse junto a la flama del mechero.
6. Realizar un cuadro para registrar la morfología colonial, anotando los siguientes datos:
 - a) Nombre del medio de cultivo.
 - b) Nombre del microorganismo en caso de conocerlo.
 - c) Tamaño de la colonia (diámetro de la colonia en mm)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	66 / 182

- d) Forma de la colonia.
- e) Superficie.
- f) Color de la colonia.
- g) Luz transmitida.
- h) Luz reflejada.
- i) Elevación.
- j) Borde.
- k) Otras características que dependan específicamente del medio de cultivo.
- l) Textura, tocar la colonia con el asa para determinar si es seca, viscosa, cremosa, etc.

Reporte de resultados

Registrar la morfología macroscópica (colonial) de los cultivos realizados en la práctica 5 describiendo las características de cada microorganismo.

Medio de cultivo	Microorganismo	Morfología macroscópica (características)

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	67 / 182

Cuestionario

1. ¿Qué es una colonia?
2. Explique cómo se determina la consistencia de una colonia.
3. Diga las diferencias entre las colonias desarrolladas en un medio enriquecido y en uno selectivo.
4. Enumerar las principales características tomadas en cuenta para determinar un crecimiento colonial.
5. ¿De qué forma observa si un crecimiento en agar sangre presenta hemólisis?
6. Describa como se observan los siguientes tipos de hemólisis:
 - a) Alfa
 - b) Beta
 - c) Gamma
 - d) Alfa prima
7. Mencione que otras reacciones se dan en los siguientes medios de cultivo sólidos utilizados en la identificación de bacterias:
 - a) Agar sal y manitol
 - b) Agar leche
 - c) EMB
8. Describa la morfología colonial de:
 - a) *E. coli* en agar EMB
 - b) *S. aureus* en agar Sal y manitol
 - c) *P. aeruginosa* en agar nutritivo
9. ¿De qué forma reporta la luz transmitida de una colonia?
10. ¿De qué forma reporta la luz reflejada de una colonia?

Referencias



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	68 / 182

1. Cowan, S:T. y Steel, K:J. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª ed. México: Compañía Editorial Continental S.A, 1981.
2. Delaat, A.N.C. Microbiología. 2ª ed. México: Editorial interamericana, 1985.
3. Finegold, S.M, Martin W.J. Barley and Scott's .Diagnostic Microbiology. 8th ed. U.S.A. The C. V. Mosby Company. 1990.
4. Koneman, E.W. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. 2008.
5. Mac Faddin, J. Pruebas Bioquímicas para la Identificación. Bacterias de Importancia Clínica. 3ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. 2003.
6. Sancho, J. Guinea, J. Pares, R. Microbiología Analítica Básica. España. Editorial JIMS. 1980.
7. Tood- Sanford. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. 6ª ed. España: Editorial Salvat. 1981.
8. Braude. A. et. al. Microbiología Clínica. México: Editorial Médica Panamericana. 1984.
9. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	69 / 182

Práctica 7: Morfología microscópica (Tinciones)

Objetivo.

Conocer los diferentes tipos de tinciones y colorantes para realizar el análisis microscópico de una muestra, observando la morfología microscópica del microorganismo y sus afinidades tintoriales.

Aspectos teóricos:

La célula bacteriana tiene una pared externa, gruesa, que tiene muy poca afinidad por las tinciones y no es permeable a ellas. Durante la elaboración de los frotis sobre las laminillas, esta barrera se altera de forma tal que la tinción puede difundirse a través de la pared celular y el protoplasma se mezcla con ella. La fijación de los frotis tiene como propósito matar al microorganismo y unirlo al portaobjetos, preservando el estado natural del microorganismo con distorsiones mínimas.

Las tinciones sirven para demostrar la estructura y morfología de las bacterias,

TIPOS DE COLORANTES

En las tinciones utilizamos colorantes que son sales compuestas de un ión positivo y un ión negativo, el ión colorido recibe el nombre de cromóforo; así, tenemos tres tipos de colorantes:

BÁSICOS (CATIONICOS). El ión colorido (cromóforo) es positivo (catión colorido y anión incoloro). Tiñen componentes ácidos

ÁCIDOS (ANIÓNICOS). El ión colorido (cromóforo) es negativo (anión colorido y catión incoloro). Tiñen componentes básicos.

NEUTROS. Sal compuesta de un colorante ácido y un colorante básico.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	70 / 182

TINCIONES

De acuerdo a los fines para los que son utilizadas y los tipos de colorantes empleados, las tinciones pueden dividirse en varios grupos:

TINCIÓN SIMPLE: Se hacen empleando un solo colorante y se usan por lo general sólo para resaltar las características morfológicas más marcadas de la célula bacteriana; el valor de esta clase de tinción es su simplicidad y facilidad de empleo.

TINCIÓN DIFERENCIAL: Se usan dos o más colorantes y uno de ellos sirve de contraste. Se denominan diferenciales porque discriminan ciertas características y permiten agrupar a los microorganismos; ejemplos: Tinción de Gram y Tinción de Ziehl Neelsen.

Una de las coloraciones más importantes es la tinción de Gram, la cual separa las bacterias en dos grupos, Gram positivos y Gram negativos.

La técnica se basa en la decoloración del cristal violeta por alcohol-acetona y un posterior contraste con safranina. Se considera que las reacciones de los colorantes con las bacterias dando una reacción Gram positiva, se debe a la presencia de un complejo de ribonucleato de magnesio-proteína, que no existe en las Gram negativas. Otras teorías explican la reacción de Gram, como una diferencia en el punto isoeléctrico del contenido celular entre las bacterias Gram positivas y las Gram negativas, o debido a una permeabilidad diferencial para el complejo soluble en el alcohol de iodo-colorante (El complejo cristal violeta-iodo, es retenido en la pared celular por un compuesto lipoproteico poliglicerofosfato).

TINCIÓN ESPECIAL. Se usa para resaltar características o estructuras específicas; gránulos metacromáticos, cápsulas, flagelos, esporas.

Los mordientes son necesarios para la tinción de ciertas estructuras especiales como cápsulas, flagelos y paredes celulares que tienen poca afinidad tintorial. El proceso consiste en el tratamiento de las células antes, después o durante la tinción con sustancias que tienen afinidad por el material celular y por la tinción y unen a ambas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	71 / 182

Material y reactivos

Material

- Portaobjetos
- Asa bacteriológica
- Mechero buncen
- Papel seda

Material biológico

- *Klebsiella pneumoniae*
- *Corynebacterium sp.*
- *Mycobacterium phlei*
- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

Reactivos

- Cristal violeta.
- Lugol.
- Alcohol-acetona.
- Safranina.
- Carbofucsina.
- Alcohol-ácido.
- Azul de metileno boratado.
- Azul de metileno.
- Verde de malaquita.
- Colorante de Albert.
- Rojo Congo.
- Mordiente de cápsula.
- Aceite de inmersión.

Equipo

- Microscopio óptico de campo claro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	72 / 182

Servicios

- Electricidad.
- Agua.
- Gas.

Procedimiento

I. PREPARACIÓN DE FROTIS

CULTIVOS LÍQUIDOS

1. Si el cultivo es líquido tómese una asada y extiéndase sobre el portaobjetos.



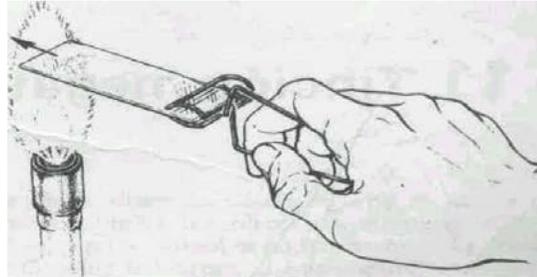
2. Déjela secar al aire.

CULTIVOS SÓLIDOS

1. Si el cultivo es sólido, ponga primero una gotita de agua en el portaobjetos con el asa y mézclela con la muestra.
2. Esterilice el asa.
3. Deje secar su frotis al aire.
4. Fije su preparación pasándola algunas veces sobre la flama del mechero, teniendo cuidado de no sobrecalentarla.



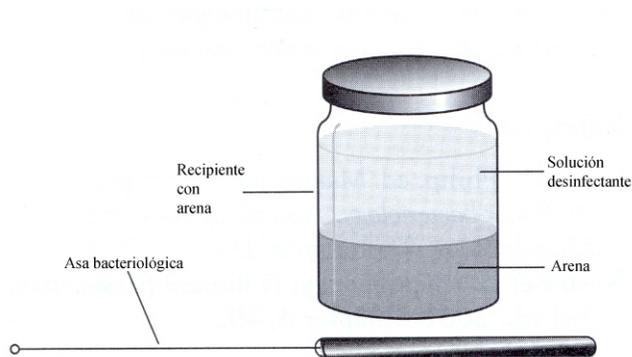
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	73 / 182



¡ATENCIÓN!

Con el propósito de evitar salpicaduras al esterilizar el asa, luego de realizar el frotis con la micobacteria o cualquier otro material contaminante que chisporrotee al colocar el asa a la flama del mechero (por ejemplo, luego de inocular el tubo de Hugh-Leifson con sello de aceite mineral):

1. Frotar el asa en arena contenida en un recipiente de arena con solución desinfectante como se muestra en la siguiente figura.
2. Esterilizar el asa en la flama del mechero.



TINCIONES

I. TINCIONES DIFERENCIALES

Tinción de Gram

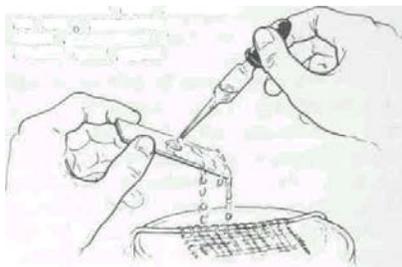
1. Cubrir su frotis con cristal violeta por un minuto.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	74 / 182



2. Lavar con agua de la llave.
3. Aplicar lugol por un minuto.
4. Lavar con agua y secar rápidamente.
5. Decolorar por de 7 a 8 segundos con la mezcla alcohol-acetona.



6. Lavar y dejar secar.
7. Contrastar con safranina durante 30 segundos.
8. Lavar con agua y dejar secar.
9. Observar al microscopio a inmersión.

NOTA: El tiempo de aplicación de cristal violeta, de alcohol-acetona y la safranina pueden ser modificados a criterio, dependiendo de la maduración de los colorantes y del aspecto que tenga la preparación al microscopio (Fenómeno de añejamiento de los colorantes)

Tinción de Ziehl Neelsen

1. Agregar carbolfucsina al frotis calentando a emisión de vapores por 5 minutos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	75 / 182



2. Lavar con agua.
3. Decolorar con alcohol-ácido hasta eliminar el colorante aproximadamente un minuto.
4. Lavar con agua.
5. Agregar colorante de contraste azul de metileno por 30 segundos.
6. dejar secar y observar con el objetivo de inmersión.

II. TINCCIONES ESPECIALES

COLORACIÓN DE ESPORAS

La esporulación es un mecanismo especializado de supervivencia que han desarrollado algunos bacilos generalmente Gram positivos como los géneros *Bacillus* y *Clostridium*. Las esporas presentan mayor resistencia al efecto letal del calor, desecación, alteraciones químicas e irradiaciones.

1. Hacer un frotis y fijar al calor.
2. Agregar verde de malaquita y calentar la preparación a emisión de vapores por espacio de un minuto, cuidar que no se seque el colorante.
3. Lavar con agua.
4. Cubrir con safranina por 30 segundos.
5. Dejar secar y observar a inmersión.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	76 / 182

COLORACIÓN DE CÁPSULAS

La cápsula bacteriana es una estructura laxa semejante a un gel que varía en grosor, densidad y adherencia a la pared celular. Esta cápsula es demostrada por tinciones especiales; la sustancia capsular es un polisacárido o poliurónido relacionado con la virulencia del microorganismo.

Técnica de rojo congo

1. Coloque una gota de rojo Congo y *K. pneumoniae* en un portaobjetos.
2. Hacer una suspensión de la cepa.
3. Fijar.
4. Adicionar mordiente de cápsula por 3 minutos.
5. Lavar con agua.
6. Dejar secar.
7. Observar a inmersión.

Coloración de gránulos metacromáticos

1. Cubrir el frotis con el colorante de Albert por 5 minutos.
2. Lavar con agua y dejar secar.
3. Aplicar lugol por 1 minuto.
4. Lavar con agua y dejar secar.
5. Observar a inmersión.

Reporte de resultados

Describir la forma, color, agrupación y estructuras observadas para cada microorganismo y registrarlos en el siguiente cuadro.

Microorganismo	Forma	Color	Agrupación	Estructuras



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	77 / 182

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. Describa los dos tipos generales de fijación e indique ¿cuál emplearía para bacterias y cuál para protozoos?
2. ¿Por qué hay que esperar que los colorantes básicos sean más eficaces en condiciones alcalinas?
3. Dé tres ejemplos de colorantes básicos, ácidos y neutros
4. De las tinciones empleadas en la práctica identifique cuál es el colorante primario, secundario o mordente usado en cada una de ellas
5. Método alternativo a la tinción de Ziehl Neelsen
6. ¿Qué sustancias suelen emplearse como mordientes, dé tres ejemplos?
7. Indique el método usado para la tinción de flagelos
8. ¿Qué son los gránulos metacromáticos, que otro nombre reciben y que colorantes se usan para su tinción?
9. ¿A qué se conoce como tinción negativa y por qué recibe ese nombre?
10. Indique como se realiza el método de tinta China para observar cápsula.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	78 / 182

Referencias

1. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid: Editorial Prentice Hall; 2003.
2. Tortora GJ, Funke B, Case C. Microbiology, an introduction. 10th ed. San Francisco: Pearson-Benjamin Cummings; 2008.
3. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed. México: Médica Panamericana; 2008.
4. Luis Esaú López-Jácome, Melissa Hernández-Durán, Claudia Adriana Colín-Castro, Silvestre Ortega-Peña, Guillermo Cerón-González, Rafael Franco-Cendejas. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Investigación en Discapacidad. (Internet). (2014; 05/06/2016); vol 3, núm. 1: pp. 10-18. Disponible en: www.medigraphic.org.mx.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	79 / 182

Práctica 8: Aislamiento y cuantificación de microorganismos

Objetivos

- Conocer las técnicas más utilizadas en el aislamiento de microorganismos de diferentes fuentes.
- Explicar el fundamento de las técnicas más utilizadas en el recuento microbiano: turbidimetría, microscopía, dilución y vaciado en placa, filtración, etc.

Aspectos teóricos

En microbiología se tiene que trabajar con cultivos puros de microorganismos, para determinar con precisión la identidad de un microorganismo específico obtenido de un enfermo o de cualquier otro tipo de producto, se tiene que aislar de todos los demás con los cuales esté mezclado.

La actividad de gérmenes extraños (contaminantes) en las pruebas que van a efectuarse con la bacteria de estudio, inevitablemente enmascarará y confundirá los resultados. Los cultivos pueden ser clasificados en tres grupos, dependiendo de la variedad de bacterias que contengan:

CULTIVOS

1. **CULTIVO PURO:** El cultivo puro representa las condiciones artificiales para el desarrollo de las bacterias y otros microorganismos y las condiciones impuestas a los microorganismos mediante el manejo del laboratorio. En este tipo de cultivo existe sólo un tipo de microorganismo.
2. **CULTIVO MIXTO:** Existen en el cultivo dos o más tipos de microorganismos.
3. **CULTIVO CONTAMINADO:** Es la presencia de microorganismos indeseables en un cultivo.

La separación de microorganismos presentes en una población mixta puede lograrse de varias maneras: separando a los microorganismos físicamente mediante diluciones o por



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	80 / 182

agotamiento de un pequeño inóculo en un medio de cultivo sólido; utilizando medios de cultivo selectivos para inhibir a los microorganismos no deseados.

La elección de la técnica y del medio de cultivo depende del origen de la muestra y de las características del microorganismo que se desea aislar; por ejemplo, para muestras con poblaciones muy grandes siempre se recomienda hacer diluciones, en tanto que para muestras en donde los microorganismos se han sometido a condiciones adversas, como desecación, congelación o falta de nutrientes, conviene hacer un enriquecimiento antes de aislar.

Existen numerosos métodos que permiten establecer el número de microorganismos en una muestra dada, algunos métodos cuantifican el número de células, otros cuantifican la masa total de la población (la cual con frecuencia es directamente proporcional al número de células). Debido a que las poblaciones bacterianas son usualmente muy grandes, la mayoría de los métodos de conteo se basan en conteos directos o indirectos de muestras muy pequeñas; posteriormente se hacen cálculos que determinan finalmente el tamaño de la población total; así, los ensayos de cuantificación microbiana se agrupan de manera general en métodos directos y métodos indirectos. Otra forma útil de clasificar estos métodos es en métodos de cuenta total (cuenta de microorganismos vivos y muertos), y métodos de cuenta viable (se cuantifica únicamente a los microorganismos vivos).

Así se tiene que los métodos de cuantificación se clasifican en:

Directos viables: Dilución y vaciado en placa, Extensión superficial, Gota Miles- Misra, Filtración, asa calibrada.

Directos totales: Cámara de Petroff-Hauser, Método de Breed, Contador Colter-conter.

Indirectos viables: Número más probable (NMP), Actividad metabólica.

Indirectos totales: Turbidimetría, Nefelometría, determinación de masa celular (peso seco, húmedo, etc.)

La cantidad y tipo de microorganismos en una muestra, dependen de la naturaleza química de la misma y de los tratamientos a que haya sido sometida. De este modo los procedimientos que se emplean para establecer el número de microorganismos existentes en una muestra varían en función de:

1. La cantidad de microorganismos que se espera encontrar.
2. El tipo de microorganismos que se desea contar.

En todos los casos se parte de un volumen o peso de muestra conocido. Considerando la cantidad de microorganismos se tiene que someter a las muestras a tratamientos tendientes a reducir o eliminar a los microorganismos, por lo que se espera obtener cuentas bajas o incluso la ausencia de microorganismos, en tales condiciones es necesario concentrar la cantidad de éstos mediante centrifugación o filtración de la muestra.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	81 / 182

Material y reactivos

Material

- 6 tubos de ensaye de 13 x 100 con 9.0 mL de solución salina 0.85% estéril
- 4 cajas Petri vacías estériles
- 2 matraces Erlenmeyer cada uno con 650 mL de agar nutritivo
- 1 caja con agar S110 o EMB
- 2 pipetas de 1 mL estériles
- Asa bacteriológica

Material biológico

- Muestra de material para aislamiento (agua, suelo, leche, jugo, etc)

Equipo

- Incubadora

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

La metodología que se sigue por lo general para la identificación de cualquier bacteria es la siguiente:

1. Toma de la muestra: en condiciones de esterilidad.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	82 / 182

2. Propagación: sólo en casos en los que sea necesario.
3. Aislamiento: Técnicas de aislamiento.
4. Identificación: Pruebas morfológicas y fisiológicas (pruebas bioquímicas)

I. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES Y CONTEO DE POBLACIÓN MICROBIANA

1. Colocar los seis tubos con solución salina isotónica estéril en una gradilla e identificarlos respectivamente con las diluciones 10^{-1} a 10^{-6}
2. Con una pipeta estéril tomar 1 mL de la muestra y adicionarla al tubo identificado como 10^{-1}
3. Mezclar y tomar 1 mL de esta dilución y verter en el siguiente tubo marcado como 10^{-2} y así sucesivamente hasta llegar a la dilución de 10^{-6}
4. Se toma 1 mL de las últimas cuatro diluciones con ayuda de una pipeta estéril y se traspasa a una caja de Petri vacía estéril (Fig. 8.1)

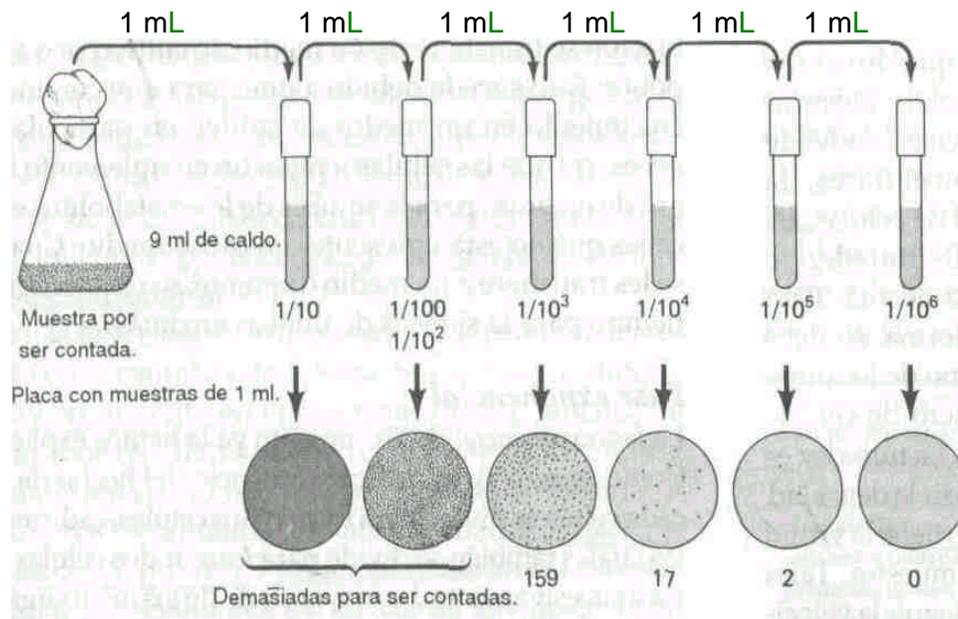


Fig. 8.1 Método de dilución y vaciado en placa para el conteo microbiano

5. Se vierte sobre el mililitro de muestra, agar nutritivo a 50 °C y se mezcla moviendo lentamente la caja sobre la superficie de la mesa, describiendo con el movimiento de la caja el número 8.
6. Dejar que solidifique el agar e Incubar a 37 °C por 24 horas y efectuar el conteo de colonias. Seleccionar las placas que muestren entre 30 y 300 colonias.
7. Calcular la cantidad de microorganismos por mililitro o gramo de la muestra con la siguiente fórmula:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	83 / 182

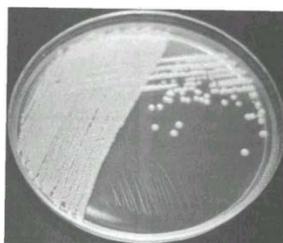
UFC/mL= Promedio de las colonias contadas x recíproco de la dilución.

El resultado se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC), *no* como número de microorganismos.

8. En caso de que el aislamiento no haya sido satisfactorio se recomienda tomar una asada de la colonia e identificar y sembrarla en estría por 3 ó 4 cuadrantes en caja de Petri (subcultivos).

II. AISLAMIENTO

1. Se toma un asada de la muestra y se siembra en una caja de Petri con agar S110 o EMB por estría en 3 ó 4 cuadrantes.
2. Se incuba a 37 °C y se hacen observaciones a las 24 y 48 horas.
3. Como en la técnica anterior y en caso de que sea necesario se recomienda hacer un subcultivo.



Nota: El traspaso de la muestra para el aislamiento a un medio líquido no es recomendable, salvo en los casos en que sea necesaria la propagación de la cepa que se desea aislar.

Reporte de resultados

Reportar el número de UFC por mililitro o por gramo de muestra.

Manejo de residuos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	84 / 182

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. ¿Qué aplicaciones prácticas tienen los métodos de cuantificación de microorganismos?
2. ¿Qué técnicas se emplean comúnmente para lograr el aislamiento de bacterias y obtener cultivos puros?
3. Mencione 5 medios de cultivo selectivos y (y/o diferenciales) así como las bacterias generalmente aisladas en cada uno de ellos.
4. ¿Qué ventajas y desventajas encuentra entre los siguientes métodos de aislamiento: a) por estría cruzada y b) por diluciones seriadas?
5. ¿Cuál es el procedimiento que se sigue para obtener un cultivo puro a partir de un cultivo mixto o contaminado en caldo?
6. Describa el método de cuantificación de la gota o de Miles y Misra.
7. Describa el fundamento básico de los siguientes instrumentos útiles para realizar una cuenta total de células en suspensión:
 - a) Cámara de conteo.
 - b) Nefelómetro.
 - c) Contador Coulter (Coulter Counter).
8. Describa el fundamento básico de las siguientes técnicas útiles para realizar la cuenta viable de células bacterianas en suspensión:
 - a) Tinción vital.
 - b) Filtración.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	85 / 182

- c) Método de diluciones seriadas.
9. Indique como se prepara de manera general un tubo para trabajar la escala de McFarland.
10. ¿Cómo se realiza la cuantificación de hongos y bacterias filamentosas?

Referencias

1. Ramírez R, Luna B, Velásquez O, Vierna L, Mejía A, Tsuzuki G, Hernández L, Muggenburg I. Manual de prácticas de microbiología general. 4ª ed. México: Facultad de Química, UNAM: 2000
2. Tortora G. Funke B. Case C. Microbiology, an introduction. 8th ed. San Francisco: Pearson-Benjamin Cummings: 2004.
3. Ingraham J. Ingraham C. Introduction to microbiology. 2nd ed. California: Brooks/Cole-Thomson Learning, 2000
4. Díaz, R; Gamazo, C; López- Goñi, I; Manual práctico de microbiología. 2ª ed. España: Masson: 2000
5. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, "Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico"
6. Mandigan MT, Martinko MJ, Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 8ª ed. España: Prentice Hall: 2001
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica: 9 Patogenicidad y virulencia



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	86 / 182

Objetivo

Observar y comprender los mecanismos de patogenicidad y virulencia de un grupo de bacterias.

Aspectos teóricos

Dos términos que se usan con frecuencia para distinguir a los microorganismos son: saprofitos, los que utilizan la materia orgánica muerta para obtener sus nutrientes y no producen daño y patógenos, los que si producen daño al hospedero al obtener sus nutrientes del ser vivo que parasitan o infectan.

El hombre y los microorganismos no son enemigos, de hecho en la gran mayoría de los casos, la coexistencia entre organismos superiores y estos no es dañina sino benéfica para ambos. Excepcionalmente la relación se convierte en parasitismo y es cuando se presenta la enfermedad.

Sólo cuando se reúnen un microorganismo patógeno y un hospedero susceptible y las condiciones son favorables, se produce la enfermedad. Por lo tanto la patogenicidad no es una característica absoluta del parásito, sino más bien de las circunstancias que definen cada interacción hospedero-parásito específica.

Lo mismo ocurre con la virulencia, como lo ha expresado Dubos: La virulencia no es una propiedad permanente, intrínseca de una especie determinada, expresa únicamente la propiedad de una cepa específica del agente infeccioso, en cierta fase de crecimiento de producir un estado patológico en un hospedero particular, en condiciones bien definidas.

Para que un agente biológico pueda funcionar como parásito, es decir como patógeno debe ser capaz de llevar a cabo las siguientes acciones:

1. Adherencia al hospedero.
2. Penetración en el hospedero.
3. Condiciones adecuadas en el hospedero.
4. Escape de los mecanismos de defensa del hospedero.
5. Escape de la acción iatrogénica.
6. producir daño en el hospedero.

En general, la virulencia implica dos características de un microorganismo patógeno: la capacidad para iniciar una infección y la severidad de la condición producida. Cepas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	87 / 182

altamente virulentas, moderadamente virulentas y virulentas pueden encontrarse en especies o grupos de microorganismos que en general son considerados patógenos.

Para sobrevivir y multiplicarse dentro de un hospedero, muchos microorganismos producen una variedad de sustancias que les permiten evadir los mecanismos de defensa de este; estas sustancias, incluyen cápsulas y sustancias viscosas extracelulares, proteínas y carbohidratos de superficie, enzimas, toxinas y otras moléculas pequeñas.

Las estructuras capsulares de algunas bacterias permiten a los microorganismos escapar de la fagocitosis al evitar la interacción entre la superficie celular bacteriana y la célula fagocítica o bien por ocultamiento de componentes de la superficie celular bacteriana que de otro modo podrían interactuar con las células fagocíticas y llevar a su ingestión. Entre los microorganismos que presentan cápsulas de polisacárido se encuentran *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* de tipo b, *Klebsiella pneumoniae* y estreptococos beta-hemolíticos del grupo B.

Muchas bacterias producen enzimas o toxinas, o poseen constituyentes celulares que tienen efectos tóxicos o necrosantes directos en las células inflamatorias del hospedero y en otros componentes del sistema inmune. Los lipopolisacáridos de las bacterias Gram negativas pueden demorar o disminuir la respuesta inflamatoria aguda, lo cual permite que el microorganismo se establezca dentro del hospedero con relativa facilidad. Algunos microorganismos tienen propiedades de superficie que los hacen resistentes a los efectos bactericidas del suero humano normal. Esta propiedad puede facilitar la diseminación de la bacteria a través del torrente sanguíneo y los linfáticos y conducir a la irrupción de una infección sistémica o al establecimiento de focos infectados en sitios distantes del de la infección inicial. Algunos de estos componentes confieren resistencia a los efectos antibacterianos de las proteínas lisosómicas como lisozima, lactoferrina y proteínas catiónicas.

Las propiedades invasoras de algunas bacterias son atribuidas a la elaboración de enzimas que actúan extracelularmente. Muchas bacterias patógenas Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* y los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A producen hialuronidasa, una enzima que promueve la diseminación de microorganismos a través del tejido conectivo mediante la despolimerización del ácido hialurónico, la sustancia responsable de la adherencia entre células. Los estreptococos del grupo A y los estafilococos también pueden elaborar enzimas que hidrolizan los coágulos de fibrina (estreptoquinasa y estafiloquinasa) y facilitan la diseminación de microorganismos en los tejidos. *Clostridium histolyticum*, *Clostridium perfringens* y *Clostridium septicum* producen colagenasas que destruyen la matriz de colágeno de la matriz muscular y del tejido conectivo y facilitan la penetración de microorganismos dentro de estos tejidos para causar fascitis necrosante y gangrena gaseosa.

Las toxinas de origen bacteriano se pueden dividir en dos grupos: las endotoxinas y las exotoxinas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	88 / 182

Las exotoxinas bacterianas son las toxinas biológicas más potentes conocidas. Las exotoxinas son producidas fundamentalmente por bacterias Gram positivas, aunque algunas Gram negativas también son capaces de elaborarlás. Las exotoxinas son, en general, de naturaleza proteica y termolábil, dado que son proteicas, muchas pueden ser inactivadas o destruidas por enzimas proteolíticas. Algunas exotoxinas sólo se activan después de una hidrólisis parcial por enzimas proteolíticas. La actividad tóxica de muchas exotoxinas puede ser destruida por tratamiento con formaldehído (desarrollo del toxoide) y neutralizada por anticuerpos específicos.

Las endotoxinas son producidas sólo por bacterias Gram negativas y son principalmente lipopolisacáridos (LPS). El LPS, es un componente estructural de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, representa el determinante antigénico somático (O). Las endotoxinas son estables al calor, no son inactivadas por tratamiento con formaldehído y son sólo parcialmente neutralizadas por anticuerpos específicos. Comparadas con muchas de las exotoxinas, las endotoxinas tienen una toxicidad relativamente baja. Aunque las endotoxinas pueden escapar a los líquidos circundantes (como invaginaciones en la membrana externa de las bacterias Gram negativas), la célula completa generalmente retiene la mayor porción de la actividad tóxica. Las actividades biológicas y tóxicas de las endotoxinas son amplias. Nano gramos de una endotoxina causan fiebre en el hombre y la liberación de pirógenos endógenos. Dosis mayores causan hipertensión, disminución del número de polimorfo nucleares y plaquetas por el aumento de la marginación de estas células en los pequeños vasos sanguíneos, hemorragia y a veces coagulación intravascular diseminada, debido a la activación de los mecanismos de la coagulación.

Material y reactivos

Material

- 2 portaobjetos.
- 2 tubos de 13 X 100.
- Agar sangre de carnero 5%
- Asa bacteriológica.
- Solución desinfectante.

Material biológico

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pyogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	89 / 182

Reactivos

- Rojo Congo
- Mordiente de cápsula
- Anticoagulante
- Peróxido de hidrógeno al 3%

Equipo

- Microscopio
- Incubadora

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

CATALASA

1. Coloque sobre un portaobjetos limpio y desengrasado una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. Coloque la cepa problema en condiciones estériles y colóquela sobre la gota del peróxido de hidrógeno formando una suspensión homogénea.



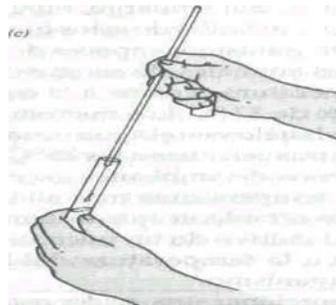


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	90 / 182

2. La prueba es positiva si aparecen burbujas en la suspensión, de lo contrario es una prueba negativa.

COAGULASA

1. Extraer sangre a un compañero (5 mL. aproximadamente) y colocar la muestra en un tubo con anticoagulante, agite por inversión del tubo y centrifuge a 3000 r.p.m. durante 3 min.
2. Separe el plasma, agregue 0.5 mL de plasma en un tubo de ensaye.
3. Tome una asada de la cepa de *S. aureus* en condiciones asépticas y realice una suspensión en los 0.5 de plasma colocado en el tubo.



4. Incube a 37 °C por 2 horas. La prueba positiva es la presencia de un coágulo visible en el tubo con la suspensión. (puede leerse incluso 24 horas después de inoculado incubándolo a 37 °C)



CÁPSULA

1. Coloque una gota de rojo congó en un portaobjetos
2. Tome una muestra de la cepa de *K. pneumoniae* y haga una suspensión.
3. Fijar.
4. Adicionar mordiente de cápsula por tres min.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	91 / 182

5. Lavar con agua.
6. Dejar secar y observar al microscopio en objetivo 100x

HEMOLISINAS

1. Sembrar por estría cruzada en las placas de agar sangre las cepas de *S. aureus* y de *S. pyogenes* respectivamente.
2. Terminado el estriado puncionar el agar con el asa bacteriológica sobre los cuadrantes.
3. Etiquetar en incubar a 37 °C por 24 a 48 horas.
4. Observar el tipo de hemólisis.

Reporte de resultados

Registre los resultados para cada microorganismo en el siguiente cuadro

Nombre de la bacteria			
Catalasa			
Coagulasa			
Hemólisis			
Cápsula			

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infeciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infeciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	92 / 182

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. Hacer un cuadro comparativo indicando las diferencias entre exotoxina y endotoxina.
2. Explique tres formas de atenuación de una cepa virulenta.
3. Mediante ejemplos diga las diferencias entre patogenicidad y virulencia.
4. Mencione los mecanismos del hospedero que impiden la infección por microorganismos.
5. Defina infección primaria, infección mixta, bacteriemia, toxemia, piemia, septicemia.
6. Indica la diferencia entre coagulasa liga y libre, indica cómo se determina cada una.
7. Menciona cinco enzimas producidas por algunos microorganismos patógenos.
8. Para la prueba de catalasa, indica si es correcto realizar la prueba de un cultivo procedente de agar sangre, justifica tu respuesta.
9. Menciona 3 ejemplos de exotoxinas.
10. Indica la composición de la capsula.

Referencias

1. Koneman EW. Diagnóstico microbiológico. 5ª ed. Madrid: Médica Panamericana; 2001.
2. Mac Faddin ,. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003.
3. Prats G. Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2008.
4. Brooks FG, Carroll CK, Butel SJ, Morse AS, Mietzner AT. Microbiología médica. 26ª ed. México DF: Mc Graw Hill; 2014.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	93 / 182

Práctica: 10 Multiplicación bacteriana (Requerimientos físico-químicos)

Objetivo

Identificar las necesidades fisicoquímicas óptimas de las bacterias más comunes observando cómo influyen estos en la multiplicación bacteriana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	94 / 182

Aspectos teóricos

Además de los nutrientes para que las bacterias se multipliquen necesitan factores fisicoquímicos óptimos como son: temperatura, pH, bióxido de carbono, tensión de oxígeno, presión osmótica y sobre todo humedad. La influencia de estos factores en el desarrollo de una bacteria depende del grado de adaptación y sensibilidad de la misma.

TEMPERATURA

De acuerdo a la temperatura en que se desarrollan las bacterias las podemos clasificar como:

1. Psicrófilas: Se desarrollan a temperaturas bajas 0 y menores hasta 20 °C
2. Mesófitas: Crecen mejor a temperaturas medias entre 25 y 40 °C
3. Termófilas: Se desarrollan mejor a temperaturas altas entre 45 y 60 °C
4. Termodúricas: Son bacterias mesófilas que soportan temperaturas altas.
5. Hipertermófilas: Principalmente pertenecen al dominio Archaea , y viven a temperaturas mayores de ebullición del agua, como las aguas de fuentes termales.

pH

El pH es decisivo para muchas bacterias de interés médico, ya que la mayoría se multiplica a pH neutro a ligeramente alcalino, que es muy similar al de las diferentes partes del cuerpo y fluidos corporales. Muy pocas bacterias crecen en pH ácido, sin embargo las bacterias acidófilas son marcadamente tolerantes a la acidez.

En los cultivos bacterianos, las bacterias producen ácidos que eventualmente interfieren con su propio crecimiento; para neutralizar dichos ácidos se adicionan amortiguadores a los medios de cultivo.

Se clasifican en bacterias acidófilas como *Helicobacter pylori*, neutrófilas la gran mayoría de las bacterias y alcalófilas como *Vibrio cholerae*.

TENSIÓN DE OXÍGENO

De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno las bacterias se clasifican en:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	95 / 182

1. Aerobias estrictas: bacterias que necesitan forzosamente del oxígeno para multiplicarse.
2. Anaerobias facultativas: bacterias que pueden desarrollarse tanto en presencia de oxígeno como en ausencia de oxígeno.
3. Microaerofilicas: estas bacterias se desarrollan mejor en presencia de bajas tensiones de oxígeno.
4. Anaerobias obligadas: sólo se multiplican en ausencia de oxígeno.
5. Aerotolerantes: bacterias anaerobias que pueden desarrollarse aún en presencia de oxígeno.

PRESIÓN OSMÓTICA

Entendemos por ósmosis al fenómeno de difusión del agua o solventes de una solución a través de una membrana semipermeable, del medio de menor concentración a uno de mayor concentración de soluto. Esto es, si colocamos una célula en un medio con baja presión osmótica, es decir hipotónica, entonces el líquido fluye hacia adentro de la célula hinchándola incluso reventándola, por el contrario si colocamos una célula en un medio de alta presión osmótica, es decir hipertónica, entonces el líquido sale de la célula deshidratándola.

Ahora bien, si colocamos una célula con una presión osmótica igual a la que tiene en su interior o sea en un ambiente isotónico entonces la célula permanece intacta. La mayoría de las bacterias se desarrollan bien con una presión osmótica creada por sal al 0.85%; sin embargo algunos microorganismos se pueden desarrollar en ambientes con concentraciones superiores de sal por ejemplo: Lactobacilos (2 – 3%), Estreptococos de cavidad oral (5%) y Estafilococos (7.5%) por lo que pueden aprovecharse su tolerancia a la sal para separarlos de otras bacterias en medios selectivos.

Humedad

El desarrollo y metabolismo de los microorganismos depende de un medio en el que exista agua, es decir, no tiene la capacidad de retención de agua como los organismos superiores, de aquí que los objetos con gran humedad se recubran de mohos en poco tiempo a diferencia de aquellos que no poseen agua, en los que no se desarrollan.

La mayoría de los microorganismos crecen en medios con gran humedad, por ejemplo la concentración de agar usada para solidificar los medios de cultivo es de 1.5%. Si se aumenta marcadamente esta concentración el crecimiento de algunas bacterias puede verse inhibido debido al incremento en la presión osmótica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	96 / 182

Un parámetro para conocer la humedad o cantidad de agua mínima que requiere un microorganismo es la actividad de agua (a_w) de los sustratos donde se desarrollan los microorganismos, la cual para el desarrollo de estos debe de ser entre 0.700 y 1.000

Material y reactivos

Material

- 2 cajas con agar tioglicolato.
- 3 cajas con agar nutritivo.
- 1 caja con agar nutritivo ajustado a pH 6.
- 1 caja con agar nutritivo ajustado a pH 9.
- 1 tubo de ensaye de 13 x 100 con agar nutritivo.
- 1 tubo de ensaye de 13 x 100 con agar nutritivo + 1.5 % de agar-agar (3% de agar)
- 1 caja de agar nutritivo más 7.5% de cloruro de sodio.
- 1 gradilla metálica.
- Asas bacteriológicas.
- Mechero Bunsen.
- 1 jarras de anaerobiosis.
- 1 tableta de anaerocult A.

Material biológico

- *Streptococcus pyogenes*
- *Escherichia coli*
- *Candida albicans*
- *Clostridium spp.*
- *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

Equipo

- Incubadora

Servicios



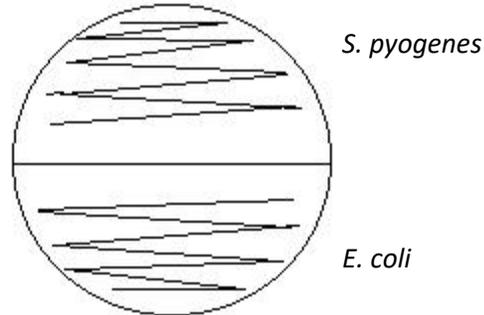
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	97 / 182

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

I EFECTO DE LA TEMPERATURA

1. Dividir dos cajas de agar nutritivo en dos partes y sembrar en una mitad *Streptococcus pyogenes* y en la otra mitad *Escherichia coli* en ambas cajas.
2. Incubar una caja a 37 °C y la otra a temperatura ambiente por 24 horas, al finalizar el periodo de incubación observar el desarrollo bacteriano y discutir sus resultados

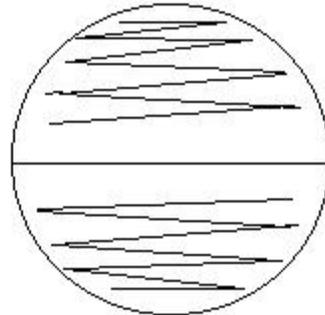


II. EFECTO DEL pH

1. Dividir por la mitad las cajas de agar nutritivo de pH 6 y pH 9 sembrando en una mitad *Escherichia coli* y en la otra *Staphylococcus aureus*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	98 / 182



E. coli

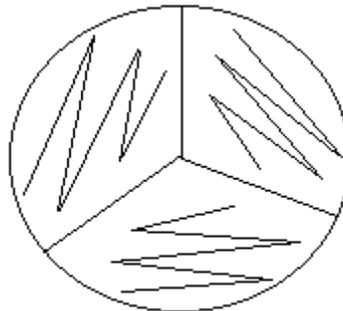
S. aureus

2. Incubarlos a 37 °C durante 24 horas, al cabo de este tiempo, comparar el crecimiento obtenido en ambas cajas

III REQUERIMIENTOS DE OXÍGENO

1. Dividir las dos cajas de agar tioglicolato en tres zonas.
2. Sembrar por estria cerrada las cepas de *Clostridium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (o cualquier otro microorganismo facultativo), en las dos cajas, como se muestra en el siguiente esquema

Clostridium sp



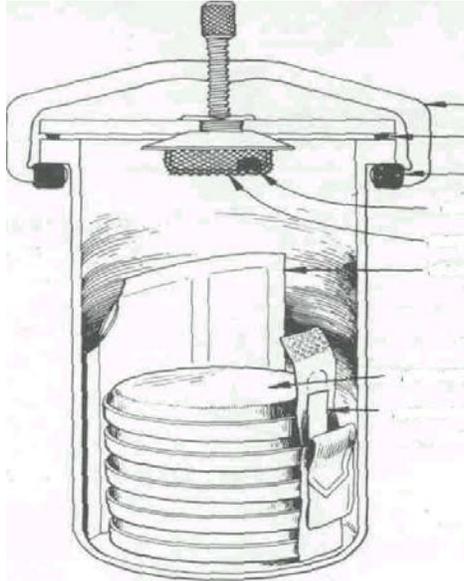
Pseudomonas aeruginosa.

E. coli

3. Una de las cajas se incubaba en una atmósfera sin oxígeno, en una jarra de anaerobiosis y la otra de manera normal en aerobiosis y ambas a 37 °C por 24 horas



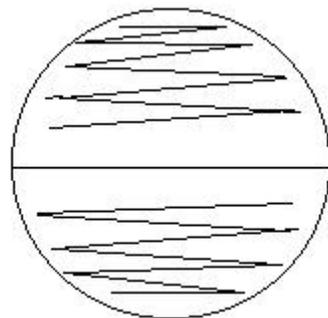
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	99 / 182



Compare resultados en ambas condiciones

IV. EFECTO DE LA PRESIÓN OSMÓTICA

1. Dividir las cajas con agar nutritivo adicionado con 7.5% de sal y agar nutritivo normal y sembrar en ambas cajas en una mitad *S. aureus* y *E. coli*



S. aureus

E. coli

2. Incubar ambas cajas a 37 °C por 24 horas
3. Observar el desarrollo obtenido, discutiendo el efecto de la presión osmótica sobre estos microorganismos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	100 / 182

V. EFECTO DE LA HUMEDAD

1. Etiquetar el tubo con agar nutritivo con 3% de agar como baja humedad y el otro tubo como humedad normal
2. Sembrar ambos tubos con *S.aureus* e incubar a 37 °C por 24 horas
3. Compara el desarrollo en ambos tubos

Reporte de resultados

Indicar el tipo de desarrollo (nulo, poco, moderado abundante)

FACTOR	BACTERIA:	BACTERIA:
pH ácido		
pH alcalino		
Temperatura ambiente		
Temperatura 37 °C		
Tensión O ₂ (aerobiosis)		
Tensión O ₂ (anaerobiosis)		
Presión osmótica 7.5% NaCl		
Presión osmótica 1.5% NaCl		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	101 / 182

Humedad normal (1.5% agar)

Humedad baja (3% agar)

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. ¿Cuáles son los requerimientos físicos para el crecimiento microbiano?
2. ¿Cuáles son los requerimientos químicos para el crecimiento microbiano?
3. Describa las fases de la curva de crecimiento bacteriano e indique la velocidad de crecimiento de cada una de las fases
4. Indique como podría modificar cada una de las fases de la curva de crecimiento bacteriano
5. Mencione que sustancias son usadas como buffer en los medios de cultivo
6. Mencione que microorganismos pueden desarrollarse mejor en condiciones de acidez
7. ¿Qué características tiene el agar bacteriológico que permite sea usado para el crecimiento de bacterias termófilas?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	102 / 182

8. ¿Qué es la plasmólisis y que utilidad tiene?
9. Indique el rango en que un microorganismo se considera un halófilo extremo o halófilo facultativo
10. ¿Qué sustancias son consideradas elementos traza en los medios de cultivo y que utilidad tienen?

Referencias

1. Madigan TM, Martinko MJ, Parker J. Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid: Prentice Hall; 2003
2. Stainer, Douroff, Adelberg. Microbiología. 2ª. ed. Aguilar España; 1981.
3. Tortora JG, Funke RB, Case LCh. Introducción a la microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana; 2007
4. Ingraham LJ. Introducción a la Microbiología. 1ª. ed. Editorial Reverté; 1998.
5. Prats G. Microbiología clínica. Madrid: Médica Panamericana; 2008
6. Brooks FG, Carroll CK, Butel SJ, Morse AS, Mietzner AT. Microbiología médica. 26ª ed. México DF: Mc Graw Hill; 2014
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica 11. Control microbiológico I (Efecto de los factores físicos)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	103 / 182

Objetivos

- Evaluar y comprobar prácticamente el efecto de la temperatura sobre el desarrollo de los microorganismos.
- Relacionar el efecto de la temperatura con algunas características de los microorganismos.

Aspectos teóricos

Los microorganismos son vitales para la vida en el planeta, los seres humanos simplemente no podríamos existir sin ellos. Sin embargo, algunos de ellos tienen efectos nocivos en nuestra vida diaria, ya sea produciendo enfermedades o contaminando productos de interés. Es por esta última razón, que los seres humanos han tratado de encontrar maneras para controlar a los microorganismos, ya sea matándolos o simplemente deteniendo su desarrollo.

Muchas bacterias poseen en su forma vegetativa (forma metabólicamente activa), una tolerancia limitada a variaciones en su medio ambiente y poseen poca capacidad de supervivencia ante condiciones adversas de desarrollo; otras, en cambio, producen estructuras de resistencia a dichas condiciones adversas denominadas esporas.

Los mecanismos de control microbiológico deben ser capaces ya sea, de eliminar o simplemente limitar el desarrollo de formas tanto vegetativas como esporuladas.

Entre los mecanismos existentes para controlar el crecimiento microbiano se encuentran los tratamientos físicos; estos métodos físicos de control se han utilizado ampliamente a lo largo de la historia de la humanidad sobre todo, para conservar alimentos (secado y salado son probablemente las técnicas más antiguas utilizadas por el ser humano).

Cuando se debe seleccionar un método para controlar el desarrollo de los microorganismos, se debe considerar el (los) efecto(s) que dicho método pueda tener sobre los productos que se deseen preservar, por ejemplo, ciertas vitaminas y antibióticos en solución pueden ser inactivados por el calor. Los principales métodos físicos utilizados para controlar el desarrollo de microorganismos son:

➤ CALOR



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	104 / 182

La aplicación de calor constituye el método más sencillo para esterilizar materiales, siempre y cuando el material mismo sea resistente al daño por calor. El calor actúa sobre los microorganismos desnaturalizando las proteínas celulares, los ácidos nucleicos y desorganizando las membranas celulares.

Como es de esperarse, no todas las células expuestas a un tratamiento microbicida (calor, radiaciones, presión osmótica alta, etc.) mueren al mismo tiempo, sino que lo hacen de manera exponencial; esto quiere decir, que el número de células sobrevivientes decae en una unidad logarítmica por cada unidad de tiempo, esta unidad de tiempo se conoce como tiempo de reducción decimal o valor-D, y es el tiempo, expresado en minutos, en el cual, el 90% de una población bacteriana morirá a una temperatura dada. Durante valores D subsecuentes, el 90% de las bacterias sobrevivientes será eliminado de manera consecutiva. Para destrucción térmica, la temperatura utilizada en el tratamiento puede indicarse en forma de subíndice, por ejemplo, el valor-D a 90°C se escribe $D_{90^{\circ}\text{C}}$.

Además del valor-D, otros dos términos que son útiles para describir la susceptibilidad de un determinado microorganismo a la destrucción por calor son el **Punto Térmico Mortal** y el **Período Térmico Mortal**.

El **Punto Térmico Mortal** es la temperatura mínima requerida para matar todos los microorganismos en una suspensión líquida en 10 minutos.

El **Período Térmico Mortal** es el tiempo mínimo necesario para destruir una población de microorganismos a una temperatura dada.

Tanto el Punto como el Período Térmico Mortales sirven de guía para indicar el tratamiento térmico requerido para destruir una población bacteriana en específico.

➤ BAJAS TEMPERATURAS

Las bajas temperaturas no matan a la mayoría de los microorganismos, de hecho, se utilizan para conservar cultivos de estos por períodos limitados. Si se mantiene a los microorganismos a una temperatura por debajo de su valor mínimo de crecimiento, estos comenzarán a morir lentamente.

Por otra parte, al congelar una población bacteriana, se destruyen algunas células, pero los sobrevivientes permanecen viables en estado congelado por largos períodos. Debido a que las bacterias son muy pequeñas, no se logran formar cristales de agua en su interior como ocurren en células eucariotas; por lo tanto, no sufren destrucción mecánica intracelular. En su lugar, las bacterias son destruidas debido a la alta fuerza osmótica que se desarrolla conforme el agua del ambiente se va congelando.

➤ FILTRACIÓN

Es un proceso mecánico utilizado para remover microorganismos de líquidos materiales sensibles al calor, como algunos medios de cultivo, enzimas, vacunas y antibióticos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	105 / 182

Algunas áreas hospitalarias utilizan filtros HEPA (high-efficiency particulate air) para disminuir el número de microorganismos en el aire. Estos filtros pueden retener casi todos los microorganismos mayores a 0.3 μm de diámetro.

➤ **DESECACIÓN.**

En ausencia de agua los microorganismos no pueden crecer o reproducirse pero pueden mantenerse viables por años. Cuando hay agua disponible, los microorganismos vuelven a crecer y a dividirse.

El agua puede eliminarse del medio ambiente por evaporación o sublimación. La primera casi nunca se utiliza en los laboratorios debido a que produce cambios químicos. Sin embargo, la sublimación es ampliamente utilizada en el proceso de **liofilización**.

La resistencia a la desecación varía de acuerdo a la especie y al medio ambiente en el que se encuentre el microorganismo.

➤ **PRESIÓN OSMÓTICA**

El uso de altas concentraciones de sal o azúcar para conservar alimentos se basa en los efectos de la presión osmótica. Las altas concentraciones de estos solutos en el medio crean un ambiente hipertónico que daña a las células por **plasmólisis**. Este método de control se asemeja al de desecación, ya que priva a la célula del agua que necesita para poder desarrollarse. Este método de control es ampliamente utilizado en la industria de alimentos.

➤ **RADIACIONES**

Las radiaciones tienen diversos efectos sobre las células, dependiendo de su longitud de onda, intensidad y tiempo de exposición. Existen dos tipos de radiaciones capaces de matar microorganismos: Las **radiaciones ionizantes** (rayos gamma y rayos X) y las **no ionizantes** (luz ultravioleta).

Material y reactivos

Material



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	106 / 182

- 4 placas de Agar Nutritivo.
- Asa bacteriológica.
- Mechero bunsen.
- Pipetas graduadas estériles.
- Tubo de 13x100 con 5 mL de caldo nutritivo.
- 4 tubos de 13x100 estériles.
- Gradilla.
- Olla de presión.
- Tubo número 1 de la escala de McFarland

Material biológico

- *Escherichia coli*
- *Bacillus subtilis*

Equipo

- Incubadora
- Baños metabólicos.

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

a. PREPARACIÓN DE LAS CEPAS.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	107 / 182

1. En un tubo que contenga caldo nutritivo, colocar varias asadas de la cepa *E. coli* hasta obtener una suspensión turbia homogénea que corresponda al tubo número 1 de la escala de McFarland (aproximadamente una población bacteriana de 3×10^8 bacterias/mL)*.
2. Distribuir a cada equipo, una alícuota de esta suspensión en un tubo de ensaye estéril*.
3. Etiquetar cuatro tubos estériles para *E. coli*.
4. A estos tubos, distribuir volúmenes iguales de caldo nutritivo en condiciones de esterilidad (a partir del tubo que contiene 5 mL de caldo nutritivo).
5. Diluir la suspensión bacteriana original en estos tubos a una proporción 1:2
6. Preparar la cepa de *B. subtilis* de la misma manera.
7. Para esta cepa, etiquetar los tubos con los valores de temperatura 80, 90, 110 y 120 °C.

*Estos pasos serán realizados por los profesores de laboratorio.

b. DETERMINACIÓN DEL PUNTO TÉRMICO MORTAL

1. PARA *Escherichia coli*

- 1.1. Colocar los baños metabólicos a 35, 45, 55 y 65 °C respectivamente.
- 1.2. Etiquetar los 4 tubos de la suspensión diluida de *E. coli* con las temperaturas indicadas.
- 1.3. Dividir una placa de agar nutritivo en seis sectores de la siguiente manera:

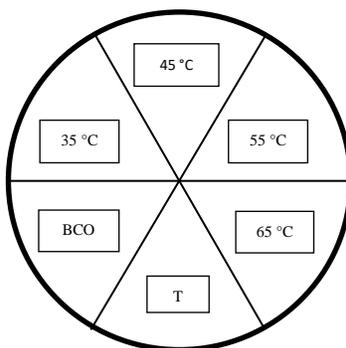


Fig. 1 Determinación del punto térmico mortal (*E. coli*).

- 1.4. Incubar los tubos a sus temperaturas correspondientes durante 10 minutos.
- 1.5. Terminado el tiempo, sembrar una asada por estría simple de cada uno de los tubos en el sector correspondiente.
- 1.6. En el quinto sector sembrar una asada de la suspensión original (sin tratamiento térmico) como control positivo.
- 1.7. Dejar el sexto sector sin inocular como control negativo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	108 / 182

2. PARA *Bacillus subtilis*

2.1. Realizar el mismo procedimiento que para *E. coli* pero a temperaturas de 80, 90, 110 y 120 °C (en este caso, para los dos últimos valores de temperatura se requerirá de ollas de presión en vez de baños metabólicos).

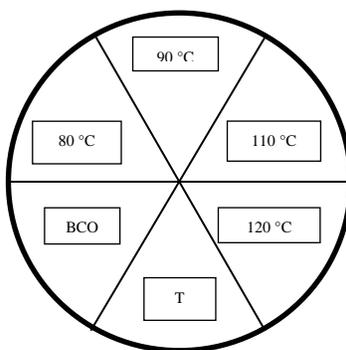


Fig. 2 Determinación del punto térmico mortal (*B. subtilis*).

c. Determinación del período térmico mortal.

1. PARA *Escherichia coli*

1.1. Dividir una placa de agar nutritivo en seis sectores de la siguiente manera:

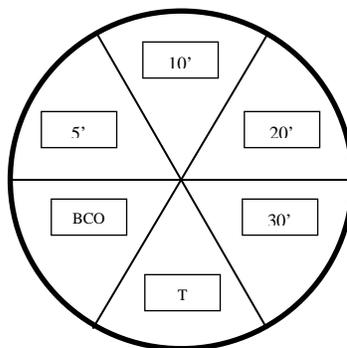


Fig. 3 Determinación del período térmico mortal.

- 1.2. Colocar el tubo con la suspensión diluida de *E. coli* en el baño metabólico a la temperatura de 65 °C por un período de 5 minutos.
- 1.3. Tomar una asada y sembrar por estría simple en el sector de la placa correspondiente a 5 minutos.
- 1.4. Volver a colocar el tubo en el baño metabólico por otros 5 minutos (es decir, completar 10 minutos en total) y sembrar de igual manera en el sector correspondiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	109 / 182

- 1.5. Colocar el tubo otros 10 minutos en el baño (20 min en total) y sembrar de igual manera.
- 1.6. Repetir el procedimiento por 10 minutos más (30 min).
- 1.7. Sembrar una asada de la suspensión original (sin tratamiento térmico) en el quinto cuadrante.
- 1.8. Dejar sin inocular el sexto cuadrante.

2. PARA *Bacillus subtilis*

- 2.1. Realizar el mismo procedimiento que para *Escherichia coli* utilizando en este caso la temperatura de 90 °C para el baño metabólico.

Reporte de resultados

- a. Determinación del Punto Térmico Mortal.
Interpretar para cada cepa utilizada la temperatura a la que no hubo desarrollo bacteriano, el cual corresponde al punto térmico mortal.
- b. Determinación del Período Térmico Mortal.
Interpretar para cada cepa utilizada el tiempo al que no hubo desarrollo bacteriano, el cual corresponde al período térmico mortal.

APÉNDICE: ESCALA DE MCFARLAND.

La utilidad de esta escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón. La finalidad, es establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión bacteriana. La escala se basa en la mezcla de concentraciones crecientes de cloruro de bario con concentraciones decrecientes de ácido sulfúrico, obteniéndose un precipitado de sulfato de bario en cantidades diferentes.

La turbidez producida por cada mezcla ha sido calibrada para aproximar un cierto número de bacterias por unidad de volumen. En otras palabras, la turbidez que resulta de agitar bien estas mezclas, se aproxima a la producida por un cierto número de bacterias en suspensión.

La escala cuenta con 10 estándares base (en la tabla aparece la composición de estos) y por espectrofotometría se crea una curva patrón, de forma tal que se va a poder detectar la concentración de diluciones bacterianas (de manera aproximada, ya que depende de

Factores como el tamaño de la bacteria, la formación de agregados, etc.). Cada estándar de la escala es denominada tubo de McFarland y se le asigna un número para reconocer



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	110 / 182

de qué estándar de la escala se está hablando. Así, el tubo 3 de la escala de McFarland corresponde a aproximadamente 9.0×10^8 bacterias por mililitro.

Clave del tubo	BaCl ₂ 1.0% (mL)	H ₂ SO ₄ 1% (mL)	Número Aproximado de bacterias/mL
1	0.1	9.9	3.0×10^8
2	0.2	9.8	6.0×10^8
3	0.3	9.7	9.0×10^8
4	0.4	9.6	1.2×10^9
5	0.5	9.5	1.5×10^9
6	0.6	9.4	1.8×10^9
7	0.7	9.3	2.1×10^9
8	0.8	9.2	2.4×10^9
9	0.9	9.1	2.7×10^9
10	1.0	9.0	3.0×10^9

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infeciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	111 / 182

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos. En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. Esquematice y explique por medio de una gráfica logaritmo de m.o. sobrevivientes vs tiempo, el valor-D.
2. ¿Cómo se determina matemáticamente el valor-D?
3. Indique los factores que afectan el valor-D en tratamientos térmicos.
4. Diga a que se refieren los valores Z y F y cuál es su importancia en los tratamientos térmicos de control microbiano.
5. Describa a qué se refiere el término plasmólisis.
6. Describa brevemente en qué consiste el proceso de liofilización e indique un ejemplo de su uso en la industria alimenticia.
7. Explique el mecanismo de acción de las radiaciones ionizantes y no ionizantes como métodos de control microbiano, así como sus aplicaciones.
8. ¿Cuál es la importancia de determinar el Período y el Punto Térmico Mortales en las bacterias?
9. ¿Por qué las esporas bacterianas son resistentes a las altas temperaturas y qué relevancia tiene esto?
10. ¿Cuáles son los valores de Período y Punto Térmico Mortales reportados en la literatura para las bacterias utilizadas en la práctica?

Referencias

1. Domínguez S. El laboratorio de microbiología. [www] URL: <http://perso.wanadoo.es/microdominguez/index.htm>
2. Microbiología de los alimentos, factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. [www] URL:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	112 / 182

<http://www.unavarra.es/genmic/curso%20microbiologia%20general/09-factores%20de%20supervivencia.htm>

3. Microbiología industrial. Factores ambientales que afectan al crecimiento: termodestrucción. [www] URL: <http://www.unavarra.es/genmic/micind-2-5.htm>
4. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S y Mietzner T. Jawetz, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica. 25° ed. México: McGraw Hill-Lange, 2011.
5. Tortora G, Funke B y Case Ch. Microbiology, an introduction. 8th ed. San Francisco: Pearson-Benjamin Cummings, 2004.
6. Ingraham J e Ingraham C. Introduction to microbiology. 3rd ed. California: Thompson Learning, 2004.
7. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica 12: Control Microbiológico II (Efecto de los factores químicos)

Objetivo

Conocer la importancia del control microbiológico con agentes químicos, su evaluación, utilidad, mecanismos de acción y las condiciones que influyen en su eficacia.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	113 / 182

Aspectos teóricos

La reducción o eliminación por técnicas de higiene y sanidad ambiental que controlan la presencia o ausencia de microorganismos indeseables, ha permitido el avance de la Microbiología y su aplicación en diferentes áreas como la medicina, la industria alimentaria y la farmacéutica.

La limpieza y desinfección son procedimientos que permiten eliminar y evitar la proliferación de microorganismos. Estos procesos juegan un papel muy importante dentro de cualquier laboratorio ya que se puede generar contaminación y proliferación de microorganismos indeseables además de resistencias microbianas.

Así mismo, existen gran número de compuestos químicos en concentraciones apropiadas que son capaces de matar o inhibir los microorganismos. Estos productos tienen muchas aplicaciones, algunos son usados para sencillos lavados bucales y otros para descontaminar hasta un vehículo espacial. Debido

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A las grandes variaciones en el ambiente y a la magnitud y diversidad de microorganismos, no es posible prescribir un sólo agente químico para eliminar o reducir la biota microbiana, por ello es importante conocer las sustancias químicas con que contamos para cada propósito, sus características y eficacia como agentes antimicrobianos.

Muchos desinfectantes y prácticas de desinfección han sido inspirados por prácticas empíricas y de higiene personal, tales como el escaldado con agua, el uso de colorantes y la exposición a los rayos del sol en primavera.

El arte y la ciencia de la desinfección precedió sin duda, a la teoría infecciosa de la enfermedad. En un principio se observó que ciertos compuestos, que se aplicaban sobre cadáveres en descomposición o se agregaban a las aguas residuales, atenuaban la emanación de malos olores. Sobre tales bases empíricas, el uso de los desinfectantes y su aplicación en la desinfección se fue desarrollando hasta configurar una ciencia de considerable magnitud.

Desde un punto de vista histórico, la desinfección por agentes químicos fue practicada por múltiples procedimientos, aunque a veces no resultó fácil diferenciar el principio activo interviniente. Algunos de los productos más utilizados en la antigüedad fueron:

Derivados de azufre: La más antigua referencia a una desinfección de locales por un producto químico parece ser la descrita en la Odisea, 800 A.C., en la que Ulises después



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	114 / 182

de haber matado a sus rivales ordena que se queme azufre en la casa. En Europa, durante las epidemias de peste humana que tuvieron lugar en plena Edad Media, el azufre fue recomendado para desinfectar los locales y los objetos contaminados.

Derivados del mercurio: Los más antiguamente utilizados como desinfectantes y como pintura o revestimiento protector, en China, la India, Egipto y Europa. Sin embargo, los trabajos de Koch, fueron los que demostraron definitivamente la eficacia del sublimado corrosivo sobre los microorganismos cultivados in vitro.

Los álcalis: Bajo esta denominación general, que deriva del término árabe al-quâli, que significa sosa, se reagrupan todos los productos básicos que poseen acción neutralizante sobre los microorganismos; los más antiguos de estos productos, utilizados en la práctica de la desinfección, son los derivados de la cal.

Los ácidos: Es bien conocido que los ácidos fuertes atacan los objetos más duros y que los ácidos orgánicos como el vinagre protegen frutas y verduras de la putrefacción, lo que se estima como una razón que debió impulsar a los embalsamadores, médicos de humanos y de animales, a proponerlos como desinfectantes. En 1676, Van Leeuwenhoek, aportó la primera demostración científica de los ácidos, recuperando con vinagre de vino las bacterias recogidas de la superficie de sus dientes, las cuales dejaban de moverse.

CONCEPTOS Y DEFINICIONES

LIMPIEZA: Es el conjunto de operaciones que permiten eliminar la suciedad visible (impurezas indeseables) o microscópica de una superficie.

SANEAMIENTO: Se refiere a la calidad de la limpieza.

DESINFECCIÓN: Es un proceso físico o químico que extermina o destruye a la mayoría de los microorganismos patógenos y no patógenos, pero rara vez elimina las esporas.

Tipos de desinfección:

- De superficies por contacto directo
- Desinfección ambiental
- Aspersión

Desinfectantes: Son los agentes químicos que destruyen patógenos.

Sanitización: El proceso de sanitización significa el reducir la cantidad de microorganismos a un nivel de seguridad.

Sanitizante: Es un agente antimicrobiano que se aplica con el objetivo de destruir los microorganismos, pero no necesariamente los elimina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	115 / 182

Asepsia: Son los procedimientos encaminados a evitar la contaminación de microorganismos en un material o en un organismo, y esto se puede lograr mediante el uso de agentes químicos que al actuar sobre las bacterias las destruyen y a éstas se les llama bactericidas y su acción es irreversible.

Antisépticos: Se denominan a las sustancias químicas que pueden ser aplicadas para que su acción se ejerza sobre los microorganismos que existen en los tejidos vivos sin dañarlos.

CONTROL POR AGENTES QUÍMICOS

Los desinfectantes y antisépticos difieren de los antimicrobianos activos por vía general en que poseen poca toxicidad selectiva: no sólo son tóxicos para los parásitos microbianos sino también para las células del hospedero. Por lo tanto, pueden ser usados solamente para inactivar microorganismos en el medio inanimado o hasta cierto grado sobre la superficie cutánea, pero no pueden administrarse por vía general y no son activos en los tejidos.

La acción antimicrobiana de los desinfectantes está determinada por su **concentración**, **tiempo de acción** y **temperatura** y la valoración de su efecto puede ser compleja.

CARACTERÍSTICAS DE UN DESINFECTANTE IDEAL

Ningún agente químico antimicrobiano sólo es el mejor para uno o todos los propósitos. En vista de la gran variedad de condiciones bajo las que dichos agentes se usan, no son de sorprender las diferencias en sus mecanismos de acción y los muchos tipos de células microbianas que pueden ser destruidas. Si hubiera un desinfectante ideal, tendría que poseer un conjunto de características extraordinarias. Quizás nunca se encuentre un sólo compuesto que tenga dichas propiedades. No obstante las especificaciones descritas abajo van dirigidas a la preparación de nuevos compuestos y deben ser consideradas al evaluar los desinfectantes para usos prácticos.

1. Actividad antimicrobiana
2. Solubilidad
3. Estabilidad
4. No deberá ser tóxico al humano u otros animales
5. Homogeneidad
6. No deberá reaccionar con material orgánico o extraño
7. Toxicidad para los microorganismos a la temperatura ambiente y a la del cuerpo
8. No deberá corroer ni teñir
9. Capacidad de penetración
10. Propiedad desodorante



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	116 / 182

11. Capacidad detergente
12. Disponibilidad
13. Alta actividad germicida aún diluido
14. Espectro de acción amplio
15. Ser bactericida mejor que bacteriostático
16. Ser compatible con otros productos que se usen antes o simultáneamente
17. Debe conseguir una reducción logarítmica de los microorganismos patógenos

¿CÓMO ESCOGER UN DESINFECTANTE?

Cierto tipo de compuestos son particularmente eficaces para algunos usos y poco o ningún valor en otros. Generalmente hablando de los factores que se deben considerar en la selección de agentes químicos antimicrobianos son:

- Costo
- Naturaleza del material que será tratado
- Tipo de microorganismos
- Condiciones ambientales
- Eficacia (eficiencia de destrucción contra virus, bacterias y hongos)
- Actividad residual
- Efectividad sobre metales
- La actividad con los detergentes

La importancia relativa de estas características dependerá de su situación individual, pero la eficacia y toxicidad son los intereses más importantes a considerar. Es conveniente saber, que ningún desinfectante trabaja instantáneamente. Todos requieren una cantidad determinada de tiempo de contacto para ser efectivos. La temperatura y la concentración del desinfectante influyen en el valor de eliminación de microorganismos, por lo tanto es necesario usar la concentración recomendada por el fabricante del producto. Todos los desinfectantes son menos efectivos en presencia de material orgánico, es decir, no se puede desinfectar la suciedad, es primordial haber realizado una limpieza previamente; la materia orgánica se inmiscuye con la acción de desinfectantes por el revestimiento del microorganismo patógeno y su prevención al contacto con el desinfectante, formando barreras químicas con el desinfectante, por lo tanto lo hace inactivo contra los microorganismos reaccionando químicamente y neutralizando el desinfectante.

PRINCIPALES GRUPOS DE AGENTES QUÍMICOS ANTIMICROBIANOS

A continuación se refieren algunos de los principales agentes químicos antimicrobianos. Se han agrupado arbitrariamente bajo los siguientes títulos:

1. Fenoles y compuestos fenólicos
2. Alcoholes



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	117 / 182

3. Halógenos
4. Metales pesados y sus compuestos
5. Colorantes
6. Detergentes
7. Compuestos de amonio cuaternario
8. Ácidos y álcalis
9. Glutaraldehído
10. Quimioestabilizadores gaseosos (óxido de etileno, β -propiolactona, formol)

CLASIFICACIÓN DE AGENTES QUÍMICOS

Los agentes químicos, de acuerdo a su concentración y lugar de aplicación para eliminar o controlar el crecimiento de los microorganismos, pueden ser clasificados en: *bactericidas*, *bacteriostáticos*, *antisépticos* y *desinfectantes*.

Las soluciones de agentes químicos con actividad antibacteriana o antimicrobiana en general, se pueden clasificar de varias maneras:

1. De acuerdo a la capacidad de desinfección, se clasifican los desinfectantes en tres grupos:

Grado alto: destruyen toda clase de organismos con excepción de esporas bacterianas.

Grado intermedio: destruyen microbacterias, bacterias y la mayoría de virus y hongos.

Grado bajo: destruyen la mayoría de las bacterias, algunos hongos y algunos virus.

2. De acuerdo a los componentes químicos:

Compuestos derivados del cloro, peróxido de hidrógeno, yodóforos, alcoholes, fenoles, detergentes, jabones, agentes alquilantes, etc.

3. De acuerdo al tipo de microorganismos que destruyen:

Esporicidas, microbactericidas, fungicidas, viricidas y parasitocidas.

El siguiente cuadro muestra diversos desinfectantes así como el grado de actividad con que activan:

Cuadro 1. Desinfectantes y su grado de actividad de acuerdo a su concentración.

Agente	Concentración	Grado de actividad
--------	---------------	--------------------



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	118 / 182

Óxido de etileno (gas)	450-800mg/L	Elevada
Glutaraldehído	Variable	Alta a Intermedia
Peróxido de hidrógeno	3-6%	Alta a Intermedia
Formaldehído	1-8%	Alta a Baja
Dióxido de cloro	Variable	Alta
Acido acético	Variable	Alta
Productos clorados	5-500 ppm	Intermedia
Alcoholes	70 %	Intermedia
Fenoles	0.5-3 %	Intermedia a Baja
Yodóforos	30-50 mg de yodo/L	Intermedia a Baja
Productos de amonio cuaternario	0.1-0.2%	Baja
Compuestos mercurícos	1:500-1:1000	Baja

Fuente: Cortesía de E.H. Sapulding, Temple University.

Los desinfectantes de alto grado se utilizan para objetos relacionados con intervenciones Invasivas que no pueden soportar la esterilización.

Por ejemplo. Ciertos tipos de endoscopios, instrumentos quirúrgicos con partes de plástico u otros componentes que no pueden esterilizarse en autoclave.

La desinfección de esos objetos es más afectiva si el tratamiento va precedido por limpieza de las superficies para eliminar materia orgánica.

La desinfección de grado intermedia se emplea para superficies limpias o instrumentos en los que se considera improbable la contaminación por esporo bacteriana u otros organismos resistentes.

Estos objetos se conocen como instrumentos y dispositivos semi críticos que incluyen fibra endoscopias flexibles, laringoscopias, espéculos vaginales, circuitos respiratorios de anestesia entre otros.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	119 / 182

Los desinfectantes de grado bajo se utilizan para dispositivos e instrumentos no críticos, como mangas para medir la presión arterial, electrodos, electrocardiográficos y fenendoscopias.

Aunque estos objetos entran en contacto con el paciente, no penetran a través de las superficies mucosas ni en los tejidos estériles.

El nivel de los desinfectantes utilizados para las superficies ambientales está determinado por el riesgo relativo de que tales superficies actúen como reservorios de microorganismos patógenos.

Por ejemplo se debe emplear un desinfectante de grado alto para limpiar la superficie de instrumentos contaminados con sangre, para los suelos o pisos. En caso de una infección nosocomial donde involucre *Clostridium difficile* o *Pseudomonas aeruginosa* se debe seleccionar un desinfectante con actividad apropiada para desinfectar los cuartos de baño, pisos, habitación y todo aquello que estuvo en contacto con el paciente.

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS AGENTES QUÍMICOS

Los agentes químicos actúan de manera primaria por uno de los tres mecanismos:

1. Rotura de membranas celulares
2. Modificación de las proteínas
3. Modificación de los ácidos nucleicos

Cada uno de los compuestos químicos se puede clasificar en cada una de las tres, pero algunos de ellos utilizan más de un mecanismo.

EVALUACIÓN DE LOS DESINFECTANTES Y ANTISÉPTICOS

Existe una gran variedad de desinfectantes y antisépticos en el comercio para diferentes aplicaciones. Las técnicas de laboratorio para evaluar los agentes químicos antimicrobianos siguen uno de tres procedimientos generales. En cada una el agente es probado contra un microorganismo seleccionado al que se le denomina microorganismo de prueba.

1. Técnica de dilución en tubo
2. Técnica de dilución en placa de agar
3. Método del coeficiente fenólico

REVERSIÓN DE LA ACCIÓN ANTIMICROBIANA

La acción bacteriostática es reversible por definición. Esto puede lograrse de varias maneras:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	120 / 182

1. Eliminación del agente
2. Reversibilidad por sustrato
3. Inactivación del agente
4. Protección contra la lisis

CONTROL DE CALIDAD

Al utilizar un desinfectante es importante considerar todas las variables que pudieran alterar la correcta desinfección.

- Uno de los errores más comunes consiste en suponer que las diluciones de los desinfectantes producen incrementos iguales en el tiempo necesario para producir la desinfección.
- Otro error es suponer que el desinfectante es capaz de realizar su efecto independientemente de la cantidad de materia orgánica presente, ya que produce una barrera mecánica para la penetración del desinfectante.
- También se debe de considerar el desarrollo de protocolos de limpieza y desinfección del instrumental, la elaboración de registros que incluyan la información detallada sobre el seguimiento de dichos protocolos, cuando se labora en laboratorio farmacéutico, clínico y hospitales.

Material y reactivos

Material

Por equipo de trabajo:

- 4 cajas de agar nutritivo
- 50 discos de papel filtro estériles
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Pinzas de disección
- Soluciones de agentes químicos (variadas)

Material biológico



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	121 / 182

- Cepa de bacteria grampositiva (*S. aureus*)
- Cepa de bacteria gramnegativa (*E. coli*)

Equipo

- Incubadora

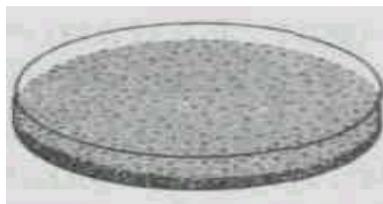
Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

Sembrar en forma masiva dos cajas de agar nutritivo con la cepa de Gram positiva, y las otras dos cajas de la misma forma con la cepa Gram negativa.

Figura 1. Sembrado masivo en caja Petri.

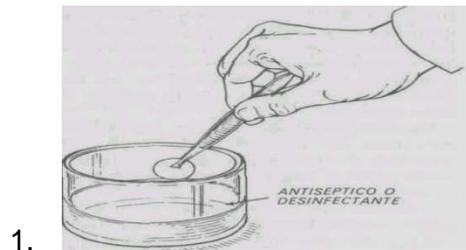


2. Con pinzas de disección tomar un disco de papel filtro cerca del mechero (con las pinzas previamente desinfectadas y flameadas) introducirlo en una de las soluciones químicas, y escurrir el exceso de solución.

Figura 2. Forma de impregnar el disco estéril del agente químico.

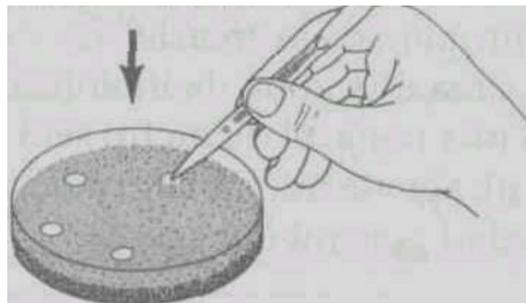


Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	122 / 182



3. Colocar los discos estériles (**cinco**) considerando los cuatro puntos cardinales y uno al centro, en las cajas sembradas tanto para la bacteria Gram positiva, como la Gram negativa, presionando ligeramente, y esperar 10 minutos para poder invertir la caja.

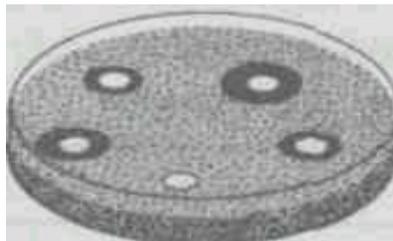
Figura 3. Forma correcta de colocar los discos en la caja Petri.



4. Incubar a 37 °C.

5. Leer los resultados a las 24 y 48 horas, respectivamente.

Figura 4. Lectura de los halos de inhibición formados

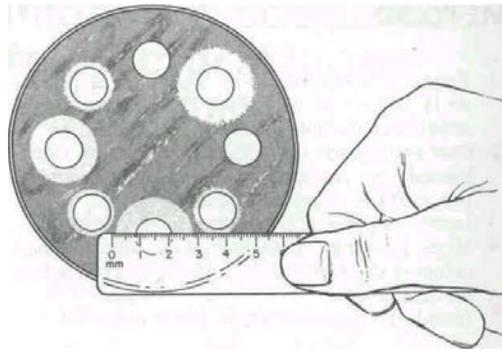




Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	123 / 182

6. Reportar el diámetro de inhibición del halo formado, medido con una regla en centímetros, (no medir ni reportar halos de inhibición fusionados).

Figura 5. Forma correcta de medir los halos de inhibición formados



Reporte de resultados

Cuadro 2. Reporte de resultados

Agente químico	Bacteria usada	Concentración	Diámetro de inhibición	
			24 horas	48 horas

Origen: Creación propia

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	124 / 182

R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos. En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

1. Defina el coeficiente fenólico, su utilidad y cómo se determina
2. ¿Qué diferencia existe entre los jabones y detergentes, y cuál es el más efectivo como desinfectante?
3. Mencione dos formas farmacéuticas cuyo principio activo sea un ión metálico.
4. ¿De qué factores físicos y químicos depende la acción desinfectante de las diversas sustancias químicas?
5. Explique por qué es más efectivo como desinfectante una solución de etanol al 75% que el etanol absoluto.
6. Mencione las diferencias entre antiséptico y desinfectante?
7. Explique en qué consiste el efecto ya sea bactericida o bacteriostático de un agente químico.
8. ¿Qué factores condicionan el fenómeno de desinfección?
9. ¿Por qué las esporas bacterianas son difíciles de eliminar con agentes químicos?
10. Describa el mecanismo de acción de cada uno de los principales grupos de agentes químicos mencionados en la introducción de la práctica.

Referencias

1. Burrows W. Tratado de microbiología. 20ª ed. México: Interamericana; 1998.
2. Cabello R. Microbiología y Parasitología Humana 2ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2003.
3. Dushyant KSh,. Microbiology. 2da. ed. India: Alpha Science; 2013.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	125 / 182

- Jawetz E, Melnick LJ, Adelberg AE. Microbiología Médica. 11ª ed. México: Editorial El Manual Moderno; 1985.
- Mcdonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clinical Microbiology Reviews 12-147-179.
- Murray PR, et al. Microbiología médica. 2ª ed. Madrid España: Harcourt Brace; 1999.
- Ponce de Leva R.S. Manual de prevención y control de infecciones hospitalarias. Serie HSP/Manuales operativos PALTEX VOL. N° 13, 1996.
- Prescott LM, Harley JP, y Klein DA. Microbiología. 5ª ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2004.
- Tay Zavala J, et al. Microbiología y parasitología médicas. 4ª ed. México: Méndez editores; 1993.
- Delgado ME, Díaz RP. Elaboración y documentación de un programa de limpieza y desinfección de los laboratorios del departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana. Colombia Tesis (Microbiología industrial). [Internet] 2006; [consultado el 14 de junio de 2016]; 17-35. Disponible en:
<http://www.javeriana.edu.co/biblios/tesis/ciencias/tesis281.pdf>.
- NMX-BB-040-SCFI-1999. Métodos generales de análisis- determinación de la actividad antimicrobiana en productos germicidas. Secretaría de Comercio y Fomento Industrial.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Práctica 13: Control microbiológico III (Efecto de los antibióticos)

Objetivos

- Clasificar a los antibióticos de acuerdo a los diversos criterios como son: espectro y sitio de acción.
- Interpretar los halos de inhibición producidos por los diversos antibióticos.
- Describir los diversos mecanismos de drogorresistencia utilizados por las bacterias.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	126 / 182

Aspectos teóricos

La introducción de los agentes antimicrobianos ha sido uno de los avances más revolucionarios de la medicina en los últimos cincuenta años, así para el tratamiento de la malaria se empleaba la corteza del árbol de la *quina*, también se conocía como algunas bacterias son capaces de inhibir el crecimiento de otras. En 1889 Vuillemin y Ward, dieron el nombre de *antibiosis* a los fenómenos de antagonismo microbiano.

En relación con el tipo de microorganismo que inactivan, se pueden denominar: antimicrobianos, antivíricos, antiprotozoarios y antifúngicos.

De lo anterior, se desprenden las siguientes definiciones:

ANTIBIÓTICOS. Son las sustancias químicas producidas por microorganismos y que poseen acción antibacteriana (actúan contra las bacterias).

QUIMIOTERAPÉUTICO. Compuestos obtenidos por síntesis química y con características antibacterianas.

ANTIMICROBIANO. Incluye compuestos obtenidos a partir de microorganismos y los producidos por síntesis química, muchos antibióticos se pueden obtener por síntesis después de su caracterización.

MECANISMO DE ACCIÓN

Los antimicrobianos ejercen su acción en forma específica sobre alguna estructura o función del microorganismo a atacar. Esta actividad la realizan a concentraciones muy bajas, y al producir pocos efectos secundarios puede utilizarse en el interior del organismo humano, y además presentan una toxicidad selectiva, es decir, una mínima toxicidad para las células del organismo. Este aspecto constituye una diferencia fundamental con otras sustancias químicas, como los *antisépticos* y los *desinfectantes*.

CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Existen diferentes criterios para agrupar a los antibióticos, según se describe a continuación.

I. POR SU EFECTO ANTIBACTERIANO



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	127 / 182

1. **Bacteriostático.** Impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas, por lo que su efecto es reversible, cuando se retira el antibiótico, la bacteria se multiplica de nuevo.
2. **Bactericidas.** Su acción es total, produciendo la lisis bacteriana, con efectos irreversibles. El prototipo de agentes bactericidas lo constituyen los que actúan sobre la pared celular de la bacteria o sobre la membrana citoplasmática.

II. POR SU ESPECTRO

1. **De amplio espectro.** Aquellos antibióticos que son activos sobre un número amplio de especies bacterianas, por ejemplo la tetraciclina.
2. **De espectro intermedio.** Cuando tiene acción sobre un número limitado de especies, por ejemplo: los macrólidos.
3. **De espectro reducido.** Solamente son activos sobre un pequeño número de especies bacterianas, por ejemplo: los glucopéptidos.

III. POR SU ESTRUCTURA QUÍMICA

Esta clasificación se fundamenta en la estructura química que sirve como esqueleto del antibiótico, por ello la lista resulta ser algo larga:

Beta Lactámicos	Nitrofuranos
Penicilinas	Nitroimidazoles
Cefalosporinas	Polipeptídicos
Monobactámicos	Quinolonas
Carbapenemos	Rifampicinas
Aminociclotoles	Sulfunamidas
Aminoglicósidos	Tetraciclinas
Anfenicoles	Sinergistinas
Glucopéptidos	Macrólidos
Lincosamidas	

IV. POR SU MECANISMO DE ACCIÓN



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	128 / 182

El efecto antibacteriano sobre algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas:

1. Impidiendo la síntesis de la pared bacteriana.
2. Alterando la permeabilidad de la membrana citoplasmática.
3. Inhibiendo la síntesis proteica.
4. Bloqueando la síntesis de ácidos nucleicos.
5. Interfiriendo en las vías metabólicas.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Las pruebas de laboratorio de sensibilidad a los antibióticos se dividen en dos categorías:

1. Pruebas de difusión.
2. Pruebas de dilución.

I. Pruebas de difusión

El microorganismo aislado y puro que se va a estudiar, se siembra sobre la superficie de una placa de agar de Mueller-Hinton conociendo la concentración de bacterias que se siembra, se aplican discos de papel filtro que contengan concentraciones diversas de los antibióticos a probar. Tras la incubación de 24 horas se observan y se mide la zona de inhibición de crecimiento alrededor de cada disco.

La cantidad de antibiótico en el disco se relaciona, entre otras cosas, con la concentración sérica que puede alcanzarse y por ello diferente en cada antibiótico. Además, los antibióticos difieren en su capacidad de difundir en el agar, de forma que el tamaño de la zona de inhibición es indicador de la sensibilidad. El tamaño de las zonas se compara con el de microorganismos de referencia estudiados en paralelo o establecidos previamente y publicados en tablas. El resultado se registra como S (Sensible), I (Intermedio) o R (Resistente).

II. Pruebas de dilución

Se puede conseguir una estimación más cuantitativa de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico realizando una prueba de *Concentración Inhibitoria Mínima* (CIM) es decir, la concentración más baja que inhibirá *in vitro* el crecimiento de la bacteria a prueba.

Se preparan diluciones seriadas del antibiótico en caldo o en agar y se inoculan con una suspensión de bacterias aisladas, se incuban a 37 °C durante 24 horas, se registra la CIM como la dilución más alta a la cual no hay crecimiento microscópico.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	129 / 182

Estas pruebas pueden realizarse en una microplaca y forman la base de los sistemas de pruebas de sensibilidad automatizados.

Las pruebas de CIM son más costosas que las pruebas de difusión, además de que requieren mayor tiempo para su realización, por lo tanto no es necesario realizarlas de manera rutinaria, aunque suelen dar información útil para el tratamiento de infecciones difíciles como la endocarditis *bacteriana*.

Otra ventaja de una prueba de CIM es que puede extenderse para determinar la *Concentración Letal Mínima (CLM)*, la cual es la concentración más baja de un antibiótico necesaria para matar a las bacterias. Para descubrir si el agente ha matado en realidad la bacteria en lugar de inhibirla, las diluciones de prueba se subcultivan en un medio adecuado sin el antibiótico, y se incuban de 18 a 24 horas. Se considera bactericida al antibiótico si la CLM es igual o menos de cuatro veces a CIM.

Combinación de antibióticos

Los pacientes hospitalizados o ambulatorios, reciben con frecuencia más de un agente antibacteriano los cuales pueden interactuar entre sí y también con otros fármacos, como los diuréticos, las combinaciones de antibióticos pueden ser:

1. **Sinérgicos:** Si la actividad es mayor a la suma de las actividades individuales.
2. **Antagónico:** Si la actividad de un fármaco se ve reducida por la presencia de otro.
3. **Aditivo:** Si el efecto de ambos antibióticos combinados, es igual a la suma de los efectos individuales.

Las pruebas de dilución y difusión permiten estudiar la acción de combinaciones de antibióticos.

Material y reactivos

Material

- Asas bacteriológicas
- Multidiscos de Gram positivos
- Multidiscos de Gram negativos
- Pinzas de disección
- Mechero Bunsen
- 2 Cajas de medio Mueller-Hinton



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	130 / 182

Material biológico

- *E. coli*
- *S. aureus*

Servicios

- Gas

Procedimiento

REALIZACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA

Sembrar masivamente una caja de agar Mueller-Hinton, con la cepa de *E. coli*.

Flamear las pinzas de disección y cerca del mechero tomar un multidisco para Gram negativos.

Colocar el multidisco sobre la caja de Petri sembrada y presionar ligeramente, para fijar el multidisco.

Realizar el mismo procedimiento para la cepa de *S. aureus*, utilizando el multidisco para Gram positivos.

Incubar las cajas a 37 °C durante 24 horas.

Leer los resultados, midiendo los halos de inhibición e interpretar estos mediante las tablas de sensibilidad del inserto.

Resultados esperados

Hacer para cada bacteria la siguiente tabla:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	131 / 182

Nombre de la Cepa:		
Antibiótico	Halo de inhibición (mm)	Interpretación

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Cuestionario

- 1) ¿Por qué se utiliza el agar Mueller-Hinton para la sensibilidad bacteriana de los antibióticos?
- 2) ¿Cuál es la importancia de determinar para una bacteria los parámetros de CIM y CLM?
- 3) Dibuje las estructuras químicas de:
 - a) Beta-lactámicos
 - b) Eritromicina
 - c) Tetraciclina
- 4) Describa brevemente el mecanismo de acción de los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana y de algunos ejemplos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	132 / 182

- 5) Describa brevemente el mecanismo de acción de los antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana bacteriana y de algunos ejemplos.
- 6) Describa la técnica de Kirby-Bauer.
- 7) Mencione el mecanismo de acción de los siguientes antibióticos
 - i) Sulfonamidas
 - ii) Ceftriaxona
 - iii) Ácido nalidíxico
- 8) Mencione cómo adquieren algunas bacterias, de manera natural, resistencia a los antibióticos.
- 9) Mencione cómo se manifiestan los mecanismos de drogorresistencia.
- 10) ¿Qué factores intervienen o modifican los resultados de un antibiograma?

Referencias

5. Bauman RW, Machunis-Masuoka E, Montgomery JE. Microbiology: with diseases by body system. 4a ed. Boston: Pearson; 2014.
6. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. 27 Edition. McGraw-Hill Education / Medical; 2015.
7. Cornelissen CN. Lippincott Illustrated Reviews Flash Cards: Microbiology. 1 Flc Crds edition. U.S.A.: LWW; 2015.
8. Madigan, MT, Martinko, JM, Dunlap, PV, Clark, DP. Brock: Biología de los microorganismos. 14a ed. España: Pearson Addison Wesley; 2015. 1259 p.
9. Pommerville JC. Alcamo's Fundamentals of Microbiology. 8th ed. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett; 2007.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	133 / 182

Práctica 14: Fisiología Bacteriana

Objetivos

- Clasificar las diversas pruebas bioquímicas según el tipo de reacción que se lleva a cabo.
- Interpretar las diversas pruebas bioquímicas considerando los resultados falsos negativos y/o falsos positivos.

Aspectos teóricos



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	134 / 182

Las numerosas reacciones bioquímicas que constituyen el metabolismo sintético y energético de los microorganismos se controlan y realizan por medio de las enzimas y su entendimiento es esencial para comprender las relaciones huésped-parásito y microorganismos-ecosistemas.

La determinación de las características bioquímicas es el paso primordial para la identificación de la gran mayoría de los microorganismos, la identificación es hecha comprobando la desaparición de un producto inicial o la aparición de un metabolito intermedio o de un producto final.

Deben de verificarse los efectos o cambios que sufre el medio de cultivo (producto inicial o terminal), para lo cual debe de registrarse su aspecto antes y después de la inoculación (testigo positivo y negativo blanco) y tener en mente que estos cambios pueden no haber sido causados por los microorganismos, sino por alteraciones físicas como el calor o el congelamiento y por alteraciones químicas como reacciones redox. Debe verificarse además la funcionalidad de los reactivos usando los testigos adecuados.

Al realizar este tipo de determinaciones deben tomarse en cuenta algunos factores que influyen directamente en el metabolismo bacteriano, tales como:

- Temperatura de incubación.
- pH óptimo de crecimiento.
- Concentración de oxígeno y bióxido de carbono.
- Tipo de medio de cultivo.
- Tipo de esterilización.
- Tipo de microorganismo.

Materiales y reactivos

Material por Equipo

- Mechero.
- Asa bacteriológica recta.
- Masking tape.

Medios líquidos:

- Caldo rojo de fenol y glucosa.
- Caldo rojo de fenol y lactosa.
- Caldo rojo de fenol y sacarosa.
- Caldo rojo de fenol y manitol.
- Caldo rojo de fenol y sorbitol.
- Caldo nitrato.

Cepas

- *Staphylococcus aureus*.
- *Staphylococcus epidermidis*.
- *Corynebacterium xerosis*.
- *Bacillus subtilis*.
- *Streptococcus mutans*.
- *Micrococcus lysodeikticus*.
- *Enterococcus faecalis*.
- *Escherichia coli*.
- *Pseudomonas aeruginosa*.
- *Proteus vulgaris*.
- *Enterobacter aerogenes*.
- *Klebsiella pneumoniae*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	135 / 182

- Caldo RM-VP.
- *Serratia marcescens*.
- *Salmonella sp.*
- *Shigella sp.*

Medios semisólidos.

- Gelatina nutritiva.
- Medio O/F glucosa.
- Medio MIO.
- Medio SIM.

Medios sólidos.

- Agar TSI.
- Agar LIA.
- Agar citrato de Simmons.
- Agar urea de Christensen.
- Agar de fenilalanina.
- Agar almidón.

Reactivos

- α -naftilamina
- Ácido sulfanílico
- Rojo de metilo
- α -naftol al 5%
- KOH al 40%
- Reactivo de Kovacs
- FeCl_3 en solución acuosa al 10%
- Yodo acuoso de lugol

Equipo

- Incubadora

Servicios

- Gas
- Electricidad



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	136 / 182

Procedimiento

I. MEDIOS LÍQUIDOS

1. CALDO ROJO DE FENOL MÁS CARBOHIDRATOS

Fermentación de Carbohidratos

Los microorganismos pueden fermentar algunos carbohidratos y producir uno o más ácidos orgánicos como productos finales, lo que puede demostrarse agregando al medio de cultivo un indicador ácido-base.

La fermentación es un proceso metabólico de oxidación-reducción anaeróbico en el cual un sustrato orgánico sirve como el aceptor de hidrógeno final (aceptor de electrones) en lugar del oxígeno. Existen distintas clases de fermentación producida por las bacterias, y cada una depende de los productos finales característicos formados. Los grupos más importantes de bacterias exhiben uno de los cinco tipos principales de formas de fermentación.

FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

Glucosa \rightarrow 2 etanol + CO₂ (llevada a cabo por levaduras como *Saccharomyces sp*).

Fermentación del ácido láctico. Las bacterias que producen ácido láctico pueden ser divididas en dos subgrupos: Fermentadoras homolácticas (los microorganismos producen casi exclusivamente ácido láctico con vestigios únicamente de otros productos finales, la llevan a cabo algunos lactobacilos, *Bacillus sp* y *Streptococcus sp*) y heterolácticas (los microorganismos producen ácido láctico, acético, etanol y CO₂, la llevan a cabo algunos lactobacilos y *Leuconostoc*).

Fermentación fórmica. Característica de la familia *Enterobacteriaceae*, esta fermentación puede subdividirse en: fermentación ácido mixta (los microorganismos producen ácido fórmico, acético, láctico y succínico, así como etanol, CO₂ e H₂, la *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Shigella sp* y *Proteus sp* muestran este tipo de fermentación.) y fermentación butilenglicólica (los microorganismos producen los mismos productos de la fermentación ácido mixta en menor cantidad y 2,3-butilenglicol también llamado .butanediol, *Klebsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Aeromonas sp* y *Bacillus polymixa* muestran este tipo de fermentación).

Fermentación propiónica. El principal producto final del ácido pirúvico es el ácido propiónico y CO₂, aunque puede producirse ácido acético (*Propionibacterium sp*, *Clostridium propionicum*, *Corynebacterium diphtheriae* y algunas especies de *Neisseria*, *Veillonella* y *Micromonospora* muestran este tipo de fermentación).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	137 / 182

Fermentación acetona-butanólica. La fermentación del alcohol butílico es efectuada por bacterias anaeróbicas como algunas especies de *Clostridium sp*, *Butyribacterium sp* y *Zymosarcina maxima*. Los diferentes productos finales formados son: ácido acético, ácido fórmico, etanol, ácido butírico, alcohol butílico (butanol), acetona, alcohol isopropílico y CO₂ e H₂.

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con Caldo rojo de fenol y glucosa.
- 1 tubo de 13x100 con Caldo rojo de fenol y lactosa.
- 1 tubo de 13x100 con Caldo rojo de fenol y sacarosa.
- 1 tubo de 13x100 con Caldo rojo de fenol y manitol.
- 1 tubo de 13x100 con Caldo rojo de fenol y sorbitol.

MÉTODO

1. Inocular por difusión cada uno de los caldos con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo denso.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 18-24 horas.
3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

2. CALDO NITRATO

Reducción de Nitratos a Nitritos

Los microorganismos facultativos, durante la respiración utilizan como aceptor final de electrones al oxígeno, el cual actúa como aceptor final de electrones durante la respiración; sin embargo, en condiciones anaerobias dichos microorganismos pueden llevar a cabo la reducción de nitratos (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻), óxidos de nitrógeno (NO o N₂O), amoníaco (NH₃) o a nitrógeno molecular (N₂) y así obtener oxígeno a partir del nitrato. El producto formado a partir de la reducción depende del microorganismo del que se trate. Las reacciones generales para la reducción de nitratos son las siguientes:

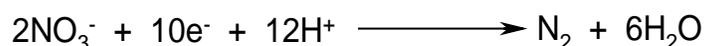
Reducción de nitratos a nitritos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	138 / 182



Nitrato a nitrógeno molecular.



El medio basal para efectuar esta prueba contiene nitrato de potasio (KNO_3) en una concentración de 0.1%.

MATERIAL:

- 1 tubo de 13x100 con Caldo Nitratado.

REACTIVOS:

- Reactivo A: α -Naftilamina o N,N-dimetil- α -naftilamina.
- Reactivo B: ácido sulfanílico.

MÉTODO:

1. Inocular por difusión el caldo nitrato con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo denso.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 24-48 horas.
 - a. **Fase I:** Después de la incubación agregar 5 gotas del reactivo A y 5 gotas del reactivo B. Agitar el tubo con suavidad para mezclar los reactivos. Esperar 1-2 minutos para que se desarrolle un color rojo. Dicho color denota una prueba terminada. Si el resultado es negativo se continua con la fase II.
 - b. **Fase II:** Agregar una pizca (alrededor de 20 mg.) de polvo de cinc (Zn). Esperar 5-10 minutos

Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	139 / 182

3. CALDO RM-VP (ROJO DE METILO / VOGES-PROSKAUER)

Prueba del Rojo de Metilo

Esta prueba se utiliza para identificar microorganismos que producen grandes cantidades de ácidos (láctico, succínico, acético, fórmico) a partir de la glucosa, por vía de la fermentación ácido mixta. Forma parte de pruebas IMViC (Indol-rojo de metilo-Voges-Proskauer-citrato) que se utilizan para caracterizar bacterias entéricas (principalmente para diferenciar entre la *Escherichia coli* y los grupos *Klebsiella-Enterobacter*).

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con Caldo RM-VP.

REACTIVOS

Rojo de Metilo (indicador de pH).

MÉTODO

1. Inocular por difusión el caldo RM-VP con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo liviano.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 48-72 horas mínimo (se recomienda incubar a una temperatura de 30 °C por 3-5 días).
3. Después de la incubación agregar 5 gotas de indicador rojo de metilo.
4. Si la reacción es negativa, continúe incubando durante otros tres días y agregue un poco más de rojo de metilo.
5. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

Prueba de Voges-Proskauer (IMViC)

Se utiliza para identificar bacterias que al degradar la glucosa por la vía de la fermentación ácido mixta, producen **acetoína** (acetilmetilcarbinol), la cual es un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa.

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con Caldo RM-VP.

REACTIVOS

- α -Naftol al 5%.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	140 / 182

- Hidróxido de potasio (KOH) al 40% (o NaOH al 40%).

MÉTODO

1. Inocular por difusión el caldo RM-VP con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo liviano.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 24-48 horas.
3. Después de la incubación agregar 0.6 mL de la solución de α -Naftol al 5%.
4. Agregue 0.2 mL de la solución de KOH al 40%.
5. Agitar el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoina y obtener una reacción de color.
6. Deje reposar el tubo durante 10-15 antes de intentar la interpretación de color.
7. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

II. MEDIOS SEMISÓLIDOS

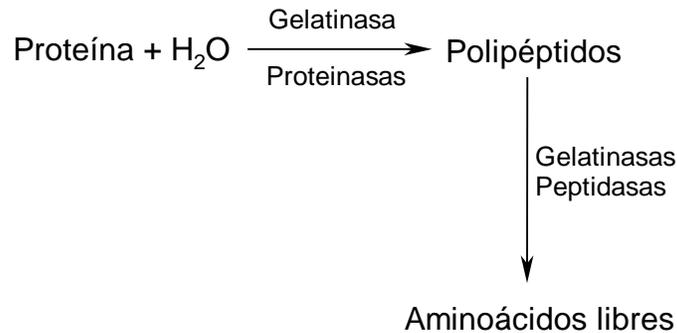
1. Gelatina Nutritiva

LICUEFACCIÓN DE LA GELATINA

La habilidad de las bacterias para producir enzimas de tipo proteolítico es comprobada por el desdoblamiento de la gelatina (una proteína derivada del colágeno animal), lo cual se pone de manifiesto por la digestión o licuefacción del medio. Las enzimas capaces de producir gelatinosis se denominan gelatinasas; estas enzimas proteolíticas a menudo son importantes factores de virulencia de algunos microorganismos. El catabolismo de las proteínas por parte de las gelatinasas es un proceso de dos pasos; el resultado final es una mezcla de aminoácidos aislados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	141 / 182



En el medio, la gelatina es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constitutivos, con pérdida de sus características gelificantes.

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con Medio de Gelatina Nutritiva.

MÉTODO

1. Inocular por punción el medio con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo denso.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 24-48 horas.
3. Coloque los tubos en el refrigerador por 30 minutos y observe.
4. En caso de una prueba negativa incuba hasta las 72 horas y repita el procedimiento.
5. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

2. Medio O/F Glucosa de Hugh y Leifson

PRUEBA DE OXIDACIÓN-FERMENTACIÓN

Las bacterias utilizan los hidratos de carbono por uno de los dos procesos metabólicos, fermentativo u oxidativo. Algunas bacterias pueden metabolizar un hidrato de carbono sólo en condiciones aerobias (oxidación), mientras que otras producen ácido tanto de modo aerobio como anaerobio (fermentación).

El medio **O/F de Hugh y Leifson** es utilizado para determinar el metabolismo oxidativo o fermentativo de un hidrato de carbono o su falta de utilización. Este medio difiere de los medios de utilización de carbohidratos en lo siguiente: La concentración de proteínas ha sido disminuida del 1% al 0.2% con el fin de limitar la formación de productos alcalinos que pudieran neutralizar el efecto de los productos ácidos, y además la concentración de carbohidratos (glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa, manitol o xilosa) está aumentada del



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	142 / 182

0.5% al1%, lo cual promueve la utilización de los carbohidratos dando como resultado la formación de productos ácidos.

MATERIAL

- 1 tubo de 18x150 con Medio O/F glucosa de Hugh y Leifson con sello.
- 1 tubo de 18x150 con Medio O/F glucosa de Hugh y Leifson sin sello.

MÉTODO

1. Inocular por punción el medio con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo poco denso.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 48 horas (esta prueba puede necesitar 3-4 días o incluso hasta 14 días de incubación).
3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

3. Medio MIO

PRUEBA DE MOVILIDAD

Esta prueba sirve para determinar si un microorganismo es móvil (debido a la presencia de flagelos) o inmóvil (microorganismos carentes de flagelos).

PRUEBA DE INDOL (IMViC)

Esta prueba ayuda a determinar la capacidad de un microorganismo para formar indol a partir de la degradación del triptófano. El triptófano es un aminoácido que puede ser oxidado por ciertas bacterias para formar tres metabolitos indólicos principales: indol, escatol (metil indol) y ácido indolacético. Las enzimas intracelulares que catalizan estas transformaciones constituyen un sistema enzimático completo que recibe el nombre colectivo de triptofanasa. Los medios MIO y SIM son utilizados para detectar la producción de indol, para lo cual, después de ser incubados deben someterse a un ensayo químico que consiste en agregar reactivo de Kovacs o Ehrlich para identificar el indol acumulado.

PRUEBA DE LA DESCARBOXILACIÓN DE LA ORNITINA

La descarboxilación es el proceso por el cual las bacterias que poseen enzimas descarboxilasas específicas atacan los aminoácidos en su carboxilo terminal (-COOH) para formar una amina o una diamina y dióxido de carbono según la reacción general:





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	143 / 182

Para cada aminoácido existe una descarboxilasa específica, sin embargo sólo tres son utilizadas para la identificación de bacterias entéricas: La lisina descarboxilasa, la ornitina descarboxilasa y la arginina descarboxilasa. Estas descarboxilasas son enzimas adaptativas o inducidas que solo se forman cuando un microorganismo es cultivado en un ambiente ácido en presencia de un sustrato específico, y los productos de descarboxilación cambian el pH a límites alcalinos.

En el caso del medio MIO, esta prueba determina si un microorganismo es capaz de descarboxilar la L-ornitina a putrescina (una diamina) por medio de la enzima ornitina descarboxilasa.

MATERIAL:

- 1 tubo de 13x100 con Medio MIO

REACTIVOS:

- Reactivo de Kovacs o Reactivo de Ehrlich

MÉTODO:

1. Inocular por punción el medio con el microorganismo indicado por el asesor.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 24-48 horas.
3. Al finalizar el periodo, añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo. En caso de utilizar el reactivo de Ehrlich este paso debe ser precedido por la adición de 1 mL de cloroformo.
4. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

4. Medio SIM

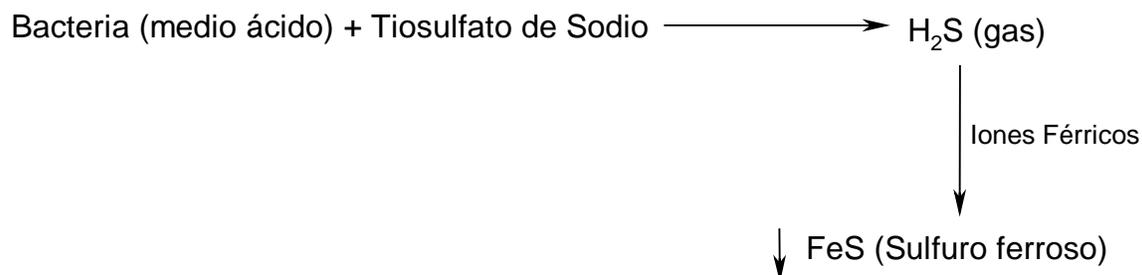
PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO (H₂S)

La proteólisis de las proteínas produce aminoácidos individuales; ciertas bacterias heterotróficas pueden liberar enzimáticamente el azufre de los diversos aminoácidos azufrados (-SH), produciendo H₂S gaseoso. Peptona, cistina, metionina y tiosulfato son las principales fuentes de azufre, pero diferentes especies usan diferentes compuestos o aminoácidos azufrados para producir H₂S. Las enzimas responsables de esta actividad son la cisteína desulfhidrasa y el tiosulfato reductasa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	144 / 182

Existen diferentes medios que contienen plomo o hierro para detectar la producción de H_2S . Cuando el H_2S (gas incoloro) entra en contacto con estos metales, forma un precipitado negro insoluble (sulfuro de plomo o hierro) de acuerdo a la reacción global:



PRUEBA DE INDOL (IMViC). Ver medio MIO.

PRUEBA DE MOVILIDAD. Ver medio MIO.

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con Medio SIM.

REACTIVOS:

- Reactivo de Kovacs o Reactivo de Ehrlich.

MÉTODO:

1. Inocular por punción el medio con el microorganismo indicado por el asesor.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 24-48 horas.
3. Al finalizar el periodo, añadir 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared interior del tubo. En caso de utilizar el reactivo de Ehrlich este paso debe ser precedido por la adición de 1 mL de cloroformo.
4. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

III. MEDIOS SÓLIDOS

1. Agar Triple Hierro Azúcar (TSI)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	145 / 182

FERMENTACIÓN DE CARBOHIDRATOS CON PRODUCCIÓN DE GAS O SIN ELLA

Este medio contiene

- lactosa (1%),
- sacarosa (1%) y
- glucosa (0.1%)

ayuda a determinar si un microorganismo es capaz de atacar alguno o algunos de estos de estos carbohidratos, produciendo acidez en el medio con o sin producción de gas.

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO (H₂S). Ver medio SIM.

MATERIAL:

- 1 tubo de 13x100 con agar TSI.

MÉTODO:

1. Inocular el medio por punción y estría con el microorganismo indicado por el asesor.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 18-24 horas.
3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

2. Agar Hierro Lisina (LIA)

PRUEBA DE LA DESCARBOXILACIÓN DE LA LISINA

En el caso del aminoácido L-lisina, este es descarboxilado para formar una diamina llamada cadaverina y dióxido de carbono por acción de la enzima correspondiente (ver descarboxilación de ornitina, medio MIO).

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SULFHÍDRICO (H₂S). Ver medio SIM.

MATERIAL

- 1 tubo de 13x100 con agar LIA.

MÉTODO

1. Inocular el medio por punción y estría con el microorganismo indicado por el asesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo poco denso.
2. Incubar el tubo a 35 °C durante 18-24 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	146 / 182

3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

Nota: En este medio también es posible detectar la desaminación de la lisina por parte de algunos microorganismos.

3. Agar Citrato de Simmons

APROVECHAMIENTO DE CITRATOS COMO ÚNICA FUENTE DE ENERGÍA (IMViC)

El citrato es una molécula orgánica que puede ser utilizada como única fuente de energía por algunas bacterias que producen la enzima citratasa. Esta enzima es producida por bacterias como *Enterobacter aerogenes* y *Salmonella typhimurium*, pero no es producida por *Escherichia coli* ni *Shigella flexneri*. Así, la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato se convierte en una prueba vital de identificación bacteriana, siendo parte de pruebas IMViC que se utilizan para caracterizar bacterias entéricas. Las reacciones generales para la utilización de citrato como fuente de energía son:



MATERIAL:

- 1 tubo de 13x100 con agar citrato de Simmons.

MÉTODO:

1. Inocular el medio en pico de flauta con el microorganismo indicado por el profesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo liviano.
2. Incubar los tubos a 35 °C durante 24-48 horas.
3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

4. Agar Urea de Christensen

PRUEBA DE LA UREASA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	147 / 182

Sólo ciertos tipos de microorganismos tienen la capacidad de hidrolizar la urea (una diamida del ácido carbónico que a menudo se designa como una carbamida) en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa (o urea amidohidrolasa), y por lo tanto hacen virar al indicador ácido-base (rojo de fenol) debido a la alcalinidad producida.

MATERIAL

- 1 tubo de 18x150 con Agar Urea de Christensen.

MÉTODO

1. Inocular el medio en pico de flauta con el microorganismo indicado por el profesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo denso. No punzar el fondo; sirve como indicador de color.
2. Incubar los tubos a 35 °C durante 24 horas y todos los días sucesivos durante 6 días.
3. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

5. Agar de Fenilalanina

PRUEBA DE FENILALANINA DESAMINASA

El aminoácido fenilalanina puede ser desaminado por la enzima fenilalanina desaminasa para formar ácido fenilpirúvico (un cetoácido) y amoníaco. Esta reacción se pone de manifiesto en el medio de fenilalanina con la adición de FeCl_3 , el cual produce la quelación con el ácido fenilpirúvico para formar un color verde. La exposición de un tubo de cultivo con fenilalanina al oxígeno atmosférico después de agregado el FeCl_3 incrementa la velocidad de producción y la intensidad de una reacción positiva.

MATERIAL:

- 1 tubo de 13x100 con Agar de Fenilalanina.

REACTIVOS:

- Cloruro férrico en solución acuosa (FeCl_3), al 10%.

MÉTODO:

1. Inocular el medio en pico de flauta con el microorganismo indicado por el profesor. La inoculación debe hacerse con un inóculo denso.
2. Incubar los tubos a 35 °C durante 18-24 horas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	148 / 182

3. Agregar 4-5 gotas del reactivo de FeCl_3 al tubo incubado, rotar el reactivo con suavidad sobre el pico de flauta. Una reacción positiva ocurre en 1 minuto. Interpretar la reacción de inmediato ya que el color es inestable y se aclara con rapidez.
4. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.

6. Agar Almidón

PRUEBA DEL ALMIDÓN

El almidón es un polisacárido compuesto de subunidades de α -D-glucosa. Existen microorganismos capaces de desdoblar el almidón en sus subunidades por medio de la enzima extracelular amilasa.

El agar almidón se utiliza para detectar el desdoblamiento del almidón por la acción de la amilasa al agregar al sistema (previa incubación) una solución de yodo (lugol).

MATERIAL

- 1 placa de agar almidón.

REACTIVOS

- Yodo acuoso de Gram o yodo acuoso de lugol.

MÉTODO

1. Inocular la placa con el microorganismo indicado por el profesor por estría cerrada.
2. Invertir las cajas e incubar a $35\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas.
3. Después de la incubación cubrir la placa con solución de lugol.
4. Efectuar las observaciones correspondientes e interpretar resultados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	149 / 182

Resultados

Cepa:

Prueba:	Resultado Práctico	Resultado Teórico
Utilización de Carbohidratos		
Caldo RF + Lactosa		
Caldo RF + Manitol		
Caldo RF + Sacarosa		
KIA		
O/F + _____		
TSI		
Prueba del IMViC		
<i>Indol</i>		
<i>Rojo de Metilo</i>		
<i>Voges-Proskauer</i>		
<i>Citrato</i>		
Degradación de Aminoácidos		
LIA		
Descarboxilación de la orotina		
Desaminación de la fenilalanina		
Hidrolisis de		



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	150 / 182

Prueba:	Resultado Práctico	Resultado Teórico
Urea		
Gelatina		
Almidón		
MIO o SIM		
Producción de H ₂ S		
Indol		
Motilidad		
Ornitina		
Otras Pruebas		
Reducción de Nitratos		

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	151 / 182

Cuestionario

1. Elabore una tabla para las siguientes pruebas de ensayo: caldo RMVP, caldo con nitrato, SIM, MIO, fenilalanina desaminasa y agar almidón que contenga la siguiente información:
 - i. Nombre y pH inicial del medio.
 - ii. Estado físico.
 - iii. Siembra y cantidad de inóculo recomendado
 - iv. Utilidad del medio de cultivo o de la prueba.
 - v. Temperatura y tiempo de incubación.
 - vi. Reactivos necesarios (orden de adición y volumen).
 - vii. Tiempo máximo de lectura del resultado.
 - viii. Interpretación.
 - ix. Reporte de resultados.
2. Elabore una tabla para las siguientes pruebas bioquímicas o medios de ensayo: caldo rojo de fenol más carbohidratos, urea de Christensen, gelatina nutritiva, Hugh Leifson (O/F), TSI, citrato de Simmons, y LIA.
 - i. Nombre y pH inicial del medio
 - ii. Estado físico.
 - iii. Siembra y cantidad de inóculo recomendado.
 - iv. Utilidad del medio de cultivo o la prueba.
 - v. Temperatura y tiempo de incubación.
 - vi. Indicador de pH.
 - vii. Interpretación del viraje.
 - viii. Reporte de resultados.
3. ¿Por qué el medio TSI no debe leerse antes de 18 horas ni después de 24 horas de incubación?
4. ¿Cómo se interpretan los resultados obtenidos a partir del medio TSI?
5. ¿Cómo se observa la desaminación de la lisina en el medio LIA?
6. ¿Por qué es importante leer la prueba de rojo de metilo a las 48 horas de incubación?
7. ¿Cómo se interpreta la prueba Oxidación-Fermentación? ¿Cómo se reportan los posibles resultados obtenidos a partir del medio O/F de Hugh-Leifson?
8. Esquematice la reacción de desaminación de la L-ornitina y L-lisina.
9. Si el medio SIM se encuentra totalmente ennegrecido a causa de la producción de H₂S ¿Cómo interpretaría la prueba de motilidad?
10. ¿Qué importancia tiene la identificación de las bacterias?



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	152 / 182

Referencias

1. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana: 2003.
2. Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Sthal DA & Brock T. Brock Biology of Microorganism. 14th Ed. USA: Pearson: 2014
3. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology. 27 Edition. McGraw-Hill Education / Medical; 2015.
4. Tortora G, Funke B, Case C. Microbiology an introduction. 8th ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2004.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	153 / 182

Práctica 15: Análisis microbiológico de la leche.

Objetivo

Valorar la importancia de las pruebas realizadas para el control microbiológico de la leche como verificación del proceso de pasteurización.

Aspectos teóricos

La leche cruda proviene de vacas, búfalos, ovejas y cabras, aunque el volumen más grande proviene de las vacas. La leche es alta en proteínas y carbohidratos (lactosa), utilizados por muchos microorganismos para crecer.

En la leche cruda, los microorganismos provienen del interior de las ubres, las superficies del cuerpo del animal, del alimentador, el aire, el agua y el equipo que se usa para ordeñar y almacenar la leche. Los tipos predominantes provenientes de una ubre sana son *Micrococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*. Por lo general, la leche cruda contiene $<10^3$ microorganismos/mL. Si una vaca presenta mastitis, puede excretar *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* y coliformes en números relativamente altos. Además, es posible que las glándulas mamarias puedan infectarse con microorganismos provenientes de la sangre del animal. Entre estos se encuentran *Mycobacterium tuberculosis* (variedad *hominis* y variedad *bovis*) causantes de tuberculosis en el hombre; también pueden hallarse *Brucella abortus* y *Brucella melitensis* causantes de brucelosis en el hombre y que provocan abortos en las vacas.

En los contaminantes provenientes de los animales, el alimentador, el suelo y el agua, predominan bacterias de ácido láctico, coliformes, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus* y esporas de *Clostridium*. Patógenos como *Salmonella*, *Listeria*



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	154 / 182

monocytogenes, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* también provienen de estas fuentes. El equipo puede ser una fuente principal de bacilos gramnegativos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*, además de *Micrococcus* y *Enterococcus*.

Durante el almacenamiento en refrigeración antes de la pasteurización, sólo pueden crecer microorganismos psicrófilos en la leche cruda. Éstos incluyen *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* y algunos coliformes y *Bacillus sp.*

Los microorganismos presentes en la leche pasteurizada son los que sobreviven a la pasteurización de la leche cruda (p. ej. Los termorresistentes como *Micrococcus*, algunos *Enterococcus*, como *E. faecalis*, *Streptococcus*, algunos *Lactobacillus* como *L. viridescens* y esporas de *Bacillus* y *Clostridium*) y los contaminantes que entran después del calentamiento y antes del empacado (que pueden ser coliformes, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*).

DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD BACTERIOLÓGICA DE LA LECHE.

MÉTODOS DIRECTOS

Existen numerosos y diversos métodos para apreciar la calidad bacteriológica de la leche. Los más precisos y significativos son aquellos que permiten la enumeración de los microorganismos; pero también son los más delicados y más largos. El análisis bacteriológico de la leche exige, en principio, el recuento de la población total y de los grupos microbianos más importantes, especialmente desde el punto de vista higiénico (bacterias patógenas, coliformes, esporuladas, termorresistentes, etc.).

Entre los métodos directos más utilizados se encuentran:

Recuento en placa. Las muestras de leche se diluyen para sembrar las placas utilizando un medio de gelosa como cultivo; tras una incubación de 2 a 3 días a 30 °C, se cuentan las UFC.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	155 / 182

Recuento directo al microscopio. El método de Breed, es el más utilizado. Con una pipeta capilar o un asa calibrada se extiende 0.01 mL de leche de manera uniforme sobre un portaobjetos en un área de 1 cm²; se seca al aire y se desengrasa con xilol, a continuación se fija con alcohol y se tiñe con azul de metileno al 0.3% y se realiza el conteo en al menos 10 campos del microscopio. Conocida la superficie del campo puede calcularse el número medio de bacterias por mililitro de leche. Este método tiene la ventaja de ser rápido, sin embargo, no puede emplearse satisfactoriamente con leche de contenido bacteriano bajo.

Prueba de coliformes. Se utiliza esta prueba después de la pasteurización con la finalidad de descubrir contaminaciones posteriores. Se realiza en medios selectivos como el agar bilis rojo violeta o agar lactosado desoxicolato usando la técnica de placa vertida. Después de la incubación, los coliformes muestran colonias de color rojo oscuro de 5 o más milímetros de diámetro.

También puede realizarse en medios líquidos por el método del N.M.P.

MÉTODOS INDIRECTOS

Pruebas basadas en la reducción de colorantes. El tiempo de decoloración de un colorante indicador de la oxidorreducción da una medida del grado de contaminación de la leche, ya que existe una relación entre el desarrollo microbiano y el descenso del potencial redox. En la actualidad se utilizan con frecuencia dos pruebas, la prueba del azul del metileno (o prueba de la reductasa) y la prueba de la resazurina.

Prueba de reducción del azul de metileno. El tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la incolora (reducida) bajo condiciones controladas es inversamente proporcional a la calidad sanitaria de la leche, y aunque no es posible establecer con exactitud el número de microorganismos, es factible clasificar el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables. La incubación se hace en



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	156 / 182

tubos estériles a 37 °C con 10 mL de leche y 1 mL de colorante. A intervalos regulares se observa el color de la mezcla, pudiéndose así definir diferentes categorías de leche.

Clase de Leche

Tiempo de Reducción

I Leche de excelente calidad

Más de 8 h

I Leche de buena calidad

6 a 8 h

II Leche regular

De 2 a 6 h.

III Leche de mala calidad

De 20 min. a 2 h.

IV Leche de muy mala calidad

Menos de 20 min.

Prueba de la fosfatasa alcalina (Prueba de Aschaffenburg y Muellen). La fosfatasa es una enzima normalmente presente en la leche cruda y progresivamente inactivada por calentamiento a temperaturas superiores a 60 °C. Se ha demostrado que esta enzima es más difícil de destruir que la mayoría de los organismos patogénicos termo-resistentes que pudieran estar presentes en la leche, como por ejemplo el bacilo tuberculoso. La prueba es de gran utilidad para decidir si la leche ha sido o no pasteurizada, si la leche pasteurizada se ha mezclado con leche cruda, o incluso si la pasteurización ha sido deficiente.

Este método se basa en la hidrólisis del fenil-fosfato, que en presencia de la fosfatasa de la leche libera fenol; éste se determina colorimétricamente haciéndolo reaccionar con 2,6-dibromo-quinonclorimida (B.Q.C.) obteniéndose un color azul, cuya intensidad se mide con el espectrofotómetro.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	157 / 182

Sin embargo, hay que tener en cuenta que esta enzima se inactiva con la pasteurización lenta o LTLT (Low Temperature 62 °C, Long Time 30 min) y no así con el tratamiento de pasteurización rápida o HTST (High Temperature 72 °C Short Time 15 s).

Otras pruebas que se realizan como control microbiológico de la leche son:

1. Aislamiento de psicófilos.
2. Aislamiento de bacterias termorresistentes.
3. Aislamiento de bacterias patógenas.
4. Prueba de sedimento y recuento leucocitario.

Cabe mencionar que el papel del Q.F.B. en este ámbito puede considerarse desde dos aspectos diferentes: 1. El realizar control microbiológico como tal al realizar la pasteurización de la leche y llevar a cabo pruebas como la reducción de azul de metileno y conteo de coliformes; y 2. El utilizar las pruebas bioquímicas para llevar a cabo la identificación de microorganismos, como es el caso de la leche tornasol y el agar leche.

Material y reactivos

Material

- Pipetas estériles 1 y 10 mL.
- Asa bacteriológica
- Termómetro
- 2 tubos estériles de 18X150
- 1 caja de Petri estéril
- 3 tubos de leche tornasol
- 1 caja de agar leche
- Medio agar bilis rojo violeta estéril fundido



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	158 / 182

Material biológico

CEPAS

- *Escherichia coli*
- *Bacillus cereus*
- *Proteus vulgaris*
- *Staphylococcus aureus*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Enterococcus faecalis*

MUESTRA

- Muestra de leche cruda

Reactivos

- Colorante azul de metileno

Equipo

- Incubadora

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	159 / 182

Procedimiento

I. PASTEURIZACIÓN DE LA LECHE CRUDA.

1. Colocar 10 mL de leche cruda en un tubo estéril de 18X150 con tapón previamente etiquetado con la letra P (pasteurizado).
2. Pasteurizar la leche por cualquiera de los dos métodos disponibles LTLT ó HTST.
3. Realizar la prueba de reducción de azul de metileno como control.

II. REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO.

1. Colocar 10 mL de leche cruda en un tubo estéril de 18X150 con tapón previamente etiquetado con las letras NP (No pasteurizado).
2. Agregar a ambos tubos (P y NP) 1 mL de la solución de azul de metileno y mezclar homogéneamente. Comenzar a contar el tiempo de reducción.

Nota: Mantener los tubos al abrigo de la luz.

3. Incubar a 37 °C, observar su color frecuentemente durante la primera media hora, posteriormente puede observarse el color de los tubos a intervalo de 1 hora, **sin agitarlos**.
4. Una muestra se considera reducida cuando presenta 4/5 partes decoloradas.

III. REACCIONES MICROBIOLÓGICAS EN LECHE TORNASOL (*LITMUS MILK*).

1. Inocular un tubo de leche tornasol con 1 mL de leche cruda.
2. Inocular otro tubo de leche tornasol con una asada de *E. coli*.
3. Realizar lo mismo con la cepa de *P. vulgaris* (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y/o *Bacillus cereus*).
4. Incubar a 37 °C por 24-48 h.
5. Reportar las reacciones que se presentaron con la muestra de leche y con las cepas utilizadas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	160 / 182

IV. SEMBRADO EN PLACAS DE AGAR BASE LECHE.

1. Tomar con el asa bacteriológica una muestra de leche cruda y sembrar por estría simple en la mitad de la placa de agar leche.
2. Sembrar en la otra mitad de la placa una asada de *Bacillus cereus*.
3. Observar el proceso de proteólisis.

V. DETERMINACIÓN DE COLIFORMES.

1. En una caja de Petri estéril, colocar una alícuota de 1.0 mL de leche.
2. Adicionar el medio bilis rojo violeta fundido y enfriado a una temperatura de 45-50 °C, mezclar suavemente.
3. Permitir que el medio solidifique y adicionar 4 mL más del medio fundido y enfriado a una temperatura de 45-50 °C.
4. Permitir que el medio solidifique e incubar a 37 °C por 24-48 h.
5. Examinar las colonias de color rojo a púrpura, de 0.5 mm de diámetro (o más grande) rodeadas de un halo con precipitado de ácidos biliares.

Reporte de resultados

1. Reportar la calidad de la leche pasteurizada (P) y no pasteurizada (NP) determinando el tiempo necesario para reducir el azul de metileno en cada muestra de leche. Considerando que una muestra de leche se considera reducida cuando presenta 4/5 partes decoloradas.
2. Reportar las reacciones microbiológicas en leche tornasol para cada una de las muestras de leche y las reacciones en las cepas bacterianas utilizadas como controles.
3. Indicar si se presenta el proceso de proteólisis en la placa de agar leche para el microorganismo de *Bacillus cereus* y para la muestra de leche no pasteurizada (NP).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	161 / 182

- Indicar la presencia de organismos coliformes determinando colonias características en el medio bilis rojo violeta; y reportar número de colonias características en el medio por 1 mL de leche.

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Cuestionario

- ¿Qué es la pasteurización y cuántos tipos de ésta existen?
- Explique por qué la leche recién ordeñada de una vaca no enferma tiene poder bacteriostático.
- ¿Qué enfermedades se pueden adquirir por consumir leche contaminada y cuáles son los agentes etiológicos.
- Indique que bacterias no patógenas se pueden entrar en la leche.
- Indique la reacción química de la enzima fosfatasa.
- En qué consiste la prueba de sedimento y recuento leucocitario.
- Qué ventajas presenta el método de Breed sobre el cuento en placa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	162 / 182

8. Mencione el fundamento y las reacciones que se pueden presentar en el medio de leche tornasol.
9. Escriba la reacción química con fórmulas desarrolladas de la reducción del azul de metileno.
10. Cuál es la composición nutrimental de la leche de vaca.

Referencias

1. Ray B, Bhunia A. Fundamentos de microbiología de los alimentos. 4ª ed. México: McGraw Hill; 2010.
2. Celis M, Juárez D. Microbiología de la leche [Internet]. Buenos Aires: Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional; 2009 [accesado 26 de junio de 2017]. Disponible en http://www.edutecne.utn.edu.ar/sem_fi_qui_microb_09/microbiologia_leche.pdf
3. Alexander S, Strete D. Microbiology, a photographic atlas for the laboratory. San Francisco: Benjamin Cummings; 2001.
4. Control Sanitario de Bienes y Servicios. Norma oficial mexicana nom-113-ssa1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa [Internet]. México: Secretaría de Salud; 1995 [accesado 26 de junio de 2017]. Disponible en <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/113ssa14.html>
5. Ficha Técnica. Agar bilis y rojo violeta [Internet]. Estado de México: MCD LAB; S/A [accesado 26 de junio de 2017]. Disponible en <http://www.mcclab.net/Fichas%20Tecnicas/Agar%20Bilis%20y%20Rojo%20Violeta.pdf>



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	163 / 182

Práctica: 16 Análisis microbiológico del agua

Objetivo

- Realizar el análisis microbiológico de una muestra de agua y comprender su importancia en el ámbito de la salud pública.

Aspectos teóricos

En la actualidad el volumen limitado de agua dulce con que cuenta el planeta condiciona el número de habitantes que este puede sostener, debido a que menos del 1% del agua que hay en el mismo es potable.

Aseguran los expertos de la Organización Mundial de la Salud OMS (1967) que la polución del medio por las materias residuales que resultan de las actividades humanas es uno de los problemas más importantes, difíciles y complejos con los que deben enfrentarse los servicios de sanidad pública.

El hombre es el reservorio más frecuente de los agentes causales de las enfermedades infecciosas humanas y en menor proporción los animales o plantas. Muchos de estos agentes son eliminados con las excretas (heces y orina) y, en menor cuantía, por otras vías de salida (boca, nariz, conjuntiva, etc.) contaminando las aguas.

La transmisión de las enfermedades, fundamentalmente las alimentarias o enterógenas, se efectúa de diversas formas a partir de las excretas y aguas residuales, ya sea por contacto directo, por mediación con insectos, por alimentos o por el agua contaminada. El agua es el elemento de contagio directo al transmitir directa o indirectamente los agentes productores de enfermedades.

Con el fin de garantizar en el mayor grado posible la inocuidad del agua destinada al consumo público, la mayoría de los países han establecido normas de potabilidad que incluye análisis físicos, químicos y bacteriológicos.

En México la calidad del agua para uso y consumo humano está determinada por las siguientes normas:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	164 / 182

- Norma Oficial Mexicana NOM- 127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998. Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por sistemas de abastecimiento públicos.
- Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA1-1993. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano públicos y privados.
- Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano, en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.
- Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

El control y vigilancia de la calidad del agua es clave para reducir los riesgos de transmisión de enfermedades gastrointestinales a la población; la calidad microbiológica del agua se establece determinando el número más probable de organismos coliformes con base en la NOM -112-SSA1-1994 y verificar que este número se encuentre dentro de los límites establecidos en la NOM-127-SSA1-1994.

En el aspecto bacteriológico, la definición de gérmenes indicadores de contaminación, es esencial para la interpretación de la calidad del agua objeto de estudio, siendo motivo de debate bajo la luz que proporcionan las nuevas técnicas analíticas, los medios de cultivo más selectivos y el mejor conocimiento epidemiológico, que permiten conceder a cada indicador bacteriano el crédito de confianza que realmente merece.

PRUEBAS BACTERIOLÓGICAS DE CONTAMINACIÓN

Se presupone que el objetivo de los análisis rutinarios es determinar la existencia de microorganismos patógenos en el agua; sin embargo, esto no es verdad, por las siguientes razones:

1. Los organismos patógenos llegan al agua en forma esporádica y no sobreviven mucho tiempo; por lo tanto, pueden no estar en una muestra que se envíe al laboratorio.
2. Si se encuentran en pequeñas cantidades, pueden pasar desapercibidos a los procedimientos empleados.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	165 / 182

3. Se necesitan 24 horas o más para obtener resultados de los exámenes y si se encuentran microorganismos patógenos, muchas personas pueden haber tomado agua antes de que se conozcan resultados, y así haberse expuesto a la infección.

GÉRMENES INDICADORES DE CONTAMINACIÓN FECAL

Se sabe que los microorganismos patógenos que llegan a los depósitos de agua proceden de las descargas intestinales de hombres y animales, además, ciertas especies de bacterias, particularmente *Escherichia coli*, y varios microorganismos similares, denominados coliformes, *Enterococcus faecalis* y *Clostridium perfringens*, son habitantes normales del intestino grueso del hombre y animales, en consecuencia siempre están en las materias fecales. Así pues, la presencia de cualquiera de estas especies en el agua es evidencia de contaminación fecal y el camino está abierto a los patógenos ya que se encuentran en la materia fecal.

Puesto que los exámenes de laboratorio para encontrar microorganismos patógenos en el agua tiene las desventajas enumeradas, se han desarrollado técnicas para detectarlos en las excretas, particularmente los del grupo coliforme. Este propósito ha probado ser satisfactorio en la práctica y tiene las siguientes ventajas:

1. Los microorganismos coliformes, sobre todo *E. coli*, habitan constantemente el intestino humano en grandes cantidades. Se estima que una persona, en promedio, excreta al día miles de millones de estos microorganismos.
2. Estos microorganismos viven más tiempo en el agua que los patógenos.
3. Obviamente, una persona sana en general no elimina microorganismos patógenos, pero puede desarrollar una infección intestinal y esos microorganismos aparecerán en la materia fecal. Así la presencia de coliformes en el agua se toma como señal de alarma, pues ha sido contaminada peligrosamente.

Surge así el concepto de “indicador de contaminación fecal”, el cual será utilizado para la valoración de la potabilidad bacteriológica del agua.

Los organismos indicadores deben contar con las siguientes condiciones:

1. Deben estar presentes siempre que lo estén los gérmenes patógenos en cuestión.
2. Deben encontrarse en número muy superior al de las bacterias patógenas.
3. Deben reaccionar de la misma manera y en el mismo grado frente a las condiciones ecológicas del medio hídrico natural.
4. Deben ser más resistentes que las bacterias patógenas a los procesos de depuración y esterilización, por lo cual serán igualmente útiles en aguas naturales y en aguas tratadas.
5. Deben poder ser determinados mediante análisis relativamente sencillos, rápidos y económicos.
6. Deben prestarse tanto a la determinación cuantitativa como a la diferenciación cualitativa.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	166 / 182

7. Su desarrollo en medios de cultivo artificiales debe producirse sin ser interferidos por la presencia de otras especies.

La mayoría de las normas analíticas acuden a la identificación de *Escherichia coli*, por ser el único del grupo coliformes, cuyo origen es indiscutiblemente fecal.

GRUPO COLIFORMES

Se ha adoptado con carácter general el grupo de coliformes como el indicador más digno de confianza. La OMS (1964) incluye dentro del grupo coliformes todos los bacilos aerobios y anaerobios facultativos Gram negativos no esporulados que fermentan la lactosa con producción de ácido y gas a 35-37 °C en menos de 48 horas.

El término habitual “coliformes” comprende *E. coli* y diversas especies pertenecientes a otros géneros de la Familia *Enterobacteriaceae*.

Escherichia coli es un germen cuyo hábitat es el tracto entérico del hombre y de los animales. Por ello la presencia de este microorganismo en un alimento indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal. *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en los moluscos, en los productos lácteos y en otros alimentos.

Una práctica común es utilizar las pruebas para coliformes, que incluyen *E. coli*, en los ensayos de “screening” o preliminares. Si de estas pruebas iniciales se deduce la posibilidad de coliformes u otras enterobacterias, se somete a posteriores estudios para determinar si entre ellos está presente *E. coli*.

El término “coliformes fecales” ha surgido como un intento de encontrar métodos rápidos y fiables para establecer la presencia de *E. coli* y variantes estrechamente relacionados sin necesidad de purificar los cultivos obtenidos en las pruebas para coliformes o de aplicar las relativamente costosas pruebas confirmatorias. Los coliformes fecales incluye un número ligeramente mayor de variedades que el conjunto de gérmenes obedientes a las pruebas agrupadas bajo el signo IMViC. La presencia de éste grupo de microorganismos es indicativo contundente de una contaminación de origen fecal, por ello, es necesaria la incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44-45.5, dependiendo del método) para confirmar la presencia de éstos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	167 / 182

TÉCNICAS BACTERIOLÓGICAS PARA DETERMINAR LA CALIDAD SANITARIA DEL AGUA POTABLE

Los procedimientos bacteriológicos de rutina son:

1. Cuenta en placa para determinar el número de bacterias presentes en el agua (ver práctica 8).
2. Pruebas que revelan la presencia de microorganismos contaminantes.

MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ORGANISMOS INDICADORES DE CONTAMINACIÓN

Dos son los métodos principalmente utilizados en la detección y numeración de organismos coliformes, microorganismos más comúnmente utilizados en la práctica rutinaria de los exámenes sanitarios del agua.

1. Método de los tubos múltiples
2. Filtración por membrana

MÉTODO DE LOS TUBOS MÚLTIPLES

En este método se siembran tres partes alícuotas de la muestra original seriadas en 9 o 15 tubos con medio apropiado, según se trate de la técnica de 3 tubos o la de 5 tubos respectivamente. El número de microorganismos en la muestra original se determina utilizando las tablas convencionales del MNP. Se trata de un método estadístico de aquí que los resultados que con él se obtienen sean generalmente más elevados que los que se obtienen por el método convencional de recuento en placa. Este método fue presentado por McCrady en 1915. No es un método exacto de análisis, los límites de confianza del 95% para la prueba de tres tubos oscilan desde 21 a 395. Cuando se utiliza la prueba de tres tubos, 20 de las 62 combinaciones posibles representan el 99% de todos los resultados, mientras que en la prueba de cinco tubos, 49 de los 214 combinaciones posibles representan el 99% de todos los resultados. A pesar de que se llegó a la conclusión de que algunos valores obtenidos del NMP son improbables, este método de análisis ha adquirido popularidad, entre las ventajas que ofrece se encuentran las siguientes:

1. Es relativamente sencillo y barato.
2. Es más probable que los resultados de un laboratorio coincidan con los de otro laboratorio, cosa que no sucede con los resultados del método convencional de recuento en placa.
3. Mediante el uso apropiado de medios selectivos y diferenciales se puede determinar el número de microorganismos pertenecientes a grupos específicos (Coliformes, Coliformes fecales, etc.)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	168 / 182

Entre los inconvenientes para ser utilizado se encuentra la gran cantidad de material de vidrio que se necesita para realizarlo (en especial la técnica de cinco tubos), la falta de oportunidad para observar la morfología colonial de microorganismos y su falta de exactitud.

El proceso supone tres pasos sucesivos: a) prueba presuntiva, b) prueba de confirmación y c) prueba de consumación o total.

1. Prueba presuntiva consiste en la inoculación de una cantidad previamente determinada de la muestra de agua, en frascos o tubos de fermentación que contienen un medio de cultivo apropiado, examinando al cabo de un determinado tiempo de incubación las reacciones provocadas por los organismos coliformes. Este examen es denominado presuntivo a causa de que las reacciones observadas pueden ser provocadas por otros organismos no coliformes, por lo que la presunción de que la reacción es debida a organismos coliformes debe confirmarse. Los medios de cultivo utilizados son muy variados; sin embargo, los que más se recomiendan en la actualidad son el caldo lactosado, el caldo lauril triptosa, el MacConkey con rojo neutro o púrpura de bromocresol como indicador, y últimamente medios de glutamato con lactosa, incubados hasta 48 horas a 35-37 °C, considerándose positivos aquellos tubos que muestran gas y acidez.
2. Prueba confirmativa, es la confirmación de la presencia de organismos coliformes y *E. coli*, se realiza mediante subcultivo de tubos positivos en medios de confirmación líquidos o sólidos. En medios líquidos se realiza en dos tubos de fermentación con alguno de los caldos siguientes: biliado lactosado con verde brillante, lactosa ricinoleato o caldo de MacConkey. Uno de los tubos se somete a incubación a 35-37 °C durante un máximo de 48 horas; La producción de gas confirma la presencia de bacterias coliformes. El otro, a 44 – 45 °C, durante un máximo de 24 horas, para confirmación de bacterias coliformes fecales. En medios sólidos se realiza en cajas de Petri con algunos de los siguientes medios: agar con eosina y azul de metileno, agar MacConkey o medio de Endo, La formación de colonias típicas demuestra la presencia de estos gérmenes.
3. Pruebas de comprobación final, Cuando es exigida o aconsejable una prueba completa, algunas de las colonias aisladas en los medios de confirmación sólidos o aquellas obtenidas en uno de estos medios por resiembra de los tubos positivos en medios de confirmación líquidos, se inoculan en tubos de fermentación con lactosa y placas de agar (Endo, Eosina azul de metileno, MacConkey). La formación de gas en el caldo lactosado y la evidencia de bacilos Gram-negativos no esporulados en el cultivo de agar correspondiente demuestra la existencia de algún germen del grupo coliformes en la muestra. Pueden identificarse también los coliformes y los coliformes fecales de las colonias aisladas de medios sólidos por las pruebas de IMViC (indol, rojo de metilo, Voges Proskauer y citrato) y fermentación de lactosa a 35 – 37 °C y 44–45 °C.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	169 / 182

Conocida la dilución de la muestra y los resultados proporcionados por los tubos de fermentación iniciales, se puede con ayuda de tablas estadísticas, conocer en la muestra examinada el número más probable (NMP) de organismos coliformes presuntivos o confirmados, según nos refiramos a una u otra prueba.

MÉTODO DE FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Consiste en hacer pasar una cantidad previamente determinada de agua a través de una membrana (celulosa o policarbonato) con un diámetro de poro de 0.45 μm que retiene a las bacterias, pero que permite ser atravesada por el agua. La membrana se coloca posteriormente en una caja de Petri en la que se ha depositado un medio de cultivo adecuado (Endo, MacConkey, Tergitol agar) y sometida a incubación a 35-37 °C, para coliformes y a 44-45 °C para coliformes fecales durante 20 horas. Al cabo de este periodo se observan las colonias aparecidas.

Si es necesario, las colonias individuales recogidas son sometidas a subcultivos en caldo lactosado y observación microscópica previa tinción de Gram.

Ofrece este método la ventaja de una gran rapidez, pero es inadecuado en los siguientes casos:

1. Aguas de alta turbidez y pocos organismos coliformes
2. Aguas cuya proporción de organismos no coliformes es elevado, ya que su crecimiento interfiere al de organismos coliformes.
3. En agua con claro predominio de organismos no fermentadores de lactosa se produce una elevada proporción de resultados positivos falsos.

A pesar de todos estos inconvenientes las ventajas del mismo lo superan con creces, hasta el punto que esta técnica se utiliza en numerosos países como en México.

VOLUMEN DE AGUA REQUERIDO PARA EXAMEN BACTERIOLÓGICO

En general, 100 mL es la cantidad de agua requerida en todo examen bacteriológico.

Si se sospecha que el agua a analizar tiene cloro residual, cloramina o metales que puedan inhibir el desarrollo bacteriano, deberá agregarse al frasco antes de utilizarlo, tiosulfato de sodio 100 mg/L de muestra, para desclorar y/o EDTA 372 mg/L de muestra para quelar los metales.

TRANSPORTE

Para transportar la muestra desde el sitio de obtención hasta el laboratorio se debe utilizar material refrigerante en bolsas, sobre todo si el análisis microbiológico va a efectuarse



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	170 / 182

después de una hora de obtenida la muestra. El estudio debe realizarse a más tardar 6 horas después de haber obtenido la muestra para que éste sea representativo.

TOMA DE MUESTRA

En todos los casos los recipientes no se deben llenar en su totalidad, es preferible llenarlos hasta dos terceras partes de su capacidad para que permita su agitación posterior. El agua debe ser colectada de diversos lugares y en cada uno la toma es diferente:

AGUA SIN MOVIMIENTO

Los depósitos de agua que pueden ser naturales (lagos, manantiales, etc.) o artificiales (tanques, cisternas, piscinas, etc.) para tomar la muestra se debe de considerar la profundidad y área superficial del depósito a muestrear ya que el agua de la superficie suele estar menos contaminada que la del fondo. Algunas veces es necesario tomar tres muestras de diferentes niveles y cuando la superficie es grande se debe tomar en diferentes puntos:

1. Para la muestra de la superficie o de los receptáculos de poca profundidad introducir el frasco destapado y sostenido por la base y con la boca hacia abajo, girando lo necesario para orientarlo hacia arriba e impulsarlo suavemente hacia adelante de tal manera que al salir a la superficie se haya llenado a dos terceras partes de su capacidad.
2. Aguas profundas además se debe de tomar las muestras de niveles medios y profundos esto se puede realizar adaptando dos cordeles al frasco (uno a la boca del frasco y otro al tapón esmerilado, ambos con una unión entre el tapón y el frasco) así como un lastre inerte que permita que se sumerja el mismo. Ya que el frasco esté en la profundidad deseada, destapar el frasco jalando el tapón con el cordel al tiempo que se sube suavemente el frasco una corta distancia tapar nuevamente soltando el cordel del tapón y sacar el frasco, en caso de que se encuentre totalmente lleno tirar un poco para que permita su posterior agitación.

AGUA EN CORRIENTES

Puede ser natural (río o arroyo) o artificial (tubería o grifo):



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	171 / 182

1. Agua en corriente natural se colecta en forma similar a la descrita para la muestra de superficie de agua sin movimiento, ejecutando el movimiento del frasco en dirección opuesta al sentido de la corriente, si el efluente de agua toca varios asentamientos humanos, debe de realizarse el muestreo a diferentes distancias preestablecidas.
2. El agua de una tubería o de un grifo se coloca previa limpieza del interior del ducto de salida, con una torunda de algodón estéril sujeta con pinzas o flameando a fondo la abertura de salida, dejar salir el agua a presión durante un minuto como mínimo, disminuir la velocidad de la salida y llenar el frasco hasta dos terceras partes de su capacidad. En este caso el muestreo debe planearse de acuerdo a la red de agua potable que opere en la zona.

ETIQUETADO

Todas las muestras deben estar perfectamente etiquetadas, las etiquetas deben contener el sitio exacto de la toma de muestra, en algunas ocasiones la hora y la fecha en que fue tomada y quien la muestreó.

Material y reactivos

Material

- 1 caja de Petri
- 4 tubos de 13X100
- 9 campana de Durham
- 9 tubos de 18X150
- 3 pipetas graduadas de 10, 5 y 1 mL

MEDIOS

- 1 tubo con Citrato de Simmons
- 2 tubos con RM-VP
- 1 tubo con SIM
- 1 placa de EMB
- 9 tubos con caldo rojo de fenol + lactosa

Material biológico

- Muestra de agua de diferentes fuentes
- Agua de cisterna



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	172 / 182

- Agua de garrafón
- Agua de tinaco
- Agua de grifo
- Agua de fruta
- Agua de charca

Reactivos

- Reactivo de kovac
- Rojo de metilo
- Alfa naftol al 5%
- Hidróxido de potasio (KOH) al 40%

Equipo

- Microscopio
- Incubadora

Servicios

- Electricidad
- Agua
- Gas

Procedimiento

NÚMERO MÁS PROBABLE (NMP) PARA COLIFORMES

(Ver Fig. 16.1)

PRUEBA PRESUNTIVA

1. Se colocan 10 mL de muestra de agua en una serie de 3 tubos que contengan 10 mL de caldo rojo de fenol + lactosa doble concentración con campana de Durham.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



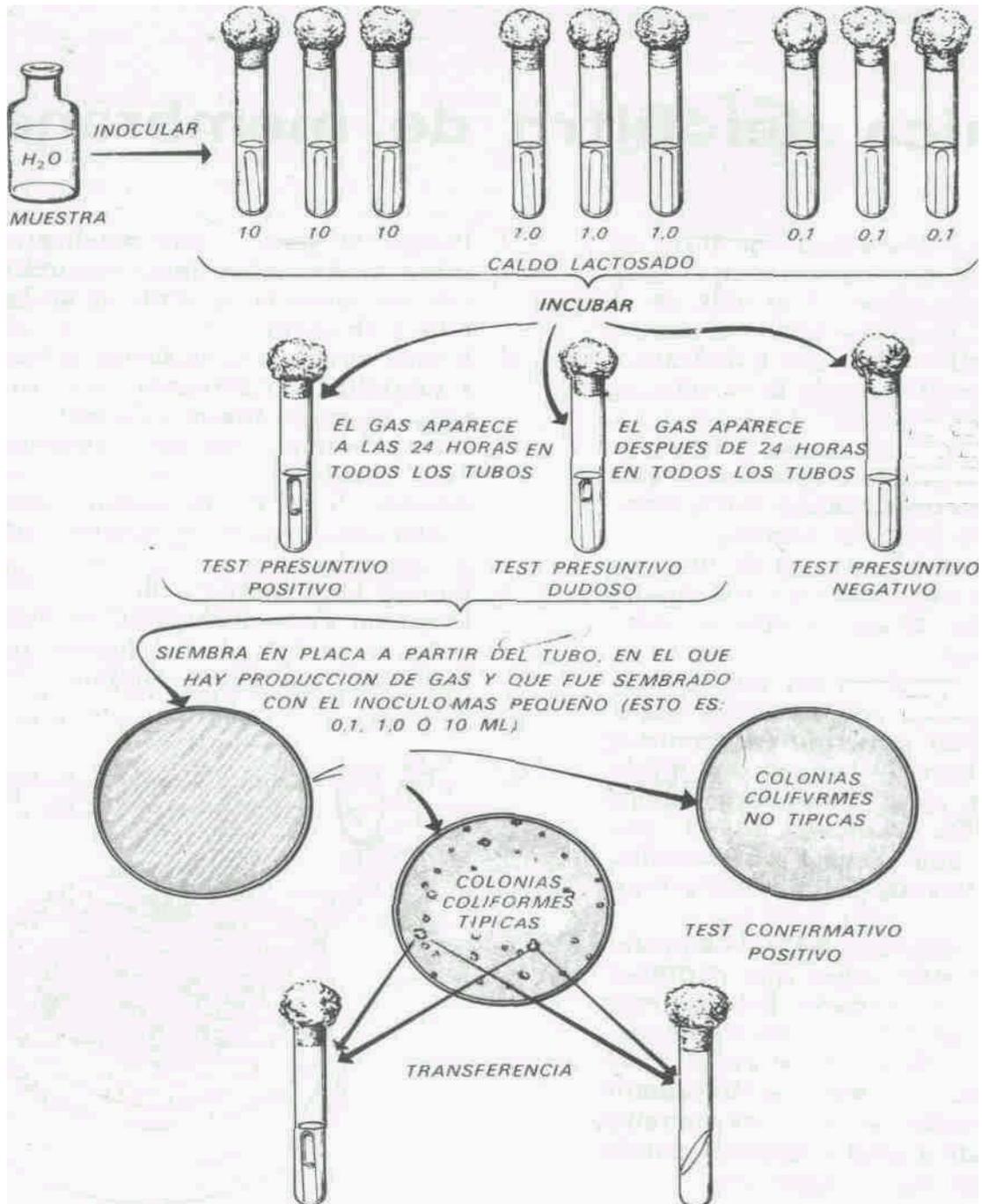
Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	173 / 182

2. Se coloca 1 mL de muestra de agua en una serie de 3 tubos que contengan 10 mL de caldo rojo de fenol + lactosa con campana de Durham.
3. Se coloca 0.1 mL de muestra de agua en una serie de 3 tubos que contengan 10 mL de caldo rojo de fenol + lactosa con campana de Durham.
4. Incubar a 37 °C por 24 horas las tres series de tubos, la formación de gas y el vire del medio a amarillo, indican una prueba positiva presuntiva para coliformes.
5. A partir del número de tubos positivos después de la incubación por el grado de dilución, se encuentra el número más probable a partir de las tablas de evaluación de Mc Crady referido a 100 mL de muestra.

PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES

1. A partir de los tubos positivos en el ensayo anterior estriar para el aislamiento en agar EMB.
2. Incubar a 37 °C por 24 - 48 horas.
3. Observar morfología de las colonias aisladas, si alguna presenta las características referidas a *E. coli* proceder a identificación por pruebas bioquímicas usando los siguientes medios Citrato de Simmons, RMVP y SIM.

Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	174 / 182



IMVIC

Fig. 16.1 Método del número más probable para la determinación de coliformes.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	175 / 182

Reporte de resultados

1. Reportar morfología colonial en EMB.

Medio de cultivo EMB	Característica
Forma	
Tamaño	
Color	
Borde	
Superficie	
Elevación	
Luz reflejada	
Luz transmitida	
Consistencia	
Otras	

2. Si se realizó pruebas bioquímicas para identificar *E. coli* reportar el resultado de ellas de la siguiente manera:

I	M	Vi	C

Nota: Sólo si la prueba confirmatoria coincide con *E. coli* se reporta el NMP.

3. Para reportar en NMP, indicar en la siguiente tabla el número de tubos positivos.

No. tubos	10 mL	1.0 mL	0.1 mL
1			
2			
3			

4. Con base en estos resultados obtener de las tablas de McCrady el NMP.

Muestra	NMP



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	176 / 182

Manejo de residuos

Todas las prácticas del laboratorio de Microbiología General I en las que se trabaja con microorganismos generan Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (R.P.B.I.), estos residuos son aquellos materiales generados que contengan agentes biológico-infecciosos o sus productos (como los cultivos de microorganismos) y que pueden causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.

Los R.P.B.I. deberán ser tratados, con base en lo que establece la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSAI-2002 y el MANUAL DE PROCEDIMIENTOS EN MANEJO DE R.P.B.I. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos deben ser tratados por métodos físicos o químicos que garanticen la eliminación de microorganismos patógenos

En el laboratorio de Microbiología se utilizara la esterilización por calor húmedo a 15 libras de presión, 121 °C por un periodo de 15 a 20 minutos y posterior disposición final en los sitios autorizados (indicados por el asesor)

Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental – Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

Cuestionario

1. Indica si el agua es un hábitat natural de las enterobacterias.
2. Menciona qué es un indicador de contaminación.
3. Menciona 4 microorganismos que se utilizan como índice de contaminación fecal del agua.
4. Menciona 10 enfermedades de origen hídrico.
5. Menciona los tratamientos que pueden realizarse al agua para hacerla potable.
6. Menciona las características del grupo coliformes.
7. Indica cómo se interpretan las tablas de Mc Crady.
8. Indica si se utiliza la misma tabla de Mc Crady para una serie de tres o cinco tubos.
9. Menciona las ventajas y desventajas del NMP y el método de filtración por membrana.
10. Menciona cuál es la carga microbiana y de coliformes permitida para el agua potable.

Referencias



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA
GENERAL I



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	177 / 182

1. Bourgeois CM, Mescle JF y Zucca J. Microbiología alimentaria. Madrid: Acribia. 1994.
2. Cabo De La Puente Catalán. Bacteriología y potabilidad del agua. Madrid: Aportación de los autores al año internacional del libro. 1972.
3. Collins CH. Métodos microbiológicos. Madrid: Acribia. 1989.
4. Harry WS, Van Demark PJ. Microbios en acción. Manual de Laboratorio para Microbiología. Madrid: Blume. 1973.
5. Jay JM. Microbiología moderna de los alimentos. 3ra. ed. Madrid: Acribia. 1992.
6. Koneman, E.W. Diagnóstico Microbiológico. 6ª ed. México: Editorial Médica Panamericana. 2008.
7. Moreno B, Díez ML, García I, Menes LM, Gutiérrez y Poledo JJF. Microorganismos de los alimentos. 2da. ed. Madrid: Acribia. 2000.
8. Mossel DA, Moreno GB. Microbiología de los alimentos. 3ra ed. Madrid: Acribia. 1982.
9. Norma Oficial Mexicana NOM- 127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
10. Norma Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano públicos y privados.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-012-SSA1-1993. Requisitos sanitarios que deben cumplir los sistemas de abastecimiento de agua para uso y consumo humano públicos y privados.
12. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano, en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.
13. Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	178 / 182

Práctica 17: Fermentación (Producción de Vino)

Objetivo general

Comprender las aplicaciones de las fermentaciones en la obtención de productos de la industria de alimentos.

Objetivo específico.

Obtener vino a partir de una fermentación alcohólica llevada a cabo por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

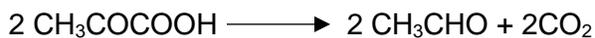
Aspectos teóricos

La fermentación es un proceso catabólico que libera energía a partir de azúcares u otras moléculas orgánicas, es un proceso anaeróbico y utiliza una molécula orgánica como aceptor final de electrones. Solo produce pequeñas cantidades de ATP (sólo uno o dos ATPs por cada molécula de material inicial). Según los productos finales existen diversos tipos de fermentaciones, de la cual, la más conocida es la fermentación alcohólica, la cual se emplea en la producción de vino.

La fermentación alcohólica comienza con la glucólisis de una molécula de glucosa para formar dos moléculas de ácido pirúvico, 2 de ATP y dos NADH₂.



El siguiente paso consiste en la descarboxilación del ácido pirúvico por acción de la piruvato descarboxilasa, liberando dos moléculas de CO₂ y produciendo 2 moléculas de acetaldehído.



Finalmente, estas moléculas de acetaldehído, en presencia de la alcohol deshidrogenasa, son reducidas por el NADH₂, formando dos moléculas de etanol.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	179 / 182

La fermentación alcohólica se observa en numerosas bacterias y levaduras. Dentro de la industria de bebidas alcohólicas se emplean levaduras del género *Saccharomyces*. Para su preparación las uvas deben tener una concentración de azúcar superior al 22%; se prepara el mosto y se le agrega sulfito para destruir levaduras y bacterias indeseables. Se agrega el inóculo de levaduras y se deja fermentar por 7 a 11 días. La cantidad de alcohol varía según el tipo de vino, siendo niveles óptimos entre 12 y 13.5% vol/vol en la mayoría de los vinos.

Material y reactivos

Material

- 1 kg de uva verde.
- 750 g de azúcar morena.
- 1 L de agua.
- Recipiente hondo de boca ancha.
- Papel aluminio.
- Manta de cielo.
- 2 botellas ámbar de 1 L.
- 2 tapones o corchos horadados
- Mangueras de látex.

Material biológico

- Un paquete de levadura de cerveza comercial en pasta.

Servicios

- Electricidad
- Agua



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	180 / 182

Procedimiento

PREPARACIÓN DEL MOSTO

Hervir 1 L de agua, agregar 1 kg de uvas verdes y comenzar a machacar hasta que queden completamente desechas.

Dejar reposar la mezcla por dos días a temperatura ambiente en un lugar fresco. Cubrir el recipiente con papel aluminio.

PROCESO DE FERMENTACIÓN

Una vez que se obtenga el mosto, se procede a filtrarlo a través de dos capas de manta de cielo, recolectando el filtrado en un recipiente de boca ancha.

Agregar 750 g de azúcar morena y agitar hasta su total homogenización.

Agregar 15 g de levadura de cerveza, disolver lo mejor posible.

Una vez obtenida la mezcla, trasvasarla a una botella de vidrio ámbar u opaca llenando hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad.

Tapar la botella con un corcho horadado que tenga una varilla de vidrio que permita la respiración del sistema. Dicha varilla debe tener adaptada una manguera de látex.

Colocar el otro extremo de la manguera de látex dentro de un recipiente con agua.

Dejar reposar por un lapso de 5 a 7 días, revisándolo constantemente.

PASTEURIZACIÓN

Someter el vino a pasteurización rápida (73 °C por 15 s).

Reporte de resultados

Catar y registrar las características del vino obtenido.

Color.

Olor.

Sabor.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML14	30/01/2020	1	181 / 182

Cuestionario

1. Indique tres levaduras usadas en la producción de vino.
2. ¿Cuáles son las condiciones de cultivo para propagación de las levaduras y bajo qué condiciones la levadura produce alcohol?
3. Esquematice el proceso de fermentación alcohólica.
4. ¿Bajo qué condiciones debe realizarse la fermentación alcohólica en la producción del vino tinto?
5. ¿Qué cambio se hace en el proceso de producción de vino para obtener vino tinto, rosado o blanco?
6. En el proceso de producción de vino tinto se realiza una segunda fermentación, la fermentación maloláctica. ¿qué función tiene este segundo proceso de fermentación?
7. ¿Qué es el mosto y qué función tiene en el proceso de producción del vino?
8. ¿Cómo se lleva a cabo el proceso de crianza?
9. ¿Qué es el proceso de trasiego?
10. ¿Para qué se agrega sulfito durante la preparación del vino comercial?

Referencias

1. Tortora G, Funke B y Case Ch. Microbiology, an introduction. 8th ed. San Francisco: Pearson-Benjamin Cummings: 2004.
2. Ingraham J e Ingraham C. Introduction to microbiology. 3rd ed. California: Thompson Learning: 2004.
3. Hernández A. Microbiología industrial. San José: EUNED: 2001.
4. Berg J, Tymoczko J, Stryer L. Bioquímica. 6^a ed. Barcelona: Reverté: 2008.
5. García J. Maridaje, enología y cata de vinos. Málaga: Innovación y Cualificación Ediciones: 2008.
6. Hernández A Microbiología industrial. México: Editorial EUNED: 2003.